

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DOS ELEMENTOS *homo1*  
*E howilli2* DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS  
NEOTROPICAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Larissa Paim Bernardo**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DOS ELEMENTOS *homo1* E *howilli2*  
DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS NEOTROPICAIS**

**Larissa Paim Bernardo**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Biologia Evolutiva de Elementos Transponíveis, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial da obtenção do grau de  
**Mestre em Biodiversidade Animal**

**Orientador: Prof. Élgion Lucio da Silva Loreto**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bernardo, Larissa Paim

História evolutiva dos elementos homol e howilli2 de espécies de drosophilídeos Neotropicais / Larissa Paim Bernardo.-2013.

69 p. ; 30cm

Orientador: Élgion Lucio da Silva Loreto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2013

1. Transposon 2. hATs 3. Evolução genômica 4. Drosophilídeos I. Loreto, Élgion Lucio da Silva II. Título.

---

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Larissa Paim Bernardo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: larissap.bernardo@gmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**


A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DOS ELEMENTOS *homo1* E *howilli2* DE  
ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS NEOTROPICAIS**

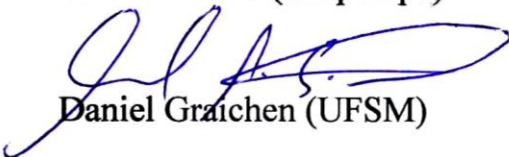
elaborada por  
**Larissa Paim Bernardo**

Como requisito para a obtenção do grau de  
**Mestre em Biodiversidade Animal**

COMISSÃO EXAMINADORA:

  
Élgion Lucio da Silva Loreto  
(Presidente/Orientador)

  
Fabiano Torres (Unipampa)

  
Daniel Graichen (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil  
2013

**Aos meus pais.**

**Ao professor Fabiano Torres.**

## **Agradecimentos**

Um agradecimento especial ao professor Élgion, pela acolhida e credibilidade junto ao seu laboratório.

À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro para a execução do trabalho.

À família Labdros, amigos e colegas que tiveram paciência e bom humor em todos os momentos desde que ingressei no LabDros.

Aos Professores da graduação na Unipampa pelos ensinamentos, pelo incentivo de permanência no meio acadêmico, e principalmente, por instigarem minha curiosidade e despertarem em mim o poder do questionamento.

Aos colegas de graduação que seguiram seus caminhos, mas sempre estão presente na pessoa que eu me tornei.

Ao amigo Daniel Graichen que esteve presente desde a elaboração do projeto, e que sempre contribuiu de forma positiva em minha formação.

Ao meu Professor de inglês, Ptolomeu Palma, da querida escola Study English.

E a minha querida família família, em especial aos meus pais amados, pelo apoio psicológico, afetivo, físico e financeiro. À ti Pai, pelo exemplo, pela confiança, por mostrar o caminho. E a ti Mãe, pelo apoio e incentivo a buscar sempre o aperfeiçoamento profissional.

Agradeço aos demais amigos e familiares por entenderem a minha caminhada e me incentivarem sempre.

“Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza, e que não há mundos novos a conquistar.”

[Humphry Davy]

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **HISTÓRIA EVOLUTIVA DOS ELEMENTOS *homo1* E *howilli2* DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS NEOTROPICAIS**

Autor: Larissa Paim Bernardo  
Orientador: Élgion Lucio da Silva Loreto  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 01 de março de 2013

Elementos transponíveis (TEs) são fragmentos de DNA que podem se mover dentro e entre genomas, causando grande impacto na evolução dos organismos. A superfamília *hAT* pertence a classe II, subclasse I dos TEs e apesar de originalmente terem sido descritos em insetos e plantas, hoje se sabe que esses elementos possuem uma ampla distribuição e são diversos em muitos grupos de organismos superiores. Estudos filogenéticos demonstram que esta superfamília é muito antiga e que sua ocorrência nesses grupos pode estar relacionada a eventos de transferência horizontal (TH). Este trabalho foi realizado com a finalidade de estimar possíveis casos de TH entre elementos *hATs*. Os elementos *homo1* e *howilli2*, descritos por Ortiz e Loreto em 2009, nas espécies *D. willistoni* e *D. mojavensis*, foram buscados nos genomas de *Drosophila* Neotropicais por meio de PCR com *primers* degenerados, e por se tratarem de elementos muito similares e descritos em espécies distantemente relacionadas, foi sugerido que esses elementos poderiam estar sendo transmitidos horizontalmente. Das 34 espécies analisadas, houve amplificação em 18, e esses elementos apresentaram uma distribuição descontínua e incongruências com a filogenia das espécies hospedeiras, o que sugere eventos de TH. Além disso, a estimativa de divergência das sequências encontradas revelou que esses elementos são ou foram ativos muito recentemente nos genomas em que foram investigados. Sendo assim, nossos resultados demonstram que esses elementos podem estar em processo de expansão nos genomas de drosofilídeos Neotropicais devido a grande quantidade de eventos de TH que foram observados.

**Palavras-chave:** Transposon. *hATs*. Evolução genômica. Drosophilídeos.



## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EVOLUTIONARY HISTORY OF ELEMENTS AND *homo1* *howilli2* SPECIES *drosophilids* NEOTROPICAL**

Autor: Larissa Paim Bernardo  
Orientador: Élgion Lucio da Silva Loreto  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 01 de março de 2013

Transposable elements (TEs) are DNA fragments that can move within and between genomes causing great impact on the evolution of organisms. The *hAT* superfamily belongs to class II, subclass I of TEs and despite having originally been described in insects and plants, it is now known that these elements have a wide distribution and are diverse in many groups of higher organisms. Phylogenetic studies show that this superfamily is very ancient and its occurrence in these groups may be related to events of horizontal transfer (HT). This work was performed in order to estimate possible cases of *hATs* elements' HT. The elements *homo1* and *howilli2* described by Ortiz and Loreto in 2009 in *D. willistoni* and *D. mojavensis* species were searched in Neotropical *Drosophila* genomes using PCR with degenerate primers and because they are very similar elements and described in distantly related species, it was suggested that these elements might be being transmitted horizontally. Amplification was detected in 18 of the 34 species analyzed and these elements showed a patch distribution and incongruities with the TEs and host species' phylogeny, suggesting possible cases of HT. In addition, the estimated divergence of sequences found showed that these elements are or recently were active in the genomes that were investigated. Thus, our results demonstrate that these elements could be in an expansion process in Neotropical *drosophilid* genomes due to the large amount of HT events observed.

**Key words:** Transposon. *hATs*. Genomic evolution. *Drosophilids*.

## SUMÁRIO

Capítulo I.....	10
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Diversidade e Utilização de Drosofilídeos em Estudos Evolutivos com Elementos Transponíveis (TEs) .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Elementos Transponíveis (TEs).....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Evolução dos TEs.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Transferência Horizontal (TH) .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Classificação .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Superfamília <i>hAT</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Elementos <i>homo1</i> e <i>howilli2</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>1.8 Objetivos.....</b>	<b>21</b>
1.8.1 Objetivo geral .....	21
1.8.2 Objetivos específicos .....	21
Capítulo II .....	22
<b>História evolutiva dos elementos <i>homo1</i> e <i>Howilli2</i> de espécies de drosofilídeos</b>	
<b>Neotropicais.....</b>	<b>22</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>23</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>23</b>
<b>Material e métodos .....</b>	<b>25</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>31</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>38</b>
<b>Referências .....</b>	<b>39</b>
Capítulo III.....	43
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>49</b>

## Capítulo I



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Diversidade e Utilização de Drosofilídeos em Estudos Evolutivos com Elementos Transponíveis (TEs)

O Brasil está no topo da lista dos países megadiversos, sendo detentor de 70% da diversidade biológica do mundo, juntamente com mais 16 países. O conceito de megadiversidade é baseado no número total de espécies de um país e no grau de endemismo ao nível da espécie e em níveis taxonômicos mais elevados, segundo dados do Centro Mundial de Monitoramento da Conservação (último acesso em 29 de abril de 2013 pelo site: <http://www.environment.gov.au/soe/2001/publications/theme-reports/biodiversity/biodiversity01-3.html>). Em um estudo recente, estimou-se que deve existir atualmente em torno de 8,7 milhões de espécies de animais no mundo (Mora *et al.*, 2011), e insetos representam cerca de 5 milhões de espécies descritas (Goston KJ, 1991). A família Drosophilidae é uma das mais de 120 famílias de insetos que compõem a Ordem Diptera, e encontra-se entre as mais diversas e amplamente distribuídas, com 4.100 espécies classificadas ao longo dos 76 gêneros (Bachli, 2011). Dentre todos os gêneros alocados nesta família, *Drosophila* é considerado o mais abundante, com cerca de 1,162 espécies segundo Bachli (2011) das quais 181 apresentam registro para o Brasil segundo Gottschalk *et al.* (2008).

Drosofilídeos vêm sendo utilizados há mais de um século como um excelente modelo para estudos genéticos e evolutivos, devido a facilidade e baixo custo de manutenção, e a descoberta de elementos transponíveis (TEs) como principais componentes genômicos do grupo (cerca de 12%) e como agentes causadores de variações morfológicas. Nas últimas décadas, os estudos com TEs tem se tornado frequentes e facilitados pela disponibilidade de genomas sequenciados desse grupo. Esses elementos parecem explicar muitas variações morfológicas em *Drosophila*, tais como a do loco *white* que afeta a cor do olho; e o elemento *P* causador da síndrome conhecida como disgenesia híbrida, que gera variações genéticas, tais como modificações no número de cerdas abdominais em *Drosophila melanogaster* (Daniels *et al.*, 1990b). Neste sentido, desde a descoberta dos TEs vários estudos vêm sendo feitos a fim de esclarecer questões relacionadas com sua influência no genoma hospedeiro utilizando espécies de *Drosophila* como modelo no entendimento de processos evolutivos (Deprá *et al.*,

2009; Feschotte e Pritham 2006). Sabe-se que em seu processo de transposição, os TEs podem promover mudanças estruturais significativas, como: rearranjos cromossômicos, modificações nos padrões epigenéticos de regulação, além da geração de variabilidade genética, novos genes e, conseqüentemente, inovações biológicas (Feschotte e Pritham, 2007). Desta maneira, é interessante saber como eles interagem e influenciam na evolução dos genomas, e a busca de evidências do envolvimento desses elementos em processos evolutivos faz-se necessária.

## 1.2 Elementos Transponíveis (TEs)

Elementos transponíveis (TEs, do inglês *Transposable Elements*) são definidos como sequências de DNA que possuem capacidade para mudar sua localização no genoma (Capy, 1998). Eles foram descobertos por Barbara McClintock em 1940 em estudos com milho, mas foram totalmente ignorados por muito tempo. Ao longo das últimas décadas eles foram atraindo a atenção de cientistas, e o aparecimento constante de novos genomas sequenciados revela que eles são os principais componentes do genoma de muitos organismos: 12% em *Drosophila*, 45% em seres humanos, 50% no milho e cerca de 90%, em algumas plantas (Flavell, 1986; SanMiguel *et al.*, 1996; Kidwell e Lish, 1997; Bennetzen, 2000; Biémont e Vieira, 2006), com apenas algumas exceções (Pritham, 2009; Wicker *et al.*, 2007; Loreto *et al.*, 2007). Na década de 80 os TEs foram redescobertos, e verificou-se que são geradores de mutações espontâneas em *Drosophila* (50% das mutações) e em milho (10% das mutações) (Finnegan, 1992, Kazazian, 1998).

Esses TEs apresentam grande variabilidade em sua estrutura, mecanismo de replicação e sequências de nucleotídeos, e essa variabilidade possibilita sua classificação em classes, subclasses, ordens, superfamílias, famílias e subfamílias de acordo com o mecanismo de transposição, estrutura molecular e grau de similaridade de suas proteínas (Wicker *et al.* 2007). Muitos TEs estão presentes no genoma como cópias autônomas completas (ou canônicas), que produzem as enzimas necessárias para sua transposição, entretanto podem ocorrer cópias não autônomas, que são elementos sem sequências de codificação da transposase, que são mobilizados por elementos autônomos. Também pode ocorrer sequências degeneradas conhecidas como relíquias (do inglês *relics*). Algumas evidências indicam que cópias completas e internamente deletadas são aquisições recentes dos genomas, enquanto os

“relics” são componentes antigos, normalmente degenerados, defectivos e até recentemente considerados imóveis.

Apesar dessa ampla diversidade de formas com que se apresentam os TEs enquanto componentes genômicos, duas características os distinguem dos demais (Hua-Van et. al., 2011; Wicker et. al., 2007): a capacidade de mobilização e auto-replicação em alguma fase de sua existência. Dessa forma a evolução desses elementos ocorre de forma independente nos genomas promovendo alterações competitivas entre os TEs e o genoma e entre cópias de TEs que habitam um mesmo genoma. O resultado dessas interações pode promover competições entre cópias de TEs. Aqueles que são capazes de produzir mais cópias possuem melhores chances de invadir novos genomas em comparação com aqueles que raramente sofrem duplicação (Hua-Van et. al., 2011).

### **1.3 Evolução dos TEs**

Em seu processo de transposição os TEs podem promover mudanças estruturais significativas, como: rearranjos cromossômicos, modificações nos padrões epigenéticos de regulação, além da geração de variabilidade genética, participam na formação de novos genes e, conseqüentemente, inovações biológicas (Feschotte e Phrithan, 2007). E essas modificações causadas por TEs nos genomas exercem influência na evolução dos hospedeiros, sendo eles, portanto uma fonte de variabilidade genética. Mas para entendermos como esses processos ocorrem devemos compreender um pouco da dinâmica, origem, regulação e como suas sequências são mantidas ou eliminadas do genoma hospedeiro (Figura 1).

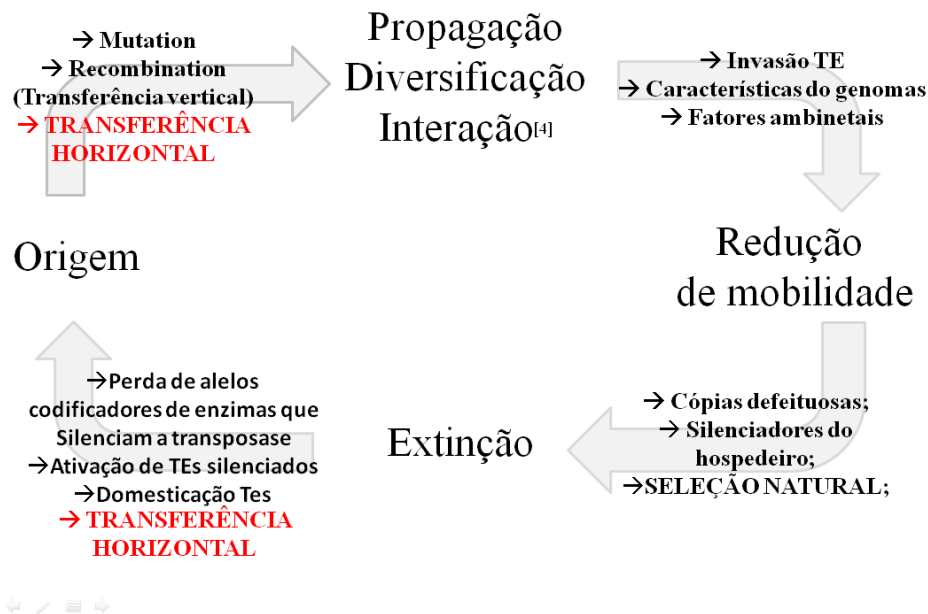


Figura 1 – Representação esquemática da dinâmica evolutiva dos TEs.

Silva e *et al.* (2004) e Loreto *et al.* (2008) descrevem alguns eventos de origem de TEs nos genomas, tais como por eventos de mutação; recombinação de sequências presentes no genoma ancestral; transferência vertical (TV), ou seja, herança genética e/ou ancestralidade; ou ainda por transferência horizontal (TH), que é a capacidade de invadir genomas sem ser por ancestralidade. Se após a origem esses elementos não forem eliminados rapidamente, deve ocorrer uma rápida proliferação de cópias do elemento no genoma, e esse aumento no número de cópias pode evitar que eles sejam eliminados por processos naturais. Além disso, eles podem se diversificar e todas as interações que se estabelecem posteriormente ao surgimento são fundamentais para a sobrevivência tanto dos TEs como para o hospedeiro (Capy *et al.*, 1998). A colonização e como esses elementos afetam os genomas dependem de o quanto o elemento é invasivo, ou seja, do quanto eles interagem e afetam os genomas hospedeiros. Se este elemento possui uma capacidade de transposição elevada, ele pode vir a aumentar o número de cópias, podendo dificultar os mecanismos de silenciamento dos hospedeiros, mas o sucesso da invasão depende das características do genoma hospedeiro, dos fatores ambientais e a interação de todos esses fatores (Pinsker *et al.*, 2001). Portanto, o sucesso da colonização é extremamente influenciada pela capacidade de mobilização, e esta se torna vital, pois com o passar do tempo cópias imóveis podem acumular mutações favorecendo o estabelecimento de mecanismos epigenéticos de silenciamento por parte do

hospedeiro podendo causar a eliminação das sequências por ação da seleção natural (Almeida e Carareto, 2005), ou, observando de forma mais ampla, esses processos ocorrendo durante milhões de anos são marcados por eventos que levam a geração de cópias não autônomas ou degradação das sequências (Ortiz *et al.*, 2010).

Diversos autores descrevem eventos que impedem a degradação dos TEs no genoma hospedeiro. Por exemplo, a ocorrência de eventos que promovem a perda de alelos codificadores das proteínas repressoras da transposição, que são produzidas pelo hospedeiro (Pelisson *et al.*, 1994); ativação de TEs que foram silenciados anteriormente por eventos de recombinação ectópica entre elementos (Jordan e McDonald, 1998); a domesticação dos elementos de forma que venham a desempenhar alguma função que beneficie a espécie hospedeira (originando os denominados neogenes) (Pinsker *et al.*, 2001); ou ainda pode ocorrer eventos de transferência horizontal (TH), de modo que sequências de TEs invadam genomas que ainda não possui mecanismo de defesa, evitando que sofram inativação vertical (Flavell *et al.*, 1999).

#### **1.4 Transferência Horizontal (TH)**

A TV de material genético por meio de reprodução entre organismos aparentados é um processo comum e amplamente aceito pela comunidade científica. No entanto, estudos recentes sugerem que, além da TV, os organismos também vêm adquirindo informação genética por meio de TH (Keeling e Palmer 2008; Schaack *et al.*, 2010; Wallau *et al.*, 2012). TH é um evento comum entre espécies bacterianas (Gogarten Townsend e 2005), entretanto é um fenômeno raro em eucariontes multicelulares, mas dos muitos casos relatados, os TEs vêm sendo apontados como os principais responsáveis.

Descobertas crescentes de ocorrência de TEs em genomas eucariontes, e a abundância deles nos genomas vêm sendo relacionada a crescente descoberta de casos de TH, visto que esses eventos são essenciais e muito comuns na dinâmica evolutiva de TEs, participando diretamente da origem e da colonização desses elementos nos genomas, e evitando que os eles sejam eliminados por seleção natural e/ou deriva genética (Le Rouzic e Capy 2005; Venner *et al.*, 2009; Hua-Van *et al.*, 2011, Schaack *et al.*, 2010; Pinsker *et al.*, 2001; Wallau *et al.*, 2012). Devemos notar que para a espécie hospedeira, a invasão dos TEs nos genomas pode ser prejudicial ou benéfica: Prejudicial quando é capaz de gerar mutações, ou quando esses



TEs apresentam uma alta taxa de transposição, de forma que o número de cópias aumenta rapidamente no genoma hospedeiro e ocorre a geração de rearranjos cromossômicos ou mutações deletérias ao hospedeiro (Le Rouzic e Capy, 2005, McVean 2010); Benéfica quando a invasão possibilita a geração de variações genéticas ao acaso, como um embaralhar de genes que pode levar ao o desenvolvimento de novas funções (Pace *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010).

Identificar casos de TH é difícil, pois é necessário considerar todas as características intrínsecas do ciclo de vida de TE (Cummings 1994; Capy *et al.*, 1998; Wallau *et al.*, 2012). Entretanto, desde que TH foi descrita pela primeira vez, muitos autores têm sugerido diferentes abordagens para inferir ocorrência desses eventos, tais como: condições mínimas de sobreposição geográfica (atual ou passada), temporal e ecológica entre as espécies doadoras e receptoras de um TE (Loreto *et al.*, 2008); alta similaridade de sequências dos elementos de espécies pouco relacionadas (Daniels *et al.*, 1990a, b; Robertson and Lampe, 1995; Brunet *et al.*, 1999); incongruência entre a filogenia do TE e da espécie hospedeira (Silva *et al.*, 2004, Robertson and Lampe, 1995; Terzian *et al.*, 2000; Almeida e Carareto, 2005); distribuição irregular de um TE em um grupo de espécies (Daniels *et al.*, 1990a, b; Loreto *et al.*, 2001); e a comparação das taxas de evolução neutra das sequências dos TEs e dos genes hospedeiros (Silva e Kidwell 2000; Lerat *et al.*, 2000; Loreto *et al.*, 2008; Wallau *et al.*, 2012).

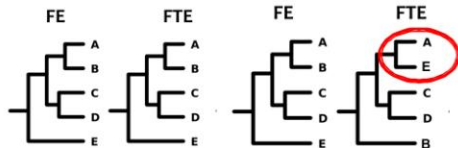
Para discernir casos de TH e fases naturais do ciclo de vida dos TEs, Wallau e colaboradores (Wallau *et al.*, 2012) sugeriram um teste de hipóteses que compara as taxas de substituição sinônimas das sequências de TEs e de genes hospedeiros, bem como observa o viés de códons (*codon usage bias* – CUB) dos TEs e dos genes das espécies hospedeiras (Figura2).

## Observação

## Teste de hipótese

Comparando o Ds entre a sequência do TE e do genes hospedeiro (GE). E/ou comparação do codon usage bias (CUB).

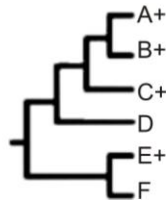
Incongruência entre a filogenia do TE e da espécie hospedeira.



Alta similaridade entre as sequências de TEs de grupos de espécies distantemente relacionadas.

TE de *Drosophila mojavensis*  
(Subgênero *Repleta*)  
=  
TE de *Drosophila willistoni* (Subgênero  
*Sophophora*)

Distribuição irregular de um TE em grupos de espécies.



Ds (TE) < Ds (GE)  
e/ou  
CUB (TE) ≠ CUB (GE)

TH ✓

X

Ds (TE) ≥ Ds Gene (E)  
e/ou  
CUB (TE) = CUB (GE)

TV ✓

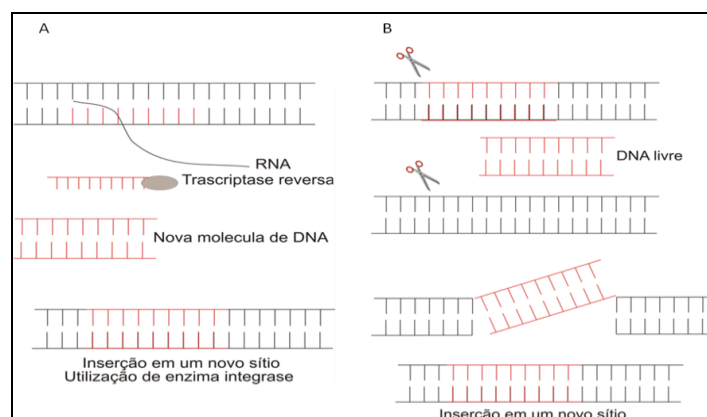
Figura 2 – Uma representação esquemática de um teste de hipótese para discernir entre transferência horizontal e as fases naturais do ciclo de vida de elementos transponíveis. Siglas – TE: elemento transponível; FE: filogenia da espécie; FTE: filogenia do elemento transponível; Ds: taxa de substituições sinônimas; GE: gene da espécie hospedeira; CUB: *codon usage bias*; TH: transferência horizontal; TV: transferência vertical.

### 1.5 Classificação

Em 1989, Finnegan propôs o primeiro sistema de classificação de elementos transponíveis, que distinguiu duas grandes classes por meio de seu intermediário de transposição: RNA (elementos da classe I ou retrotransposons) e DNA (elementos da classe II ou transposons), e hoje esses termos ainda são utilizados para distinguir as classes de TEs. Capy em 1998 em seu livro *Dynamics and Evolution of Transposable Elements* descreve a classificação dos TEs em nível de classe, subclasse, superfamília, família e subfamília. Ele distinguiu as subclasses através da estrutura molecular dos TEs – presença/ausência de

domínios e/ou assinaturas; superfamílias pela similaridade de seus motivos ou assinaturas; famílias como elementos que possuem 30-50% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos; e subfamílias como elementos que possuem 50-70% de similaridade das sequências de aminoácidos. Os elementos MITEs foram classificado separadamente por apresentarem mecanismo de transposição desconhecido.

Em 2007, Wicker e colaboradores propuseram um sistema unificado de classificação dos TEs, onde alguns níveis de classificação foram mantidos (subclasse, superfamília, família, subfamília), porém com modificações de seus critérios de definição, e outros foram adicionados (ordem - leva em consideração o mecanismo de inserção, organização geral e enzimologia). O autor distingue duas classes: Classe I possuem um mecanismo de mobilização que utiliza duas enzimas transcritas pelos elementos: transcriptase reversa (RT, do inglês Reverse Transcriptase) e integrase (IN). O RNA mensageiro (mRNA) do TE é transcrito pela maquinaria de transcrição do hospedeiro, após, o mRNA é revertido para DNA pela enzima transcriptase reversa e, em seguida, o fragmento de DNA é inserido em outra região do genoma pela enzima integrase (Figura 3). Já nos da Classe II somente uma enzima chamada transposase retira o elemento de uma região do genoma e o insere em outra. Os TEs da classe II são subdivididos em duas subclasses que distinguem elementos que copiam-se e inserem-se em outro sítio (copia-e-cola), dos que recortam-se e inserem novas cópias em outros sítios (recorta-e-cola). Também reflete o número de cadeias de DNA que são cortadas durante a transposição do TE (Wicker et.al., 2007). Apesar das diferenças nos mecanismos de transposição, a integrase de alguns elementos de RNA e a transposase de alguns elementos de DNA provavelmente têm uma origem comum (Capy *et al.*, 1998).



**Figura 3 – Mecanismo de transposição dos elementos transponíveis. A) mecanismos de transposição dos elementos da classe I. B) mecanismos de transposição dos elementos da Classe II. Tesoura representa a enzima transposase. Figura modificada de Almeida e Carareto, 2005.**

## 1.6 Superfamília *hAT*

A superfamília *hAT* pertence a classe II, subclasse I dos TEs e seu nome originou-se dos iniciais das três primeiras famílias de elementos descritos que compuseram a superfamília: *hobo* (Insetos), *Ac* e *Tam3* (em plantas) (Warren *et al.* 1994). Apesar de originalmente terem sido descritos em insetos e plantas, respectivamente, hoje sabe-se que esses elementos possuem uma ampla distribuição e diversidade em diversos grupos de organismos, tais como fungos (Kempken e Kück 1996), nemátodes (Bigot *et al.*, 1996), peixes (Koga *et al.*, 1996) e humanos (Esposito *et al.*, 1999). Todos possuem como características comuns da superfamília geração de um sítio de duplicação de 8pb (TSDs – do inglês Target Site Duplications) decorrente do processo de transposição; presença de uma curta repetição terminal invertida (TIRs – do inglês Terminal Inverted Repeats) de aproximadamente 5-27pb; e similaridade de sequências limitada que pode ser observada principalmente em algumas sequências de aminoácidos que são motivos da transposase (Capy *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 2010).

Os resultados de estudos filogenéticos realizados a partir de análises de sequências de elementos *hATs* sugerem que essa superfamília é muito antiga e sua ocorrência em grupos de organismos superiores (plantas, animais e fungos) pode estar relacionada a eventos de transferência horizontal (Rubin *et al.*, 2001).

Recentemente análises dos domínios conservados de vários elementos dessa superfamília possibilitaram o agrupamento de seus membros em duas grandes famílias: *Ac* e *Buster* (Arensburger *et al.*, 2011).

Ortiz e Loreto em 2009, através de análises *in silico* dos 12 genomas de *Drosophila* sequenciados, identificaram 37 novos elementos *hATs*, que foram descritos e agrupados em quatro diferentes famílias: *Homo*, *Herves*, *Hobo* e *Hopso*, e muitos desses foram classificados como potencialmente ativos. Além da descrição de diversos elementos, esse estudo levantou questões interessantes sobre o relacionamento filogenético de vários elementos descritos, pois cópias encontradas nos genomas de espécies não aparentadas foram altamente similares e seus agrupamentos não refletiam a história evolutiva de seus hospedeiros. Foi o caso dos elementos *hosimery* (Deprá *et al.*, 2010), *harrow* (Mota *et al.*, 2010) e dos elementos *homo1* e *howilli2* investigados nesse estudo. A análise dos elementos *harrow* e *hosimery* revelou que esses elementos são ou foram ativos recentemente, bem como estão em processo de colonização dos genomas devido a grande quantidade de eventos de TH observados.

## 1.7 Elementos *homo1* e *howilli2*

Os elementos *homo1* e *howilli2* foram descritos por Ortiz e Loreto em 2009 nos genomas de *D. mojavensis* e em *D. willistoni*, respectivamente, e assim como os elementos *harrow* (Mota *et al.*, 2010) e *hosimery* (Deprá *et al.*, 2010), eles também são muito similares, ocorrem em espécies de subgêneros distantemente relacionadas e podem estar em processo de expansão de número de cópias nos genomas de várias espécies de *Drosophila*. Foram 16 cópias descritas no genoma de *D. mojavensis* e sete em *D. willistoni*, dois potencialmente ativos nos genomas de cada espécie (Ortiz *et al.*, 2010). Esses elementos variam quanto ao tamanho de suas sequências, o tamanho de suas TIRs e o tamanho de seus TSDs (Figura 4). Entretanto o elemento completo de *homo1* apresenta aproximadamente: 2,817pb de tamanho, TIRs de 13pb, TSDs de 8pb e codifica uma proteína com 605 aminoácidos; e *howilli2* apresenta aproximadamente: 2,847pb de tamanho, TIRs de 13pb, TSDs de 8pb e codifica uma proteína com 566 aminoácidos. Ambos os elementos são potencialmente ativos nas espécies de *D. mojavensis* e *D. willistoni* (Ortiz e Loreto, 2009).

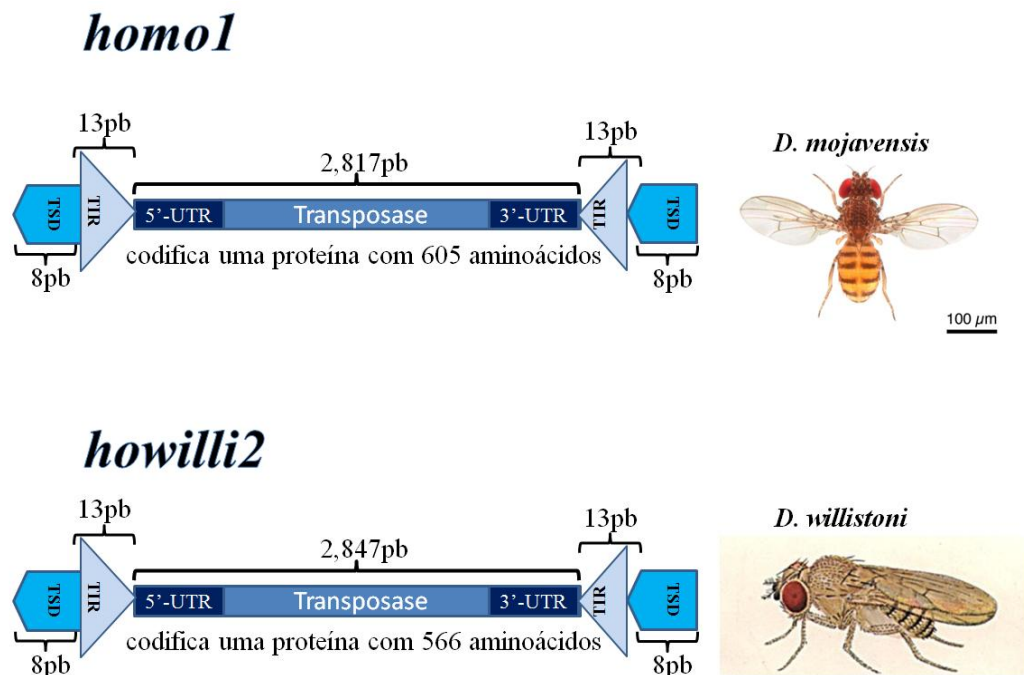


Figura 4 – Representação esquemática dos elementos *homo1* e *howilli2*.

Como esses elementos são muito similares e foram descritos em espécies distantemente relacionadas, a questão é: Como será a distribuição desses elementos nas espécies Neotropicais? Esses elementos estão sendo transferidos verticalmente ou horizontalmente?

## 1.8 Objetivos

### 1.8.1 Objetivo geral

Analisar a história evolutiva dos elementos *homo1* e *howilli2* em espécies de *Drosophila* Neotropicais.

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Investigar sequências homólogas dos elementos *homo1* e *Howilli2* em genomas de diferentes espécies de *Drosophila* Neotropicais.
- Investigar transferência horizontal através de análise filogenética dos elementos *homo1* e *howilli2* em espécies de *Drosophila* Neotropicais.

## Capítulo II

### **História evolutiva dos elementos *homo1* e *Howilli2* de espécies de drosofilídeos Neotropicais**

---

---

## Abstract

Transposable elements (TEs), by their capacity of moving and inducing mutations in the genome, are considered important drivers of species evolution. Elements *homo1* and *howilli2* described in *D. mojavensis* and *D. wilstoni* distantly related species, are highly similar and these aspects are indicative of horizontal transfer (HT). A search for homologous sequences was performed by PCR in 36 Neotropical species of *Drosophila*, and we observed a patch distribution of these elements between species groups. Subsequently, a phylogenetic analysis revealed the incongruence between the phylogenies of the elements and species. The divergence estimated revealed that these elements invaded the species genome recently. These results suggest that these elements are or have been active recently, as well as its distribution in the groups of species can be explained by events of HT.

Key Words: hATs elements, vertical transfer, horizontal transfer, Neotropical, *Drosophila*, *Drosophilidae*

## Introdução

Elementos transponíveis (TEs, do inglês *Transposable Elements*) são definidos como sequências de DNA que possuem capacidade para mudar sua localização no genoma (Capy, 1998). Com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA, sabe-se hoje que a maioria dos organismos possui TEs em seus genomas, e que a atividade deles exerce influência na evolução dos genomas hospedeiros (Biémont e Vieira, 2006). Em seu processo de transposição TEs podem promover mudanças estruturais significativas, como: rearranjos cromossômicos, modificações nos padrões epigenéticos de regulação, além da geração de variabilidade genética, novos genes e, conseqüentemente, inovações biológicas (Feschotte e Phrithan, 2007). Sendo assim, os TEs representam uma fonte de variabilidade genética, pois atuam diretamente na evolução dos genomas.

A superfamília *hAT* pertence a classe II, subclasse I dos TEs. Essa família é amplamente distribuída ocorrendo em fungos (Kempken e Kück 1996), Nematodes (Bigot et al., 1999), peixes (Koga et al., 1996), humanos (Esposito et al., 1999), e em insetos, é conhecida a ocorrência do elemento *hobo* em *Drosophila melanogaster* (Calvi



*et al.*, 1991), *Hermes* em *Musca domestica* (Warren *et al.*, 1994), *Homer* em *Bactrocera tryoni* (Pinkerton *et al.*, 1999), *hermit* em *Lucilia cuprina* (Coates *et al.*, 1996), *hopper* em *Bactrocera dorsalis* (Handler e Gomez, 1997), e *Herves* em *Anopheles gambiae* (Arensburger *et al.*, 2005). Essa ampla distribuição em grupos de organismos superiores pode estar relacionada a eventos de transferência horizontal, e estudos filogenéticos realizados a partir de análises de sequências de elementos *hATs* sugerem que essa superfamília é muito antiga (Rubin *et al.*, 2001), mas pouco se sabe sobre evolução e interação de elementos *hATs* com os genomas hospedeiros. Recentemente Arensburger e colaboradores (Arensburger *et al.*, 2011) analisaram domínios conservados de vários elementos dessa superfamília agrupando-os em duas grandes famílias: *Ac* e *Buster*, mas anteriormente Ortiz e Loreto (2009) já haviam analisado nos genomas sequenciados de *Drosophila* uma ampla diversidade de elementos *hATs*. Nas análises *in silico* identificaram na época 37 novos elementos, que foram descritos, analisados e puderam ser agrupados em quatro diferentes famílias: *Homo*, *Herves*, *Hobo* e *Hopso*. Em análises mais detalhadas desses elementos descreveram várias sequências novas e demonstraram regiões muito similares utilizadas para classificação (Ortiz *et al.*, 2010), conforme metodologia adotada por Wicker *et al.* (2007) para classificar famílias por similaridade de regiões de seus domínios conservados. Isso mostra que análises detalhadas de e uma observação mais acurada dos TEs em grupos de organismos distintos possibilita uma classificação mais precisa em nível de família.

Ainda nas análises filogenéticas realizadas por Ortiz e Loreto (2009) questões interessantes sobre o relacionamento filogenético de vários dos elementos descritos foram levantadas, pois algumas sequências se mostraram altamente similares e seus agrupamentos não refletiam a história evolutiva de seus hospedeiros fato que é bastante indicativo de eventos de transferência horizontal (TH). Estudos posteriores demonstraram que elementos com essas características, *hosimery* (Deprá *et al.*, 2010) e *harrow* (Mota *et al.*, 2010), estavam em processo de colonização recente dos genomas de várias espécies de *Drosophila* Neotropical devido ao grande número de eventos de TH observados, e que também poderiam ser ou ter sido ativos recentemente. Os elementos *homo1* e *howilli2* que foram identificados no genoma de *D. mojavensis* e *D. willistoni*, respectivamente podem estar em processo de expansão de número de cópias nos genomas hospedeiros, e ambos os elementos são potencialmente ativos nas espécies de *D. mojavensis* e *D. willistoni* (Ortiz e Loreto, 2009). Portanto, a incongruência entre as filogenias das espécies *D. mojavensis* e *D. willistoni* e seus TEs *homo1* e *howilli2*,

além da alta similaridade genética entre estes transposons, sugerem a ocorrência de TH deste elemento entre estas espécies (Ortiz e Loreto, 2009). Por tratar-se de duas espécies Neotropicais com sobreposição de distribuição geográfica, hipotetizou-se que este elemento pode ser mais amplamente distribuído em espécies de drosofilídeos desta região. O objetivo desse estudo é investigar a história evolutiva desses elementos em espécies de *Drosophila* Neotropicais, buscando sequências homólogas em genomas de diferentes espécies do gênero, analisando as características das sequências encontradas e avaliando a possibilidade de TH através do estudo filogenético desses elementos. Dessa forma o presente trabalho contribui para elucidar as questões relacionadas à evolução dos elementos *hATs*, bem como ampliar a visão de distribuição desses elementos em drosofilídeos Neotropicais.

## Material e métodos

### Espécies utilizadas

Sequências homólogas dos elementos *homo1* e *howilli2* foram investigadas nos genomas de espécies de diferentes grupos de drosofilídeos Neotropicais e são mostradas na Tabela 1. Um total de 36 espécies foi analisado, 25 do subgênero *Drosophila* e nove do subgênero *Sophophora*. São elas do subgênero *Drosophila*: *D. canalinae* (grupo canalinea); *D. cardinoideis* e *D. neocardini* (grupo cardini); *D. camargoi* (grupo dreyfusi); *D. incompta* e *D. cestri* (grupo flavopilosa); *D. funebris* (grupo funebris); *D. maculifrons*, *D. guaru*; *D. griseolinneata* e *D. ornatifrons* (grupo guarani); *D. immigrans* (grupo immigrans); *D. gasici*, *D. gaucha* e *D. pavani* (grupo mesophragmatica); *D. pallidipennis* ( grupo pallidipennis); *D. buzzati*, *D. hydei* e *D. mercatorum* ( grupo repleta); *D. robusta* (grupo robusta); *D. paraguayensis* e *D. bandeirantium* (grupo tripunctata); *D. virilis* (grupo virilis). E do subgênero *Sophophora*: *D. sturtevant* (grupo saltans); *D. simulans* e *D. ananassae* (grupo melanogaster); *D. capricorni*, *D. nebulosa*, *D. sucinea*, *D. equinoxialis*, *D. willistoni* e *D. paulistorum* ( grupo willistoni). Os elementos também foram investigados em espécies do subgênero *Zaprionus* (*Zaprionus* sp.) e *Zigotrica* (*Zigotrica vitimaculosa*).

Tabela 1 – Espécies utilizadas para investigar a ocorrência dos elementos *homo1* e *howilli2*. Sinal (+) indica que houve amplificação de uma banda de tamanho esperado dos elementos e/ou houve confirmação das sequências como sendo dos elementos investigados. Sinal (-) indica que não houve amplificação e/ou não foram confirmados como elementos investigados.

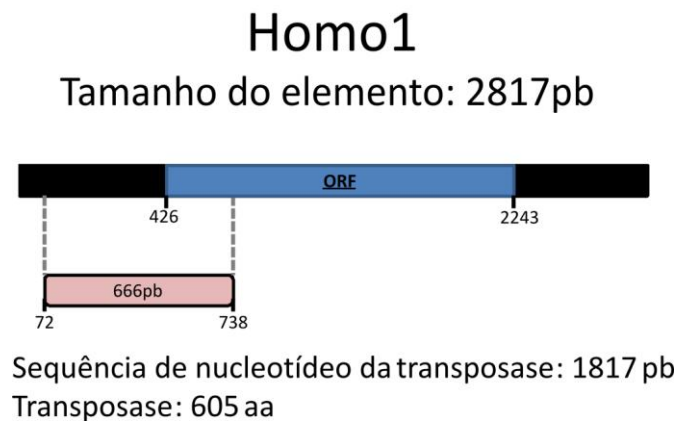
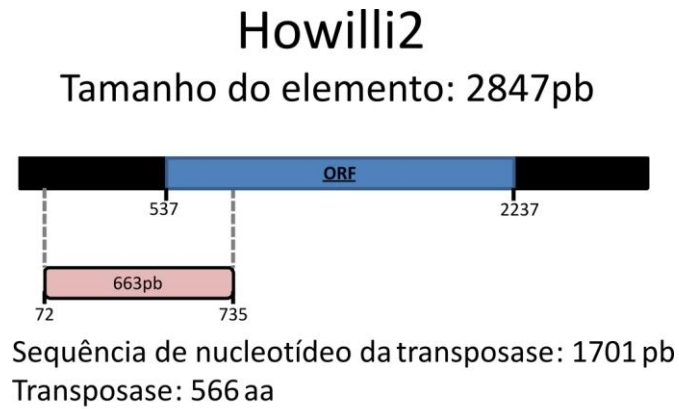
Subgênero	Grupo	Subgrupo	Espécie	Amplificação	Sequenciamento
Drosophila	Canalina	-	<i>D. canalinae</i>	-	-
	Cardini	cardini	<i>D. cardinoideis</i>	+	+
			<i>D. neocardini</i>	+	+
	Dreyfusi	-	<i>D. camargoi</i>	-	-
	Flavopilosa	nesiota	<i>D. incompta</i>	-	-
		-	<i>D. cestri</i>	-	-
	Funebris	funnebris	<i>D. funnebris</i>	-	-
		guaramuru	<i>D. maculifrons</i>	-	-
	Guarani	guarani	<i>D. guaru</i>	+	+
			<i>D. griseolineata</i>	+	+
			<i>D. ornatifrons</i>	+	+
	Immigrans	-	<i>D. immigrans</i>	+	-
			<i>D. gasici</i>	-	-
	Mesophragmatica	mesopragmatica	<i>D. gaucha</i>	+	+
			<i>D. pavani</i>	+	+
	Pallidipennis	-	<i>D. pallidipennis</i>	-	-
		mulleri	<i>D. buzzatii</i>	+	+
	Repleta	hydei	<i>D. hydei</i>	+	-
		mercatorum	<i>D. mercatorum</i>	-	-
	Robusta	rosusta	<i>D. robusta</i>	+	-
Tripunctata	II	<i>D. paraguayensis</i>	-	-	
	III	<i>D. bandeirantium</i>	-	-	
Virilis	virilis	<i>D. virilis</i>	-	-	

	Saltans	sturtevant	<i>D. sturtevanti</i>	+	+
	Melanogaster	melanogaster	<i>D. simulans</i>	-	-
		ananassae	<i>D. ananassae</i>	+	-
Sophophora			<i>D. capricorni</i>	+	+
		bocainensis	<i>D. nebulosa</i>	+	-
	Willistoni		<i>D. sucinea</i>	+	+
				<i>D. equinoxialis</i>	+
		willistoni	<i>D. willistoni</i>	+	+
			<i>D. paulistorum</i>	+	+

## Extrações de DNA, PCRs e sequenciamento

O DNA genômico de cada linhagem foi extraído de aproximadamente 20 moscas adultas de acordo com Oliveira *et al.* (2009). Para a realização das buscas por sequências homólogas foi realizada uma *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizando *primers* desenhados com o software Oligo 4.1 (Rychlik, 1992) baseado nas sequências de *homo1* e *howilli2* descritas por Ortiz e Loreto (2009), cujas sequências correspondentes são: *forward* - 5' CAW CAC YGG YTC AGC AAA TCA T e *reverse* - 3'GCC GAC AAT CYT GAA CYA CCC A. Os *primers* são degenerados e amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb na região indicada na Figura 1. A reação de PCR foi realizada com aproximadamente 10ng de DNA, 1U Taq polymerase, 2 µl ml 10X tampão de reação fornecido pelo fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) 0.25mM de cada nucleotídeo, 20 pmol de cada primer e 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, e uma temperatura de anelamento (T<sub>m</sub>) dos *primers* de aproximadamente 57°C. Os produtos de PCR foram clonados através do kit TA Cloning (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante. Posteriormente, células de *Escherichia coli* (Invitrogen Shot® TOP10 Chemically Competent) foram transformadas por choque térmico e o DNA plasmidial das possíveis colônias recombinantes foram recuperadas segundo protocolo descritos em Sambrook *et al.* (1989). Os clones foram sequenciados a partir dos plasmídeos purificados com polietileno glicol (PEG) 13%, NaCl 1,6 M em sequenciador automático MegaBace 500. A reação de terminação de cadeia foi implementada usando o kit DYEnamic ET® (GE Healthcare) com os *primers* específicos.

Nas amostras em que não houve amplificação positiva dos elementos investigados, os DNAs foram submetidos a uma PCR utilizando como *loci* alvo hunchback – HB. As condições de PCR e os oligonucleotídeos utilizados são descritos por Mota *et al.* (2008) e apresentaram amplificação positiva, o que demonstra a qualidade dos DNAs utilizados.



**Figura 1 – Informações referentes a região de amplificação dos *primers*. (região em rosa).**

### Southern Blot

Um *Southern blot* foi realizado com amostras de produtos de PCR das espécies em que não houve sinal de amplificação, ou que o sinal foi fraco de mais e não possibilitou a clonagem. Este procedimento fez-se necessário para que fosse confirmada a ausência do elemento nessas espécies. As amostras de PCR foram transferidas para a membrana que foi hibridizada com a sonda concentrada em aproximadamente 20ng/ul de plasmídeo de um dos elementos *hATs* clonados. A detecção de sinal de hibridização foi realizada conforme protocolo de fabricante do Kit Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling e Detection System.

## Análise filogenética

As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW 2.0.10 (Thompson *et al.*, 1994). A reconstrução filogenética utilizou o modelo *Hasegawa-Kishano-Yano* com correção gama (HKY + G) selecionado por meio do teste AIC (Akaike 1974) implementado com o auxílio do programa jModelTest 2.1 (Posada e Crandall, 1998). Dois métodos de inferência filogenética foram utilizados neste trabalho: análise de Máxima Verossimilhança (ML) realizada através dos programas Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando 1000 réplicas de Bootstrap; e a análise Bayesiana (BA), implementada com o programa MrBayes 3.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), foi conduzida com 1.000.000 gerações e árvores salvas a cada 1.000 gerações. A probabilidade posterior de cada um dos agrupamentos foi avaliada (Hall, 2001). Nas análises de divergência, as sequências de TEs das espécies foram agrupadas par a par para realizar uma análise de *p*-distância utilizando o programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011).

## Estimativas de tempo de divergência entre os TEs

Para estimar o tempo de ocorrência de eventos de TH, foi empregada a equação proposta por Graur e Li (2000):  $T = k/2r$ , em que  $T$  = tempo de divergência entre TEs;  $k = dS$  e  $r = 0.016$ , é a taxa evolutiva, ou seja, número de substituições por sítio por milhão de anos - MA. O valor de “*r*” foi proposto por Sharp e Li (1989). Entretanto, como as sequências clonadas neste trabalho não correspondem a regiões codificadoras, ao invés de utilizar os valores de  $dS$ , utilizou-se distância entre sequências de TE. O valor de  $r=0.016$  também foi adotado, visto que sequências de regiões que não codificam uma transposase supostamente estão sob efeito de seleção neutra.

Para estimar o tempo de divergência dos grupos resultantes da filogenia, foi utilizado a média de divergência dos elementos que formaram grupos.

## Inferência de TH

A inferência de casos de TH foi feita com base em três aspectos: (1) alta similaridade entre TEs que ocorrem em espécies distantemente relacionadas (Daniels *et al.*, 1990a, b; Robertson e Lampe, 1995; Brunet *et al.*, 1999); (2) incongruência entre a filogenia dos TEs e das espécies hospedeiras (Robertson e Lampe, 1995; Terzian *et al.*, 2000; Almeida e Carareto, 2005); (3) ocorrência descontínua de TEs em grupos de espécies (Daniels *et al.*, 1990a, b; Arca e Savakis, 2000; Loreto *et al.*, 2001);

## Resultados

Detecção e distribuição dos elementos *homo1* e *howilli2* nas espécies analisadas

Das 34 espécies analisadas houve amplificação positiva em 18: *D. cardinoideis*, *D. neocardini* (grupo cardini); *D. guaru*; *D. griseolinneata* e *D. ornatifrons* (grupo guarani); *D. gaucha* e *D. pavani* (grupo mesophragmatica); *D. buzzati* (grupo repleta); *D. sturtevant* (grupo saltans); *D. capricorni*, *D. sucinea*, *D. equinoxialis*, *D. willistoni* e *D. paulistorum* ( grupo willistoni). Fragmentos de cerca de 600 pb foram amplificados nessas espécies. Buscou-se a similaridade das sequências obtidas por BLASTn nos bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e no *Genetic Information Research Institute – GIRI* no banco de dados de transposon *Rapbase Update* (<http://www.girinst.org/>). Não encontramos similaridade com elementos *hATs* nas sequências obtidas nas espécies *D. immigrans* (grupo immigrans), *D. hydei* (grupo repleta), *D. robusta* (grupo robusta), *D. annanasseae* (grupo melanogaster) e *D. nebulosa* (grupo willistoni). Essas amplificações inespecíficas podem ser consequência da sequência dos *primers* ser degenerada. Então, para confirmação da ausência dos elementos *homo1* e *howilli2* nas espécies amostradas foi realizado um *Southern blot* e o resultado demonstrou de maneira satisfatória a ausência dos elementos *homo1* e *howilli2* nessas espécies e nas que apresentaram sinal fraco de amplificação Tabela 1.

Os resultados obtidos demonstram uma distribuição irregular dos elementos nas espécies do subgênero *Drosophila* e *Sophophora* (Tabela 1, figura 2). A análise de distância das sequências de *hATs* investigadas demonstrou uma alta similaridade entre os elementos encontrados em espécies distantemente relacionadas (Tabela 1 do material suplementar).



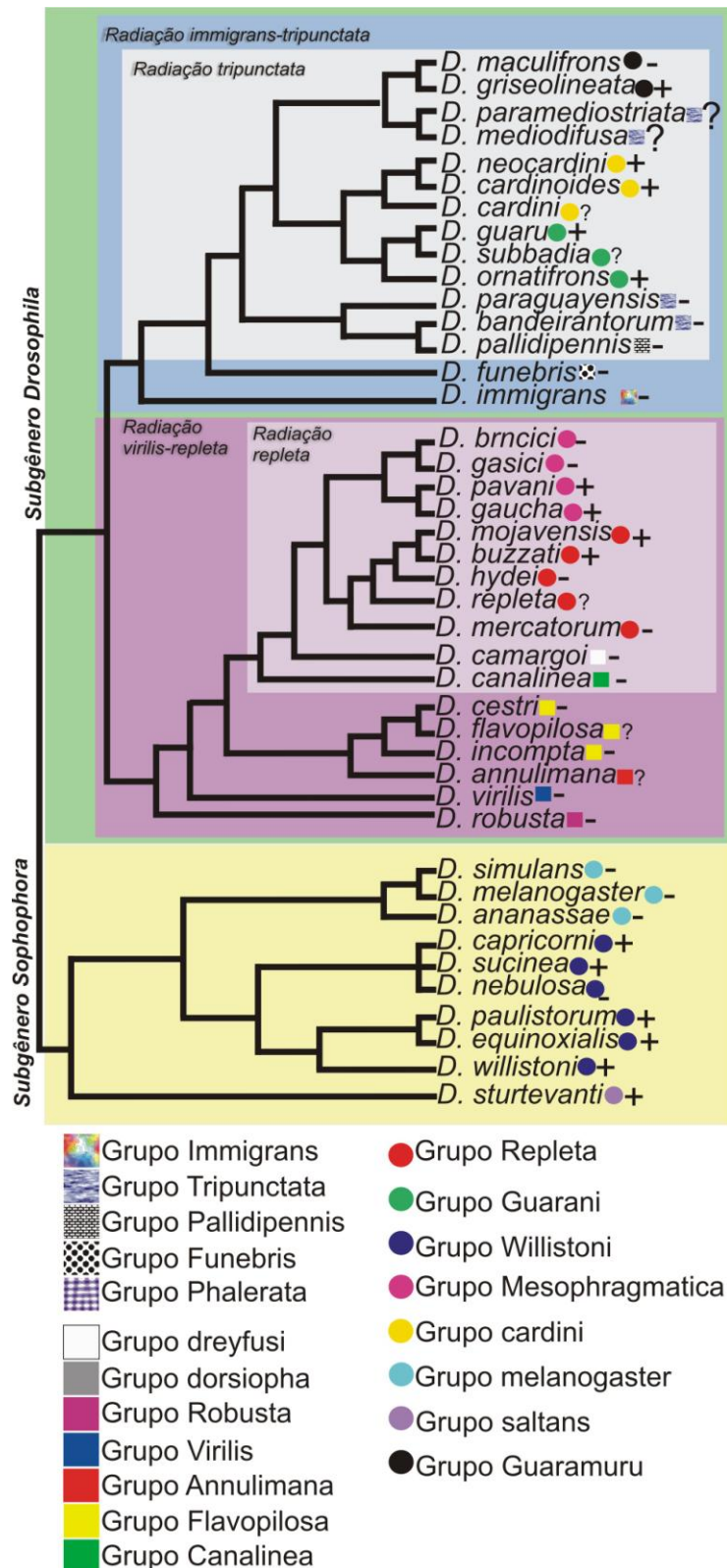


Figura 2 – Filogenia das espécies de *Drosophila* Neotropicais que foram investigadas neste trabalho. Círculos e quadrados representam o grupo cujas espécies pertencem e o sinal positivo (+) e negativo (-) representa, respectivamente, presença ou ausência dos elementos investigados nos genomas das espécies investigadas (Modificado de Robe *et al.*, 2010)

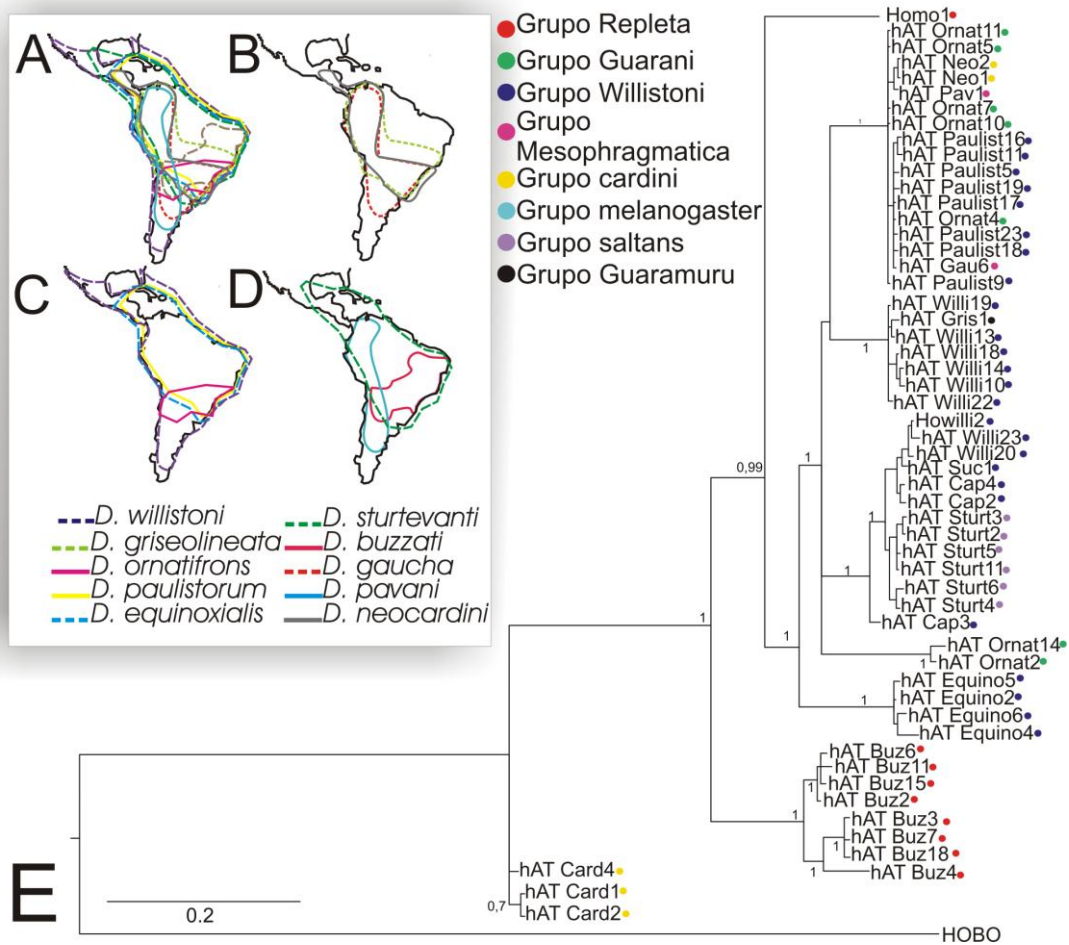
### Análise evolutiva

As sequências obtidas foram alinhadas e cerca de 600 nucleotídeos foram usados para construir uma filogenia com as 52 sequências de clones obtidos neste trabalho, juntamente com as sequências *homo1* e *howilli2* descritas por Ortiz e Loreto (2009) e a de *hobo* descrita por Streck, *et al.* (1986) que foi utilizada como grupo externo.

Entre os dois métodos filogenéticos de inferência utilizados, a AB apresentou significância na formação de praticamente todos os grupos, por isso a filogenia resultante dessa análise foi a escolhida neste trabalho como sendo a que melhor representa as relações filogenéticas dos TEs analisados. A MV apresentou valores de *bootstrap* baixos em quase todos os grupos formados, mesmo assim a topologia resultante foi muito semelhante à encontrada por meio de AB.

O resultado da análise filogenética foi ilustrado na Figura 3, E. Podemos perceber que as relações dos TEs das espécies *D. cardinoides* (*grupo cardini*), não ficaram bem resolvidas. As sequências dos elementos dessas espécies apresentam regiões com grandes deleções, o que pode ter contribuído para esse resultado.

Em geral, os valores de divergência de todas as sequências foram muito baixos e todos os grupos formados refletem uma incongruência com a filogenia das espécies hospedeiras (**Figura 2 e Figura 3, E. Tabela 1 do material suplementar**).



**Figura 3 – A:** Mapa de sobreposição de distribuição geográfica das espécies analisadas. **B:** Mapa de distribuição das espécies: *D. griseolineata*, *D. neocardini* e *D. gaucha*; **C:** Mapa de distribuição das espécies: *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. ornatifrons* e *D. equinoxialis*; **D:** Mapa de distribuição das espécies *D. sturtevantii*, *D. buzzati* e *D. pavnani*; **E:** Filogenia dos elementos *hATs* obtida por meio de análise Bayesiana. **Nomenclatura das sequências:** Sequências da espécie *D. equinoxialis* [hAT Equin (2,4,5,6)]; *D. ornatifrons* [hAT Ornat (2, 4,5,7, 10, 11 e 14)]; *D. paulistorum* [hAT Paulist (5, 9, 11, 16, 17, 18, 19 e 23)]; *D. gaucha* [hAT Gau (6)]; *D. pavnani* [hAT Pav (1)]; *D. neocardini* [hAT Neo (1, 2)]; *D. willistoni* [hAT willi (10, 13, 14, 18, 19, 20, 22 e 23)]; *D. sucinea* [hAT Suc (1)]; *D. capricorni* [hAT Cap (4, 2,3)]; *D. sturtevantii* [hAT Sturt (2,3,4,5,11,16)]; *D. buzzati* [hAT Buz (2,3,4,6,7, 11, 15,18)]; *D. willistoni* [howilli2]; *D. mojavensis* [homo1]; *D. griseolineata* [hAT Gris (1)]; *D. cardinoides* [hAT Card (1,2,4)]; *D. melanogaster* [Hobo]. **Círculos:** nome dos grupos de espécies; **Linhas pontilhadas e contínuas:** ilustram a distribuição das espécies na região Neotropical. **OBS:** A distribuição da espécie *D. mojavensis* está restrita à região da América do Norte. (Fonte Bachli 2011)

### Estimativa de divergência e inferência de TH

As estimativas de tempo divergência das sequências de TEs nos genomas das espécies estudadas são mostradas detalhadamente na Tabela 1 (material suplementar). Em uma análise mais ampla foram utilizadas as estimativas de divergência evolutiva sobre pares de sequências entre os grupos para estimar o tempo de divergência das sequências dos grupos resultantes da filogenia, e os valores são expressos na Tabela 2.

Nossos resultados demonstram que sequências de TEs pertencentes ao mesmo grupo são praticamente idênticas.

As sequências dos elementos da espécie *D. buzzati* divergiram em torno de 20% da sequência de *homo1* que ocorre em *D. mojavensis* e ambas pertencem ao grupo repleta. O tempo estimado de divergência entre os TEs dessas duas espécies ficou em torno de 6 milhões de anos, assim como para as sequências de *D. cardinoides* e *D. neocardini* pertencentes ao grupo cardini ficou em 8 milhões de anos (Tabela 3). Nos grupos 5, 6 e 7, todas as sequências foram muito similares (tabela 2).

**Tabela 2** – As estimativas de divergência evolutiva média nos pares de sequências dentro de grupos.

N	Sequências que formam o grupo	D
1	<i>Hobo</i>	-
2	<i>hAT Card</i> (1,2,4)	0%
3	<i>hAT Buz</i> (2,3,4,6,7, 11, 15,18)	5%
4	<i>homo1</i>	-
5	<i>hAT Equin</i> (2,4,5,6);	1%
6	<i>hAT Ornat</i> (14,2);	0%
7	<i>howilli2</i> ; <i>hAT willi</i> (23,20); <i>hAT Suc</i> (1); <i>hAT Cap</i> (4, 2,3); <i>hAT Sturt</i> (2,3,4,5,11,16)	1%
8	<i>hAT Willi</i> (10, 13, 14, 18, 19, 22); <i>hAT Gris</i> (1)	2%
9	<i>hAT Ornat</i> (4,5,7, 10 e 11); <i>hAT Paulist</i> (5, 9, 11, 16, 17, 18, 19 e 23), <i>hAT Gau</i> (6); <i>hAT Pav</i> (1); <i>hAT Neo</i> (1, 2);	1%

N corresponde a numeração do grupo; D valores de divergência.

**Tabela 3** – As estimativas de divergência evolutiva sobre pares de sequências entre os grupos.

	Equi	Paul	howilli2	homo1	Buz	Gris	Orn	Card
Equi								
Paul	7%							
howilli2	7%	9%						
homo1	12%	15%	10%					
Buz	23%	27%	22%	19%				
Gris	15%	17%	17%	21%	27%			
Orn	26%	30%	25%	32%	49%	39%		
Card	23%	26%	22%	23%	25%	29%	50%	
Hobo	61%	70%	56%	52%	40%	72%	120%	39%

**Equi:** Sequências *hAT Equin* (2,4,5,6); **Paul:** *hAT Ornat* (4,5,7, 10 e 11); *hAT Paulist* (5, 9, 11, 16, 17, 18, 19 e 23), *hAT Gau* (6); *hAT Pav* (1); *hAT Neo* (1, 2); **howilli2:** *howilli2*; *hAT willi* (23,20); *hAT Suc* (1); *hAT Cap* (4, 2,3); *hAT Sturt* (2,3,4,5,11,16); **Homo1:** *homo1*; **Buz:** *hAT Buz* (2,3,4,6,7, 11, 15,18); **Gris:** *hAT Willi* (10, 13, 14, 18, 19, 22); *hAT Gris* (1); **Orn:** *hAT Ornat* (14,2); **Card:** *hAT Card* (1,2,4); **hobo:** *Hobo*

**Tabela 4** – Tempo de divergência estimado em milhões de anos (MA), a partir dos valores de estimativas de divergência evolutiva sobre pares de sequências entre os grupos.

	Equi	Paul	howilli2	homo1	Buz	Gris	Orn	Card	hobo
Equi									
Paul	2,202								
howilli2	2,140	2,949							
homo1	3,736	4,622	3,239						
Buz	7,041	8,515	7,020	6,014					
Gris	4,668	5,229	5,273	6,519	8,508				
Orn	8,199	9,464	7,781	9,877	15,330	12,185			
Card	7,173	8,082	6,788	7,263	7,944	9,057	15,573		
Hobo	19,063	21,945	17,481	16,315	12,425	22,560	37,567	12,043	

**Equi:** Sequências *hAT* Equin (2,4,5,6); **Paul:** *hAT* Ornat (4,5,7, 10 e 11); *hAT* Paulist (5, 9, 11, 16, 17, 18, 19 e 23), *hAT* Gau (6); *hAT* Pav (1); *hAT* Neo (1, 2); **howilli2:** *howilli2*; *hAT* willi (23,20); *hAT* Suc (1); *hAT* Cap (4, 2,3); *hAT* Sturt (2,3,4,5,11,16); **Homo1:** *homo1*; **Buz:** *hAT* Buz (2,3,4,6,7, 11, 15,18); **Gris:** *hAT* Willi (10, 13, 14, 18, 19, 22); *hAT* Gris (1); **Orn:** *hAT* Ornat (14,2); **Card:** *hAT* Card (1,2,4); **hobo:** *Hobo*.

## Discussão

Vários estudos vêm demonstrando que eventos de TH não são tão raros em eucariontes como se pensava anteriormente e, nesses organismos, tudo indica que esses eventos ocorrem devido aos processos envolvidos na mobilização dos TEs. Eventos de TH desempenham um papel essencial no ciclo de vida dos TEs. Por exemplo, formas ativas dos TEs podem ser mobilizadas nos genomas hospedeiros e assim serem mantidas, enquanto formas inativas tendem a ser extintas por perdas estocásticas (Almeida e Carareto, 2005; Jordardan e McDonald, 1998; Le Rouzic *et al.* 2007; Pelisson *et al.*, 1994; Pinsker *et al.*, 2001; Wallau *et al.*, 2012). Por isso esses eventos são difíceis de detectar, pois é necessário considerar todas as características intrínsecas do ciclo de vida dos TEs (Cummings 1994; Capy *et al.*, 1998).

A metodologia proposta em nosso trabalho para a observação de eventos de TH considera a observação dos seguintes eventos: (1) distribuição irregular de um elemento em grupos de espécie; (2) incongruência entre a filogenia do hospedeiro e do elemento; (3) alta similaridade entre sequências de elementos que ocorrem em espécies distantes filogeneticamente (Silva *et al.*, 2004). Porém, esses fatores devem ser analisados com cuidado, pois em algumas condições especiais a TV também pode expor essas características, por exemplo: alta similaridade entre as sequências que ocorrem em espécies não aparentadas pode ser explicada por taxas evolutivas diferentes entre os elementos; a distribuição irregular em grupos de espécie pode ser devido a perdas estocásticas; e a discordância observada entre as filogenias pode ser justificada por

polimorfismo ancestral (Capy *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004; Loreto *et al.*, 2008). Em nossos resultados observamos esses três fenômenos. (1) Confirmamos através dos resultados das PCR (Tabela 1, Figura 2) a distribuição irregular dos elementos nos grupos de espécie; (2) por meio de uma análise de divergência de sequências de nucleotídeos observamos alto grau de similaridade entre as sequências (Tabelas 2 e Tabela 1 do material suplementar); (3) e a análise filogenética demonstra a incongruência entre a filogenia das espécies (Figura 2) e dos elementos de espécies que apresentam sobreposição geográfica (Figura 3, A - E).

Alta similaridade e a ampla distribuição desses elementos em vários grupos de espécies de *Drosophila* Neotropicais só foram observadas porque aparentemente esses elementos invadiram os genomas dessas espécies muito recentemente (Tabela 2 e 4) e o tempo estimado é pequeno em comparação ao período em que os grupos de espécie das quais os elementos foram descritos divergiram. Isso pode ser observado nos cladogramas oito e nove (Figura 3, E - descrição dos grupos na tabela 2). As espécies hospedeiras do primeiro clado são *D. willistoni* e *D. griseolineata* pertencentes ao subgênero *Sophophora* e *Drosophila* respectivamente. Segundo Markow e O'Grady (2007) esses grupos divergiram a cerca de 40 MA, mas a estimativa de divergência que encontramos entre os elementos é muito recente, cerca de 5 MA (Tabela 4). No segundo grupo também percebemos esses resultados, não só pela análise das sequências encontradas nos genomas de *D. paulistorum* (*Sophophora*), mas também no relacionamento entre as sequências de *D. gaucha* e *D. pavani* (subgrupo *mesophragmatica*) com *D. ornatifrons* (grupo *guarani*) e *D. neocardini* (grupo *cardini*). De acordo com as análises filogenéticas de Robe *et al.* (2010) esses grupos de espécies compõe a radiação *imigrans-tripunctata* e a radiação *virilis-repleta* (Figura 2) e estes grupos divergiram a aproximadamente 45-50 milhões de anos. Portanto, não seria possível essa alta similaridade das sequências por meio de taxas evolutivas diferentes, nem a distribuição irregular é devido a perdas estocásticas, tão pouco a filogenia incongruente poderia ser justificada por polimorfismo ancestral, pois esses fenômenos exigem muito tempo de adaptação dos grupos de espécies envolvidas.

Dessa maneira podemos concluir, com relação a ocorrência de TH, que os elementos investigados estão em processo de invasão recente e descontínua nos genomas dos grupos de espécies analisadas por meio desses eventos. Além de TH esses fatores também indicam que esses transposons são ou foram ativos muito recentemente. Resultados semelhantes também foram observados por Deprá *et al.* (2010) e Mota *et al.*

(2010) analisando os elementos *hosimary* (*hosim/hosec*) e *harrow* (*homo3/howilli3*), respectivamente, inicialmente descritos por Ortiz e Loreto (2009).

Com relação aos aspectos evolutivos, de distribuição e diversidade dos elementos da superfamília *hAT*, nossas análises ampliaram a visão de distribuição e diversidade desses elementos nos grupos de drosofilídeos Neotropicais. Sendo o Brasil detentor de uma grande diversidade desses espécimes (Figura 3, A-D) estudos que venham a disponibilizar conhecimento sobre aspectos evolutivos de TEs nesses grupos se fazem necessários.

*hATs* são pouco caracterizados não somente em drosofilídeos, mas nesses organismos já se sabe que TEs são diversos em estrutura e distribuição (Ortiz *et al.*, 2010). Estudos evolutivos de vários elementos descritos demonstram que TH pode ser responsável por essa ampla distribuição nos genomas de vários grupos de organismos (Ortiz e Loreto, 2009, Ortiz *et al.*, 2010, Deprá *et al.*, 2010 Mota *et al.*, 2010, Arensburger *et al.*, 2011). Entretanto, a TV também vem sendo apontada como responsável pela visão atual de distribuição dos elementos dessa superfamília (Arensburger *et al.*, 2011; Deprá *et al.*, 2012). É o caso do elemento *Mar*, um MITE da superfamília *hAT* que ocorre no grupo *willistoni*, que parece evoluir somente por TV (Deprá *et al.*, 2012).

Nossos resultados juntamente com os resultados obtidos por Ortiz *et al.* (2010), Deprá *et al.* (2010) e Mota *et al.* (2010) demonstram vários aspectos referentes às sequências de *hATs* quando analisadas de forma mais detalhada, e que devem ser levados em consideração ao se fazer a classificação de TEs em níveis maiores. Essa diversidade de elementos *hATs* somente em *Drosophila* e que possibilita a classificação desses elementos em várias famílias distintas (utilizando a metodologia proposta por Wicker *et al.*, 2007) também deve ser verdade nos grupos de organismos superiores analisados por Arensburger e colaboradores (Arensburger *et al.*, 2011).

## **Conclusão**

A alta similaridade dos elementos *homo1* e *howilli2*, distribuídos de forma descontínua entre espécies distantes filogeneticamente, bem como a invasão recente nos genomas em que foram encontrados pode ser explicado por eventos de TH. Os elementos investigados nesse trabalho possivelmente estão em processo de expansão nos genomas investigados devido a grande quantidade de eventos de TH que foram

observados. Nossos resultados servem de base para estudos de caracterização e descrição de atividade de elementos *hATs*.

## Referências

- AKAIKE H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Control* 19:716–723
- ALMEIDA LM e CARARETO CMA (2005) Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: Qual seria a importância da Transferência Horizontal na manutenção desse ciclo? *SBG-*: 43p.
- ARCA B, SAVAKIS C (2000). Distribution of the transposable element Minos in the genus *Drosophila*. *Genetica* 108: 263–267.
- ARENSBURGER P, HICE RH, ZHOU L, SMITH RC, TOM AC, WRIGHT JA, KNAPP J, BROCHTA DAO, CRAIG NL, ATKINSON PW (2011) Phylogenetic and functional characterization of the hAT transposon superfamily. *Genetics*: **111**: 1-34.
- ARENSBURGER P, KIM YJ, ORSETTI J, ALUVIHARE C, O'BROCHTA DA, ATKINSON PW (2005) An active transposable element, Herves, from the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Genetics* 169:697–708
- BÄCHLI, G. Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae, v. 1, 03. Database 2008/01. Disponível em < <http://www.taxodros.uzh.ch/>>. Acesso em: 8 dezembro. 2011.
- BIÉMONT C, VIEIRA C (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521–524.
- BIGOT, Y., C. AUJE-GUILLOU AND G. PERIQUET, 1996 Computer analyses reveal a hobo-like element in the nematode *Caenorhabditis elegans*, which presents a conserved transposase domain common with the Tc1-Mariner transposon family. *Gene* 174: 265– 271.
- BRUNET F, GODIN F, BAZIN C, CAPY P (1999). Phylogenetic analysis of Mos1-like transposable elements in the Drosophilidae. *J Mol Evol* 49: 760–768.
- CALVI BR, HONG TJ, FINDLEY SD, GELBART WM. (1991). Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, activator, and Tam3. *Cell*. 66:465–471.
- CAPY P, BAZIN C, HIGUET D, LANGIN T (1998) Dynamics and evolution of transposable elements. Landes Bioscience, Austin, Texas, 197pp.
- COATES CJ, JOHNSON KN, PERKINS HD, HOWELLS AJ, O'BROCHTA DA, ATKINSON PW (1996) The hermit transposable element of the Australian sheep



blowfly, *Lucilia cuprina*, belongs to the hAT family of transposable elements. *Genetica* 97:23–31

- CUMMINGS, M.P., (1994). Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *Trends Ecol. Evol.* 9: 141–145.
- DANIELS SB, CHOVNIC A, BOUSSY IS (1990a). Distribution of hobo transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 7: 589–606.
- DANIELS SB, PETTERSON KR, STRAUSBAUGH LD, KIDWELL MG, CHOVNICK AC (1990b). Evidence for horizontal transmission of the P transposable elements between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339–355.
- DEPRA M, LUDWIG A, VALENTE VLS, Loreto ELS (2012) Mar, a MITE family of hAT transposons in *Drosophila*. *Mobile DNA* 2012, 3:13.
- DEPRA M, PANZERA Y, LUDWIG A, VALENTE VLS, LORETO ELS (2010) hosimary: a new hAT transposon group involved in horizontal transfer. *Mol Genet Genomics* 283:451–459
- ESPOSITO, T., GIANFRANCESCO, F., CICCODICOLA, A., MONTANINI, L., MUMM, S., D'URSO, M., FORABOSCO, A., 1999. A novel pseudoautosomal human gene encodes a putative protein similar to Ac-like transposases. *Hum. Mol. Genet.* 8, 61–67.
- FESCHOTTE C, PRITHAM EJ (2007) DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* 41:331–368
- GRAUR, D. AND LI, W.H. (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- HALL, B. G. (2001) *Phylogenetic trees made easy – A how to manual for molecular biologists*. 2. Ed. Massachusetts : Sinauer Associates.
- HANDLER AM, GOMEZ SP (1997) A new hobo, Ac, Tam3 transposable element, hopper, from *Bactrocera dorsalis* is distantly related to hobo and Ac. *Gene* 185:133–135
- JORDAN IK e MCDONALD JF (1998) Evolution of *copia* retrotransposon in *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol.* **15**: 1160-1171.
- KEMPKEN, F. AND KÜCK, U. (1996) Restless, an active Ac-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. *Mol Cell Biol* 16: 6563–6572.
- KOGA, A., A. SHIMADA, A. SHIMA, M. SAKAIZUMI, H. TACHIDA ET AL., 2000 Evidence for recent invasion of the medaka fish genome by the Tol2 transposable element. *Genetics* 155: 273–281.
- LE ROUZIC A, BOUTIN TS, CAPY P (2007) Long-term evolution of transposable elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19375– 19380

- LORETO ELS, CARARETO C, CAPY P. (2008). Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity* 100:545–554.
- LORETO ELS, VALENTE VLS, ZAHA A, SILVA JC, KIDWELL MG (2001). *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. *J Hered* 92: 375–381
- MARKOW TA, O’GRADY PM. 2007. *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics* 177:1269–1276.
- MOTA NR, LUDWIG A, SILVA VALENTE VL, LORETO ELS. 2010. Harrow: new *Drosophila* hAT transposons involved in horizontal transfer. *Insect Mol Biol*. 19:217–228.
- MOTA NR, ROBE LJ, VALENTE VLS, BUDNIK M, LORETO ELS. 2008. Phylogeny of the *Drosophila mesophragmatica* group (Diptera, Drosophilidae): an example of Andean evolution. *Zool Sci* 25:526–532
- OLIVEIRA LFV, WALLAU GL and LORETO ELS (2009). Isolation of high quality DNA: a protocol combining “rennet” and glass milk. *Electronic Journal of Biotechnology*, **12**(2):1-6
- ORTIZ MF e LORETO ELS (2009) Characterization of new *hAT* transposable elements in 12 *Drosophila* genomes. *Genetica*, **135**: 67-75.
- ORTIZ MF, CORRE BRS, LORENZATTO KR and LORETO ELS (2010) *hAT* transposable elements and their derivatives: an analysis in the 12 *Drosophila* genomes. *Genetica*, **138**: 649-655.
- PELISSON A, SONG SU, PRUD’HOMME N, SMITH PA, BUCHETON A and CORCES V.G (1994). *Gypsy* transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila* flamenco. *The EMBO*, **13**: 4401-4411.
- PINKERTON, A.C.,WHYARD,S.,MENDE,H.A.,COATES,C.J., O’BROCHTA, D.A. and ATKINSON, P.W. (1999) The Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, contains multiple members of the hAT family of transposable elements. *Insect Mol Biol* 8: 423–434.
- POSADA, C. AND CRANDALL, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- ROBE LJ, LORETO ELS, VALENTEVLS (2010) Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *J Zool Syst Evol Res* (2010) 48(4), 310–321. doi: 10.1111/j.1439-0469.2009.00563.x
- ROBERTSON HM, LAMPE DJ (1995). Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol Biol Evol* 12: 850–862.
- RONQUIST F, HUELSENBECK JP, (2003) MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572–1574.

- RUBIN E, LITHWICK G, LEVY AA. (2001) Structure and evolution of the *hAT* Transposon Superfamily. *Genetics* **158**: 949-957.
- RYCHLIK, W. (1992) Oligo 4.1 Primers Analysis Software. National Biosciences, Inc., Plymouth, MI.
- SAMBROOK JF, FRITSH EF AND MANIATIS T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, 3v.
- SHARP PM, LI WH (1989) On the rate of DNA sequences evolution in *Drosophila*. *J Mol Evol* 28:398–402. doi:10.1007/BF02603075
- SILVA JC, LORETO ELS, CLARK JB. (2004). Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. *Curr Issues Mol Biol*. 6:57–71.
- STRECK RD, MACGAFFEY JE E BECKENDORF SK (1986) The structure of hobo transposable elements and their insertion sites. *EMBO J* 5:3615-3623.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M and KUMAR S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. **4**: 1-6.
- TERZIAN C, FERRAZ C, DEMAILLE J, BUCHETON A (2000). Evolution of the gypsy endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Mol Biol Evol* 17: 908–914.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673– 4680
- WALLAU GL, ORTIZ MF, LORETO ELS. (2012) Horizontal Transposon Transfer in Eukarya: Detection, Bias, and Perspectives. *Genome Biol. Evol.* 4(8):689–699. doi:10.1093/gbe/evs055
- WARREN WD, ATKINSON PW, O'BROCHTA (1994) The Hermes transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the hobo, Ac, and Tam3 (*hAT*) element family. *Genet Res* 64:87–97
- WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL A, LEROY P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SANMIGUEL P, SCHULMAN AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, **8**: 973-982.

## **Capítulo III**



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nossos resultados trazem mais perspectivas de investigação de elementos *hATs* distribuídos nos genomas de *Drosophila*. A descoberta de novos elementos distribuídos em genomas de espécimes de grupos distintos levanta questões interessantes, por exemplo:

Hipótese 1: Será que esses elementos são ativos atualmente?

Hipótese 2: Se ativos, quais as consequências da sua atividade nos genomas hospedeiros?

Hipótese3: Como é e será que existe polimorfismo de sítio de inserção desses elementos?

A resposta a essas questões poderia ser por meio de análises *in vivo* de incisão desses elementos em embriões de *Drosophila* aliada a estudos *in silico* da região do sítio de inserção desses elementos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA LM e CARARETO CMA (2005) Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: Qual seria a importância da Transferência Horizontal na manutenção desse ciclo? SBG-: 43p.
- ARENSBURGER P, HICE RH, ZHOU L, SMITH RC, TOM AC, WRIGHT JA, KNAPP J, BROCHTA DAO, CRAIG NL, ATKINSON PW (2011) Phylogenetic and functional characterization of the hAT transposon superfamily. *Genetics*: 111: 1-34.
- BÄCHLI, G. Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae, v. 1, 03. Database 2008/01. Disponível em < <http://www.taxodros.uzh.ch/>>. Acesso em: 8 dezembro. 2011.
- BIGOT, Y., C. AUGÉ-GOUILLOU AND G. PERIQUET (1996) Computer analyses reveal a hobo-like element in the nematode *Caenorhabditis elegans*, which presents a conserved transposase domain common with the Tc1-Mariner transposon family. *Gene* 174: 265– 271.
- CAPY P, BAZIN C, HIGUET D, LANGIN T (1998) Dynamics and evolution of transposable elements. Landes Bioscience, Austin, Texas, 197pp.
- CUMMINGS, M.P., (1994). Transmission patterns of eukaryotic trans-posable elements: arguments for and against horizontal transfer. *Trends Ecol. Evol.* 9: 141–145.
- DANIELS SB, CHOVNIC A, BOUSSY IS (1990a). Distribution of hobo transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 7: 589–606.
- DANIELS SB, PETERSON KR, STRAUSBAUGH LD, KIDWELL MG, CHOVNICK AC (1990b). Evidence for horizontal transmission of the P transposable elements between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339–355.
- DEPRA M, PANZERA Y, LUDWIG A, VALENTE VLS, LORETO ELS (2010) hobo: a new hAT transposon group involved in horizontal transfer. *Mol Genet Genomics* 283:451–459
- ESPOSITO, T., GIANFRANCESCO, F., CICCODICOLA, A., MONTANINI, L., MUMM, S., D'URSO, M., FORABOSCO, A., 1999. A novel pseudoautosomal human gene encodes a putative protein similar to Ac-like transposases. *Hum. Mol. Genet.* 8, 61–67.
- FESCHOTTE C, PRITHAM EJ (2007) DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* 41:331–368
- FESCHOTTE C, PRITHAM EJ: Mobile DNA: genomes under the influence. *Genome Biol* 2006, 7:320.

FINNEGAN, D. J. The Genome of *Drosophila melanogaster*, pp. 1096–1107. Academic Press, San Diego. 1992.

FLAVELL AJ (1999) Long terminal repeat retrotransposons jump between species. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12211-12212.

FLAVELL RB (1986). Genetical repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc Lond Ser B* 312: 227–242.

GASTON KJ (1991) The magnitude of global insect species richness. *Conserv Biol* 5: 183–196.

GOGARTEN JP, TOWNSEND JP. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol.* 3:679–687.

GOTTSCHALK, M. S.; HOFMANN, P. R. P.; VALENTE, V. L. S. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Checklist*, 4: 485-518

HUA-VAN A, LE ROUZIC A, BOUTIN TS, FILE'E J, CAPY P. (2011). The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biol Direct.* 6:19.

JORDAN IK e MCDONALD JF (1998) Evolution of *copia* retrotransposon in *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol.* **15**: 1160-1171.

KAZAZIAN, JR. H.H (1998) Mobile elements and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 8, p. 343-350.

KEELING PJ, PALMER JD. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet.* 9:605–618

KEMPKEN, F. AND KÜCK, U. (1996) Restless, an active Ac-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. *Mol Cell Biol* 16: 6563–6572.

Kidwell MG, Lish D (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11428–11433.

KOGA, A., A. SHIMADA, A. SHIMA, M. SAKAIZUMI, H. TACHIDA ET AL., 2000 Evidence for recent invasion of the medaka fish genome by the Tol2 transposable element. *Genetics* 155: 273–281.

LE ROUZIC A, CAPY P (2005) The first steps of transposable elements invasion: parasitic strategy versus genetic drift. *Genetics* 169: 1033–1043.

LERAT E, BIEMONT C, CAPY P (2000). Codon usage and the origin of P elements. *Mol Biol Evol.* 17:467–468.

- LORETO ELS, CARARETO C, CAPY P. (2008). Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity* 100:545–554.
- LORETO ELS, ORTIZ MF E REBELO JI (2007) Insertion sequences as variability generators in the *Mycoplasma hyopneumoniae* and *M. synoviae* genomes. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1, 283-289 (2007)
- LORETO ELS, VALENTE VLS, ZAHA A, SILVA JC, KIDWELL MG (2001). *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. *J Hered* 92: 375–381
- MCVEAN G. 2010. What drives recombination hotspots to repeat DNA in humans? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365:1213–1218.
- MORA C, TITTENSOR DP, ADL S, SIMPSON AGB, WORM B (2011) quantas espécies existem na Terra e no oceano? *PLoS Biol* 9 (8): e1001127. doi: 10.1371/journal.pbio.1001127
- MOTA NR, LUDWIG A, SILVA VALENTE VL, LORETO ELS. 2010. Harrow: new *Drosophila* hAT transposons involved in horizontal transfer. *Insect Mol Biol.* 19:217–228.
- ORTIZ MF e LORETO ELS (2009) Characterization of new *hAT* transposable elements in 12 *Drosophila* genomes. *Genetica*, **135**: 67-75.
- ORTIZ MF, CORRE BRS, LORENZATTO KR and LORETO ELS (2010) *hAT* transposable elements and their derivatives: an analysis in the 12 *Drosophila* genomes. *Genetica*, **138**: 649-655.
- PACE JK, GILBERT C, CLARK MS, FESCHOTTE C. (2008). Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17023–17028.
- PELISSON A, SONG SU, PRUD'HOMME N, SMITH PA, BUCHETON A and CORCES V.G (1994). *Gypsy* transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila flamenco*. *The EMBO*, **13**: 4401-4411.
- PINSKER W, HARING E, HAGEMANN S and MILLER WJ (2001) The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. *Cromossoma* **110**:148-158.
- ROBERTSON HM, LAMPE DJ (1995). Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol Biol Evol* 12: 850–862.
- RUBIN E, LITHWICK G, LEVY AA. (2001) Structure and evolution of the *hAT* Transposon Superfamily. *Genetics* **158**: 949-957.



SANMIGUEL, P., TIKHONOV, A., JIN, Y.K., MOTCHOULSKAIA, N., ZAKHAROV, D., MELAKE-BERHAN, A., SPRINGER, P.S., EDWARDS, K.J., LEE, M., AVRAMOVA, Z., BENNETZEN, J.L., 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274, 765–768.

SCHAACK S, CHOI E, LYNCH M, PRITHAM EJ (2010) DNA transposons and the role of recombination in mutation accumulation in *Daphnia pulex*. *Genom Biol* 11:R46.  
doi:10.1186/gb-2010-11-4-r46

SILVA JC, KIDWELL MG. 2000. Horizontal transfer and selection in the evolution of P elements. *Mol Biol Evol.* 17:1542–1557

SILVA JC, LORETO ELS, CLARK JB. (2004). Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. *Curr Issues Mol Biol.* 6:57–71.

TERZIAN C, FERRAZ C, DEMAILLE J, BUCHETON A (2000). Evolution of the gypsy endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Mol Biol Evol* 17: 908–914.

THOMAS J, SCHACK S, PRITHAM EJ. 2010 Pervasive Horizontal Transfer of Rolling-Circle Transposons among Animals. *Genome Biol Evol* 2: 656-664.

VENNER S, FESCHOTTE C, BIE MONT C. (2009). Dynamics of transposable elements: towards a community ecology of the genome. *Trends Genet.* 25:317–323

WALLAU GL, ORTIZ MF, LORETO ELS. (2012) Horizontal Transposon Transfer in Eukarya: Detection, Bias, and Perspectives. *Genome Biol. Evol.* 4(8):689–699.  
doi:10.1093/gbe/evs055

WARREN WD, ATKINSON PW, O'BROCHTA (1994) The Hermes transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the hobo, Ac, and Tam3 (hAT) element family. *Genet Res* 64:87–97

WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL A, LEROY P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SANMIGUEL P, SCHULMAN AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8: 973-982.

## **APÊNDICE**

Tabela 2: Estimativa de divergência evolutiva e valores estimados de tempo de divergência das sequências de TEs. Acima da diagonal valores de erro padrão. Abaixo da diagonal valores da distância e tempo de divergência (T) entre as sequências de TEs.

	hAT Equin5 T Equin5		hAT Equin2 T Equino2		hAT Equin6 T Equino6		hAT Equin4 T Equino4		Ornat11	T Ornat11	Ornat5	T Ornat5
hAT Equin5			0,003		0,004		0,006		0,015		0,015	
hAT Equin2	0,004	0,120			0,004		0,006		0,014		0,014	
hAT Equin6	0,012	0,361	0,008	0,241			0,006		0,015		0,015	
hAT Equin4	0,023	0,723	0,019	0,602	0,023	0,723			0,015		0,015	
hAT Ornat11	0,116	3,625	0,111	3,480	0,121	3,770	0,128	3,988			0,000	
hAT Ornat5	0,116	3,625	0,111	3,480	0,121	3,770	0,128	3,988	0,000	0,000		
hAT Neo2	0,118	3,698	0,118	3,698	0,128	3,988	0,135	4,205	0,006	0,175	0,006	0,175
hAT Neo1	0,118	3,698	0,118	3,698	0,128	3,988	0,135	4,205	0,006	0,175	0,006	0,175
hAT Ornat7	0,116	3,625	0,111	3,480	0,121	3,770	0,128	3,988	0,000	0,000	0,000	0,000
hAT Ornat10	0,116	3,625	0,111	3,480	0,121	3,770	0,128	3,988	0,000	0,000	0,000	0,000
hAT Pavani1	0,118	3,698	0,118	3,698	0,128	3,988	0,130	4,060	0,006	0,175	0,006	0,175
hAT Paulist16	0,116	3,634	0,116	3,634	0,126	3,924	0,133	4,142	0,007	0,234	0,007	0,234
hAT Paulist5	0,116	3,634	0,116	3,634	0,126	3,924	0,126	3,924	0,007	0,234	0,007	0,234
hAT Paulist11	0,121	3,779	0,116	3,634	0,126	3,924	0,133	4,142	0,007	0,234	0,007	0,234
hAT Paulist9	0,116	3,625	0,111	3,480	0,121	3,770	0,128	3,988	0,000	0,000	0,000	0,000
hAT Paulist19	0,121	3,770	0,116	3,625	0,125	3,915	0,132	4,133	0,007	0,234	0,007	0,234
hAT Paulist17	0,116	3,634	0,112	3,488	0,121	3,779	0,128	3,997	0,004	0,117	0,004	0,117
hAT Ornat4	0,116	3,625	0,111	3,480	0,121	3,770	0,128	3,988	0,004	0,117	0,004	0,117
hAT Paulist23	0,115	3,609	0,111	3,464	0,120	3,753	0,127	3,969	0,006	0,175	0,006	0,175
hAT Paulist18	0,131	4,106	0,127	3,954	0,134	4,182	0,134	4,182	0,006	0,183	0,006	0,183
hAT Gau6	0,116	3,639	0,114	3,560	0,124	3,877	0,132	4,114	0,005	0,145	0,005	0,145
Howilli2	0,146	4,553	0,142	4,429	0,150	4,678	0,158	4,928	0,106	3,308	0,106	3,308
hAT Cap4	0,143	4,473	0,143	4,473	0,151	4,722	0,159	4,970	0,105	3,296	0,105	3,296
hAT Willi23	0,151	4,722	0,147	4,597	0,155	4,846	0,163	5,094	0,113	3,531	0,113	3,531
hAT Cap3	0,140	4,375	0,140	4,375	0,148	4,625	0,156	4,875	0,100	3,137	0,100	3,137
hAT Willi20	0,147	4,597	0,147	4,597	0,155	4,846	0,159	4,970	0,111	3,466	0,111	3,472
hAT Sturt3	0,141	4,412	0,136	4,265	0,139	4,338	0,139	4,338	0,093	2,897	0,093	2,897
hAT Sturt5	0,136	4,261	0,136	4,261	0,139	4,332	0,139	4,332	0,096	3,005	0,096	3,005
hAT Sturt11	0,145	4,529	0,145	4,529	0,151	4,723	0,155	4,852	0,110	3,425	0,110	3,425
hAT Sturt2	0,147	4,588	0,143	4,464	0,151	4,712	0,155	4,836	0,109	3,407	0,109	3,407
hAT Cap2	0,135	4,225	0,135	4,225	0,138	4,298	0,138	4,298	0,088	2,735	0,088	2,735
hAT Suc1	0,128	3,997	0,128	3,997	0,130	4,070	0,130	4,070	0,092	2,859	0,092	2,859
hAT Sturt6	0,139	4,338	0,134	4,191	0,136	4,265	0,136	4,265	0,093	2,897	0,093	2,897
hAT Sturt4	0,133	4,172	0,129	4,020	0,131	4,096	0,131	4,096	0,093	2,912	0,093	2,912
Homo1	0,191	5,961	0,191	5,961	0,195	6,087	0,195	6,087	0,156	4,872	0,156	4,872

	hAT Equin5	T Equin5	hAT Equin2	T Equino2	hAT Equin6	T Equino6	hAT Equin4	T Equino4	Ornat11	T Ornat11	Ornat5	T Ornat5
hAT Buz6	0,231	7,216	0,231	7,216	0,239	7,467	0,247	7,718	0,213	6,658	0,213	6,658
hAT Buz2	0,227	7,105	0,223	6,979	0,231	7,231	0,239	7,482	0,206	6,430	0,206	6,430
hAT Buz3	0,221	6,910	0,217	6,785	0,225	7,034	0,229	7,159	0,216	6,739	0,216	6,739
hAT Buz11	0,235	7,357	0,231	7,231	0,239	7,482	0,245	7,671	0,212	6,611	0,212	6,611
hAT Buz15	0,240	7,500	0,236	7,368	0,242	7,566	0,244	7,632	0,217	6,777	0,217	6,777
hAT Buz7	0,227	7,078	0,222	6,928	0,224	7,003	0,224	7,003	0,227	7,080	0,227	7,080
hAT Buz4	0,222	6,951	0,218	6,826	0,226	7,077	0,234	7,327	0,213	6,645	0,213	6,645
hAT Buz18	0,221	6,910	0,221	6,910	0,224	6,988	0,224	6,988	0,223	6,977	0,223	6,977
hAT Willi19	0,156	4,870	0,154	4,802	0,158	4,938	0,165	5,141	0,098	3,061	0,098	3,067
hAT Gris1	0,160	5,005	0,162	5,073	0,167	5,208	0,173	5,411	0,107	3,330	0,107	3,330
hAT Willi13	0,156	4,870	0,154	4,802	0,162	5,073	0,169	5,276	0,098	3,067	0,098	3,067
hAT Willi18	0,152	4,735	0,149	4,667	0,154	4,802	0,160	5,005	0,096	3,004	0,096	3,004
hAT Willi14	0,156	4,870	0,154	4,802	0,158	4,938	0,160	5,005	0,100	3,131	0,100	3,131
hAT Willi10	0,149	4,667	0,152	4,735	0,160	5,005	0,162	5,073	0,098	3,067	0,098	3,067
hAT Willi22	0,149	4,667	0,152	4,735	0,160	5,005	0,167	5,208	0,096	3,004	0,096	3,004
hAT Ornat14	0,196	6,126	0,196	6,126	0,205	6,401	0,211	6,608	0,130	4,051	0,130	4,051
hAT Ornat2	0,190	5,946	0,186	5,808	0,192	6,015	0,201	6,291	0,128	4,003	0,128	4,003
hAT Card1	0,208	6,510	0,196	6,138	0,190	5,952	0,208	6,510	0,201	6,273	0,201	6,273
hAT Card4	0,202	6,324	0,190	5,952	0,196	6,138	0,214	6,696	0,197	6,157	0,197	6,157
hAT Car2	0,208	6,510	0,196	6,138	0,190	5,952	0,208	6,510	0,201	6,273	0,201	6,273
HOBO	0,507	15,837	0,507	15,837	0,505	15,777	0,509	15,898	0,467	14,599	0,466	14,568

	Neo2	T Neo2	Neo1	T Neo1	Omat7	T Ornat7	Omat10	T Ornat10	Pav1	T Pav1	Paulist16	T paulist16
hAT Equin5	0,015		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Equin2	0,015		0,015		0,014		0,014		0,015		0,015	
hAT Equin6	0,015		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Equin4	0,016		0,016		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Ornat11	0,003		0,003		0,000		0,000		0,003		0,004	
hAT Ornat5	0,003		0,003		0,000		0,000		0,003		0,004	
hAT Neo2			0,000		0,003		0,003		0,003		0,003	
hAT Neo1	0,000	0,000			0,003		0,003		0,003		0,003	
hAT Ornat7	0,006	0,175	0,006	0,175			0,000		0,003		0,004	
hAT Ornat10	0,006	0,175	0,006	0,175	0,000	0,000			0,003		0,004	
hAT Pavani1	0,004	0,117	0,004	0,117	0,006	0,175	0,006	0,175			0,003	
hAT Paulist16	0,006	0,176	0,006	0,176	0,007	0,234	0,007	0,234	0,006	0,176		
hAT Paulist5	0,009	0,293	0,009	0,293	0,007	0,234	0,007	0,234	0,006	0,176	0,004	0,117
hAT Paulist11	0,009	0,293	0,009	0,293	0,007	0,234	0,007	0,234	0,009	0,293	0,004	0,117
hAT Paulist9	0,006	0,175	0,006	0,175	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,175	0,007	0,234
hAT Paulist19	0,013	0,409	0,013	0,409	0,007	0,234	0,007	0,234	0,013	0,409	0,007	0,234
hAT Paulist17	0,009	0,293	0,009	0,293	0,004	0,117	0,004	0,117	0,009	0,293	0,004	0,117
hAT Ornat4	0,009	0,292	0,009	0,292	0,004	0,117	0,004	0,117	0,009	0,292	0,004	0,117
hAT Paulist23	0,011	0,350	0,011	0,350	0,006	0,175	0,006	0,175	0,011	0,350	0,006	0,176
hAT Paulist18	0,010	0,305	0,010	0,305	0,006	0,183	0,006	0,183	0,008	0,244	0,004	0,122
hAT Gau6	0,007	0,217	0,007	0,217	0,005	0,145	0,005	0,145	0,009	0,289	0,002	0,073
Howilli2	0,108	3,367	0,108	3,367	0,106	3,308	0,106	3,308	0,108	3,367	0,106	3,314
hAT Cap4	0,104	3,237	0,104	3,237	0,105	3,296	0,105	3,296	0,104	3,237	0,102	3,184
hAT Willi23	0,115	3,590	0,115	3,590	0,113	3,531	0,113	3,531	0,115	3,590	0,113	3,538
hAT Cap3	0,102	3,196	0,102	3,196	0,100	3,137	0,100	3,137	0,102	3,196	0,101	3,143
hAT Willi20	0,109	3,413	0,109	3,413	0,111	3,466	0,111	3,472	0,105	3,296	0,108	3,361
hAT Sturt3	0,097	3,035	0,097	3,035	0,093	2,897	0,093	2,897	0,095	2,966	0,095	2,973
hAT Sturt5	0,096	3,005	0,096	3,005	0,096	3,005	0,096	3,005	0,094	2,938	0,094	2,944
hAT Sturt11	0,110	3,425	0,110	3,425	0,110	3,425	0,110	3,425	0,108	3,364	0,108	3,370
hAT Sturt2	0,115	3,583	0,115	3,583	0,109	3,407	0,109	3,407	0,111	3,466	0,113	3,531
hAT Cap2	0,088	2,735	0,088	2,735	0,088	2,735	0,088	2,735	0,085	2,667	0,086	2,673
hAT Suc1	0,092	2,859	0,092	2,859	0,092	2,859	0,092	2,859	0,089	2,791	0,090	2,797
hAT Sturt6	0,097	3,035	0,097	3,035	0,093	2,897	0,093	2,897	0,095	2,966	0,095	2,973
hAT Sturt4	0,098	3,054	0,098	3,054	0,093	2,912	0,093	2,912	0,095	2,983	0,096	2,990
Homo1	0,158	4,931	0,158	4,931	0,156	4,872	0,156	4,872	0,154	4,812	0,156	4,881

	Neo2	T Neo2	Neo1	T Neo1	Omat7	T Ornat7	Omat10	T Ornat10	Pav1	T Pav1	Paulist16	T paulist16
hAT Buz6	0,215	6,718	0,215	6,718	0,213	6,658	0,213	6,658	0,215	6,718	0,212	6,611
hAT Buz2	0,212	6,611	0,212	6,611	0,206	6,430	0,206	6,430	0,212	6,611	0,208	6,503
hAT Buz3	0,221	6,918	0,221	6,918	0,216	6,739	0,216	6,739	0,218	6,799	0,220	6,871
hAT Buz11	0,217	6,791	0,217	6,791	0,212	6,611	0,212	6,611	0,217	6,791	0,214	6,684
hAT Buz15	0,221	6,903	0,221	6,903	0,217	6,777	0,217	6,777	0,219	6,840	0,217	6,791
hAT Buz7	0,231	7,223	0,231	7,223	0,227	7,080	0,227	7,080	0,229	7,151	0,229	7,167
hAT Buz4	0,218	6,825	0,218	6,825	0,213	6,645	0,213	6,645	0,218	6,825	0,215	6,718
hAT Buz18	0,223	6,977	0,223	6,977	0,223	6,977	0,223	6,977	0,221	6,903	0,221	6,920
hAT Willi19	0,104	3,259	0,104	3,259	0,098	3,061	0,098	3,067	0,104	3,259	0,105	3,266
hAT Gris1	0,105	3,266	0,105	3,266	0,107	3,330	0,107	3,330	0,105	3,266	0,105	3,273
hAT Willi13	0,100	3,131	0,100	3,131	0,098	3,067	0,098	3,067	0,100	3,131	0,100	3,138
hAT Willi18	0,102	3,195	0,102	3,195	0,096	3,004	0,096	3,004	0,102	3,195	0,102	3,202
hAT Willi14	0,102	3,195	0,102	3,195	0,100	3,131	0,100	3,131	0,098	3,067	0,102	3,202
hAT Willi10	0,100	3,131	0,100	3,131	0,098	3,067	0,098	3,067	0,096	3,004	0,100	3,138
hAT Willi22	0,098	3,067	0,098	3,067	0,096	3,004	0,096	3,004	0,098	3,067	0,098	3,074
hAT Ornat14	0,128	3,987	0,128	3,987	0,130	4,051	0,130	4,051	0,128	3,987	0,121	3,794
hAT Ornat2	0,134	4,197	0,134	4,197	0,128	4,003	0,128	4,003	0,134	4,197	0,128	4,003
hAT Card1	0,204	6,389	0,204	6,389	0,201	6,273	0,201	6,273	0,204	6,389	0,201	6,297
hAT Card4	0,208	6,506	0,208	6,506	0,197	6,157	0,197	6,157	0,208	6,506	0,205	6,413
hAT Car2	0,204	6,389	0,204	6,389	0,201	6,273	0,201	6,273	0,204	6,389	0,201	6,297
HOBO	0,466	14,568	0,466	14,568	0,467	14,599	0,466	14,568	0,466	14,568	0,463	14,477

	Paulist5	T Paulist5	Paulist11	T Paulist11	Paulist9	T paulist9	Paulist19	T Paulist19	Paulist17	T Paulist17	Ornat4	T Ornat4
hAT Equin5	0,014		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Equin2	0,015		0,015		0,014		0,015		0,014		0,014	
hAT Equin6	0,015		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Equin4	0,015		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Ornat11	0,004		0,004		0,000		0,004		0,003		0,003	
hAT Ornat5	0,004		0,004		0,000		0,004		0,003		0,003	
hAT Neo2	0,004		0,004		0,003		0,005		0,004		0,004	
hAT Neo1	0,004		0,004		0,003		0,005		0,004		0,004	
hAT Ornat7	0,004		0,004		0,000		0,004		0,003		0,003	
hAT Ornat10	0,004		0,004		0,000		0,004		0,003		0,003	
hAT Pavani1	0,003		0,004		0,003		0,005		0,004		0,004	
hAT Paulist16	0,003		0,003		0,004		0,004		0,003		0,003	
hAT Paulist5			0,004		0,004		0,004		0,003		0,003	
hAT Paulist11	0,008	0,235			0,004		0,004		0,003		0,003	
hAT Paulist9	0,007	0,234	0,007	0,234			0,004		0,003		0,003	
hAT Paulist19	0,007	0,234	0,007	0,234	0,007	0,234			0,003		0,003	
hAT Paulist17	0,004	0,117	0,004	0,117	0,004	0,117	0,004	0,117			0,000	
hAT Ornat4	0,004	0,117	0,004	0,117	0,004	0,117	0,004	0,117	0,000	0,000		
hAT Paulist23	0,006	0,176	0,006	0,176	0,006	0,175	0,006	0,175	0,002	0,058	0,002	0,058
hAT Paulist18	0,004	0,122	0,004	0,122	0,006	0,183	0,006	0,183	0,002	0,061	0,002	0,061
hAT Gau6	0,002	0,073	0,005	0,145	0,005	0,145	0,005	0,145	0,000	0,000	0,000	0,000
Howilli2	0,110	3,433	0,106	3,314	0,106	3,308	0,110	3,426	0,106	3,314	0,106	3,308
hAT Cap4	0,106	3,302	0,106	3,302	0,105	3,296	0,109	3,413	0,106	3,302	0,105	3,296
hAT Willi23	0,117	3,656	0,113	3,538	0,113	3,531	0,113	3,531	0,113	3,538	0,113	3,531
hAT Cap3	0,101	3,143	0,104	3,261	0,100	3,137	0,104	3,255	0,101	3,143	0,100	3,137
hAT Willi20	0,108	3,361	0,111	3,479	0,111	3,466	0,115	3,590	0,111	3,472	0,111	3,472
hAT Sturt3	0,095	2,966	0,095	2,973	0,093	2,897	0,097	3,035	0,093	2,904	0,093	2,897
hAT Sturt5	0,094	2,938	0,099	3,078	0,096	3,005	0,100	3,138	0,096	3,011	0,096	3,005
hAT Sturt11	0,108	3,364	0,112	3,493	0,110	3,425	0,114	3,547	0,110	3,431	0,110	3,425
hAT Sturt2	0,109	3,413	0,113	3,531	0,109	3,407	0,113	3,524	0,109	3,413	0,109	3,407
hAT Cap2	0,085	2,667	0,090	2,810	0,088	2,735	0,092	2,872	0,088	2,741	0,088	2,735
hAT Suc1	0,089	2,791	0,094	2,934	0,092	2,859	0,096	2,996	0,092	2,866	0,092	2,859
hAT Sturt6	0,095	2,966	0,095	2,973	0,093	2,897	0,097	3,035	0,093	2,904	0,093	2,897
hAT Sturt4	0,095	2,983	0,096	2,990	0,093	2,912	0,098	3,054	0,093	2,919	0,093	2,912
Homo1	0,152	4,762	0,160	5,000	0,156	4,872	0,158	4,931	0,156	4,881	0,156	4,872

	Paulist5	T Paulist5	Paulist11	T Paulist11	Paulist9	T paulist9	Paulist19	T Paulist19	Paulist17	T Paulist17	Ornat4	T Ornat4
hAT Buz6	0,213	6,671	0,217	6,791	0,213	6,658	0,215	6,718	0,213	6,671	0,213	6,658
hAT Buz2	0,210	6,563	0,210	6,563	0,206	6,430	0,208	6,490	0,206	6,443	0,206	6,430
hAT Buz3	0,216	6,752	0,220	6,871	0,216	6,739	0,218	6,799	0,216	6,752	0,216	6,739
hAT Buz11	0,216	6,744	0,216	6,744	0,212	6,611	0,213	6,671	0,212	6,623	0,212	6,611
hAT Buz15	0,219	6,840	0,219	6,854	0,217	6,777	0,219	6,840	0,217	6,791	0,217	6,777
hAT Buz7	0,229	7,151	0,229	7,167	0,227	7,080	0,229	7,151	0,227	7,080	0,227	7,080
hAT Buz4	0,217	6,778	0,217	6,778	0,213	6,645	0,215	6,705	0,213	6,658	0,213	6,645
hAT Buz18	0,221	6,903	0,226	7,068	0,223	6,977	0,226	7,052	0,223	6,977	0,223	6,977
hAT Willi19	0,105	3,266	0,102	3,202	0,098	3,061	0,104	3,259	0,100	3,131	0,100	3,131
hAT Gris1	0,109	3,401	0,107	3,337	0,107	3,330	0,113	3,522	0,109	3,401	0,109	3,394
hAT Willi13	0,105	3,266	0,098	3,074	0,098	3,067	0,104	3,259	0,100	3,138	0,100	3,131
hAT Willi18	0,102	3,202	0,100	3,138	0,096	3,004	0,102	3,195	0,098	3,074	0,098	3,067
hAT Willi14	0,102	3,202	0,100	3,138	0,100	3,131	0,106	3,323	0,102	3,202	0,102	3,195
hAT Willi10	0,096	3,010	0,102	3,202	0,098	3,067	0,104	3,259	0,100	3,138	0,100	3,131
hAT Willi22	0,098	3,074	0,100	3,138	0,096	3,004	0,102	3,195	0,098	3,074	0,098	3,067
hAT Ornat14	0,126	3,930	0,126	3,930	0,130	4,051	0,128	3,987	0,124	3,866	0,126	3,922
hAT Ornat2	0,128	4,011	0,128	4,011	0,128	4,003	0,126	3,939	0,124	3,882	0,124	3,874
hAT Card1	0,209	6,530	0,201	6,297	0,201	6,273	0,201	6,273	0,201	6,273	0,201	6,273
hAT Card4	0,205	6,413	0,205	6,413	0,197	6,157	0,197	6,157	0,197	6,157	0,197	6,157
hAT Car2	0,209	6,530	0,201	6,297	0,201	6,273	0,201	6,273	0,201	6,273	0,201	6,273
HOBO	0,465	14,536	0,469	14,654	0,467	14,599	0,468	14,626	0,468	14,626	0,466	14,568



	Paulis23	T Paulist23	Paulist18	T Paulist18	Gau6	T Gau6	Howilli2	T Howilli2	Cap4	T Cap4	willi23	T Willi23
hAT Equin5	0,015		0,016		0,015		0,015		0,015		0,016	
hAT Equin2	0,014		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Equin6	0,015		0,016		0,016		0,015		0,016		0,016	
hAT Equin4	0,015		0,016		0,016		0,016		0,016		0,016	
hAT Ornat11	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Ornat5	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Neo2	0,005		0,004		0,004		0,013		0,012		0,013	
hAT Neo1	0,005		0,004		0,004		0,013		0,012		0,013	
hAT Ornat7	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Ornat10	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Pavani1	0,005		0,004		0,005		0,013		0,012		0,013	
hAT Paulist16	0,003		0,003		0,002		0,013		0,012		0,013	
hAT Paulist5	0,003		0,003		0,002		0,013		0,012		0,013	
hAT Paulist11	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist9	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist19	0,003		0,003		0,003		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist17	0,002		0,002		0,000		0,012		0,012		0,013	
hAT Ornat4	0,002		0,002		0,000		0,012		0,012		0,013	
hAT Paulist23			0,003		0,002		0,012		0,012		0,013	
hAT Paulist18	0,004	0,122			0,000		0,013		0,013		0,014	
hAT Gau6	0,002	0,072	0,000	0,000			0,013		0,013		0,014	
Howilli2	0,105	3,296	0,114	3,561	0,101	3,154			0,004		0,003	
hAT Cap4	0,105	3,283	0,114	3,547	0,100	3,140	0,012	0,377			0,005	
hAT Willi23	0,113	3,518	0,121	3,792	0,110	3,432	0,006	0,188	0,018	0,563		
hAT Cap3	0,100	3,125	0,106	3,322	0,094	2,941	0,035	1,087	0,032	0,990	0,041	1,273
hAT Willi20	0,110	3,453	0,117	3,669	0,105	3,286	0,005	0,141	0,014	0,422	0,011	0,328
hAT Sturt3	0,092	2,885	0,094	2,947	0,086	2,679	0,024	0,753	0,024	0,750	0,031	0,965
hAT Sturt5	0,096	2,992	0,102	3,185	0,090	2,825	0,023	0,734	0,020	0,627	0,030	0,941
hAT Sturt11	0,109	3,411	0,117	3,644	0,108	3,370	0,020	0,636	0,017	0,536	0,027	0,829
hAT Sturt2	0,109	3,394	0,113	3,540	0,107	3,351	0,024	0,758	0,024	0,755	0,030	0,944
hAT Cap2	0,087	2,723	0,093	2,921	0,076	2,383	0,014	0,424	0,005	0,158	0,017	0,528
hAT Suc1	0,091	2,847	0,097	3,044	0,079	2,458	0,010	0,317	0,010	0,316	0,017	0,527
hAT Sturt6	0,092	2,885	0,094	2,947	0,086	2,679	0,024	0,748	0,024	0,745	0,031	0,958
hAT Sturt4	0,093	2,899	0,099	3,104	0,086	2,689	0,021	0,656	0,021	0,653	0,026	0,817
Homo1	0,155	4,853	0,160	5,002	0,156	4,876	0,176	5,501	0,169	5,295	0,180	5,626

	Paulis23	T Paulist23	Paulist18	T Paulist18	Gau6	T Gau6	Howilli2	T Howilli2	Cap4	T Cap4	willi23	T Willi23
hAT Buz6	0,212	6,632	0,224	6,986	0,222	6,953	0,209	6,520	0,206	6,452	0,213	6,645
hAT Buz2	0,205	6,406	0,212	6,625	0,213	6,670	0,203	6,337	0,204	6,366	0,207	6,462
hAT Buz3	0,215	6,713	0,224	7,006	0,214	6,681	0,218	6,810	0,216	6,741	0,222	6,934
hAT Buz11	0,211	6,585	0,220	6,861	0,223	6,969	0,212	6,627	0,213	6,655	0,216	6,752
hAT Buz15	0,216	6,750	0,220	6,861	0,230	7,199	0,212	6,611	0,212	6,639	0,216	6,739
hAT Buz7	0,226	7,047	0,230	7,173	0,228	7,111	0,227	7,087	0,224	7,006	0,230	7,173
hAT Buz4	0,212	6,620	0,223	6,972	0,210	6,563	0,216	6,748	0,217	6,775	0,220	6,870
hAT Buz18	0,222	6,944	0,226	7,075	0,220	6,879	0,227	7,079	0,220	6,881	0,229	7,167
hAT Willi19	0,100	3,112	0,109	3,398	0,093	2,915	0,124	3,887	0,121	3,774	0,129	4,026
hAT Gris1	0,108	3,380	0,111	3,472	0,098	3,076	0,128	3,995	0,121	3,780	0,132	4,133
hAT Willi13	0,100	3,119	0,109	3,398	0,093	2,915	0,121	3,786	0,118	3,674	0,126	3,925
hAT Willi18	0,098	3,055	0,107	3,332	0,091	2,834	0,121	3,786	0,118	3,674	0,126	3,925
hAT Willi14	0,102	3,182	0,107	3,332	0,096	2,995	0,121	3,786	0,118	3,674	0,126	3,925
hAT Willi10	0,100	3,119	0,109	3,398	0,091	2,834	0,123	3,837	0,116	3,623	0,127	3,975
hAT Willi22	0,098	3,055	0,109	3,398	0,088	2,753	0,123	3,837	0,116	3,623	0,127	3,975
hAT Ornat14	0,125	3,906	0,131	4,091	0,128	3,998	0,134	4,174	0,130	4,056	0,140	4,368
hAT Ornat2	0,123	3,858	0,136	4,243	0,131	4,101	0,128	3,985	0,127	3,972	0,134	4,181
hAT Card1	0,201	6,273	0,215	6,705	0,211	6,589	0,159	4,977	0,158	4,940	0,162	5,055
hAT Card4	0,197	6,157	0,211	6,579	0,199	6,212	0,163	5,093	0,162	5,055	0,165	5,170
hAT Car2	0,201	6,273	0,215	6,705	0,211	6,589	0,159	4,977	0,158	4,940	0,162	5,055
HOBO	0,467	14,603	0,465	14,526	0,483	15,079	0,487	15,224	0,480	15,015	0,487	15,226

	hAT Cap3	T Cap3	hAT Willi20	T willi20	hAT Sturt3	T Sturt3	hAT Sturt5	T Sturt5	hAT Sturt11	T Sturt11	hAT Sturt2	T Sturt2
hAT Equin5	0,016		0,015		0,018		0,017		0,016		0,016	
hAT Equin2	0,016		0,016		0,017		0,017		0,016		0,016	
hAT Equin6	0,016		0,016		0,017		0,017		0,016		0,016	
hAT Equin4	0,016		0,016		0,017		0,017		0,017		0,016	
hAT Ornat11	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Ornat5	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Neo2	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Neo1	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Ornat7	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Ornat10	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Pavani1	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist16	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist5	0,012		0,012		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist11	0,013		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist9	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist19	0,013		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist17	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Ornat4	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist23	0,012		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist18	0,013		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Gau6	0,013		0,013		0,014		0,014		0,014		0,014	
Howilli2	0,007		0,003		0,006		0,006		0,005		0,006	
hAT Cap4	0,006		0,004		0,006		0,005		0,005		0,006	
hAT Willi23	0,008		0,004		0,007		0,007		0,006		0,007	
hAT Cap3			0,007		0,007		0,007		0,006		0,006	
hAT Willi20	0,036	1,131			0,007		0,006		0,005		0,006	
hAT Sturt3	0,031	0,970	0,027	0,858			0,003		0,003		0,002	
hAT Sturt5	0,030	0,945	0,023	0,732	0,005	0,159			0,002		0,003	
hAT Sturt11	0,027	0,833	0,020	0,634	0,005	0,159	0,002	0,052			0,003	
hAT Sturt2	0,029	0,901	0,026	0,802	0,002	0,053	0,005	0,155	0,005	0,145		
hAT Cap2	0,034	1,061	0,014	0,422	0,024	0,750	0,019	0,585	0,019	0,585	0,022	0,691
hAT Suc1	0,032	1,006	0,010	0,316	0,024	0,752	0,019	0,584	0,020	0,636	0,022	0,690
hAT Sturt6	0,031	0,963	0,027	0,852	0,014	0,428	0,015	0,482	0,015	0,482	0,012	0,375
hAT Sturt4	0,032	0,985	0,024	0,762	0,012	0,383	0,012	0,383	0,012	0,383	0,012	0,383
Homo1	0,161	5,027	0,174	5,437	0,163	5,082	0,167	5,217	0,173	5,396	0,169	5,280

	hAT Cap3	T Cap3	hAT Willi20	T willi20	hAT Sturt3	T Sturt3	hAT Sturt5	T Sturt5	hAT Sturt11	T Sturt11	hAT Sturt2	T Sturt2
hAT Buz6	0,193	6,037	0,210	6,549	0,210	6,565	0,208	6,486	0,208	6,500	0,208	6,492
hAT Buz2	0,187	5,853	0,207	6,462	0,200	6,250	0,204	6,390	0,205	6,410	0,199	6,211
hAT Buz3	0,202	6,327	0,219	6,837	0,215	6,727	0,216	6,754	0,218	6,800	0,211	6,589
hAT Buz11	0,200	6,240	0,216	6,752	0,210	6,565	0,211	6,593	0,214	6,700	0,211	6,599
hAT Buz15	0,200	6,260	0,214	6,689	0,208	6,510	0,209	6,539	0,211	6,584	0,211	6,582
hAT Buz7	0,211	6,585	0,230	7,173	0,218	6,825	0,219	6,845	0,222	6,932	0,220	6,888
hAT Buz4	0,207	6,461	0,220	6,870	0,218	6,807	0,219	6,833	0,218	6,824	0,215	6,710
hAT Buz18	0,206	6,446	0,226	7,053	0,222	6,932	0,218	6,816	0,218	6,816	0,222	6,932
hAT Willi19	0,113	3,517	0,129	4,019	0,102	3,189	0,108	3,384	0,122	3,821	0,123	3,843
hAT Gris1	0,113	3,523	0,129	4,032	0,104	3,253	0,110	3,447	0,124	3,880	0,126	3,951
hAT Willi13	0,113	3,517	0,126	3,925	0,102	3,189	0,108	3,384	0,122	3,821	0,123	3,843
hAT Willi18	0,109	3,416	0,126	3,925	0,100	3,131	0,106	3,328	0,119	3,716	0,120	3,742
hAT Willi14	0,113	3,517	0,122	3,824	0,100	3,131	0,106	3,328	0,119	3,716	0,120	3,742
hAT Willi10	0,108	3,366	0,121	3,774	0,102	3,189	0,105	3,272	0,117	3,664	0,118	3,691
hAT Willi22	0,108	3,366	0,124	3,875	0,102	3,189	0,105	3,272	0,119	3,716	0,121	3,792
hAT Ornat14	0,124	3,861	0,135	4,212	0,137	4,285	0,137	4,285	0,131	4,109	0,132	4,128
hAT Ornat2	0,122	3,828	0,132	4,128	0,128	4,006	0,128	4,006	0,127	3,967	0,126	3,939
hAT Card1	0,156	4,879	0,165	5,170	0,172	5,375	0,172	5,375	0,167	5,229	0,169	5,285
hAT Card4	0,145	4,531	0,169	5,285	0,168	5,250	0,176	5,500	0,171	5,350	0,158	4,940
hAT Car2	0,156	4,879	0,165	5,170	0,172	5,375	0,172	5,375	0,167	5,229	0,169	5,285
HOBO	0,484	15,130	0,486	15,203	0,458	14,312	0,465	14,528	0,481	15,041	0,486	15,200

	hAT Cap2	T Cap2	hAT Suc1	T Suc1	hAT Sturt6	T Sturt6	hAT Sturt4	T Sturt4	Homo1	T Homo1	hAT Buz6	T Buz6
hAT Equin5	0,016		0,016		0,017		0,017		0,018		0,018	
hAT Equin2	0,016		0,016		0,017		0,016		0,018		0,018	
hAT Equin6	0,017		0,016		0,017		0,017		0,018		0,018	
hAT Equin4	0,017		0,016		0,017		0,017		0,018		0,018	
hAT Omat11	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Omat5	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Neo2	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Neo1	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Omat7	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Omat10	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Pavani1	0,012		0,013		0,013		0,013		0,015		0,017	
hAT Paulist16	0,012		0,013		0,013		0,013		0,015		0,016	
hAT Paulist5	0,012		0,013		0,013		0,013		0,015		0,016	
hAT Paulist11	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Paulist9	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Paulist19	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,016	
hAT Paulist17	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,016	
hAT Omat4	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,016	
hAT Paulist23	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,016	
hAT Paulist18	0,013		0,013		0,013		0,013		0,016		0,017	
hAT Gau6	0,013		0,014		0,014		0,014		0,017		0,018	
Howilli2	0,004		0,004		0,006		0,006		0,014		0,015	
hAT Cap4	0,003		0,004		0,006		0,006		0,014		0,015	
hAT Willi23	0,005		0,005		0,007		0,007		0,014		0,015	
hAT Cap3	0,007		0,007		0,007		0,007		0,014		0,014	
hAT Willi20	0,005		0,004		0,007		0,006		0,014		0,015	
hAT Sturt3	0,006		0,006		0,005		0,005		0,015		0,016	
hAT Sturt5	0,005		0,005		0,005		0,005		0,015		0,016	
hAT Sturt11	0,005		0,006		0,005		0,005		0,014		0,015	
hAT Sturt2	0,006		0,006		0,004		0,005		0,014		0,015	
hAT Cap2			0,004		0,006		0,006		0,015		0,016	
hAT Suc1	0,010	0,317			0,006		0,006		0,015		0,016	
hAT Sturt6	0,024	0,745	0,024	0,747			0,003		0,015		0,016	
hAT Sturt4	0,021	0,653	0,021	0,654	0,007	0,217			0,016		0,016	
Homo1	0,160	5,004	0,163	5,093	0,162	5,047	0,163	5,108			0,015	

	hAT Cap2	T Cap2	hAT Suc1	T Suc1	hAT Sturt6	T Sturt6	hAT Sturt4	T Sturt4	Homo1	T Homo1	hAT Buz6	T Buz6
hAT Buz6	0,210	6,571	0,210	6,548	0,210	6,573	0,208	6,504	0,193	6,037		
hAT Buz2	0,207	6,475	0,206	6,453	0,200	6,261	0,201	6,294	0,190	5,950	0,008	0,238
hAT Buz3	0,219	6,838	0,221	6,921	0,219	6,843	0,219	6,834	0,196	6,134	0,055	1,712
hAT Buz11	0,214	6,677	0,213	6,655	0,210	6,573	0,208	6,504	0,201	6,289	0,014	0,429
hAT Buz15	0,212	6,624	0,211	6,601	0,209	6,519	0,206	6,448	0,199	6,210	0,008	0,246
hAT Buz7	0,220	6,876	0,225	7,019	0,220	6,888	0,217	6,776	0,204	6,362	0,056	1,754
hAT Buz4	0,222	6,927	0,221	6,903	0,223	6,974	0,223	6,969	0,213	6,652	0,072	2,236
hAT Buz18	0,218	6,823	0,222	6,951	0,224	6,995	0,220	6,881	0,201	6,285	0,054	1,698
hAT Willi19	0,102	3,199	0,104	3,250	0,107	3,338	0,102	3,184	0,188	5,875	0,219	6,858
hAT Gris1	0,104	3,262	0,106	3,314	0,109	3,402	0,108	3,367	0,188	5,885	0,223	6,973
hAT Willi13	0,102	3,199	0,104	3,250	0,107	3,338	0,102	3,184	0,191	5,976	0,219	6,858
hAT Willi18	0,101	3,142	0,102	3,193	0,105	3,280	0,100	3,125	0,191	5,976	0,223	6,962
hAT Willi14	0,101	3,142	0,102	3,193	0,105	3,280	0,100	3,125	0,191	5,976	0,226	7,065
hAT Willi10	0,099	3,085	0,100	3,136	0,107	3,338	0,102	3,184	0,190	5,926	0,221	6,910
hAT Willi22	0,099	3,085	0,100	3,136	0,107	3,338	0,102	3,184	0,186	5,825	0,215	6,704
hAT Ornat14	0,138	4,318	0,140	4,383	0,142	4,424	0,139	4,358	0,196	6,136	0,228	7,112
hAT Ornat2	0,129	4,041	0,131	4,106	0,133	4,148	0,127	3,964	0,197	6,166	0,224	6,991
hAT Card1	0,172	5,375	0,172	5,375	0,168	5,250	0,168	5,250	0,188	5,859	0,188	5,859
hAT Card4	0,176	5,500	0,176	5,500	0,164	5,125	0,172	5,375	0,184	5,744	0,184	5,744
hAT Car2	0,172	5,375	0,172	5,375	0,168	5,250	0,168	5,250	0,188	5,859	0,188	5,859
HOBO	0,450	14,065	0,457	14,281	0,458	14,321	0,456	14,264	0,485	15,156	0,485	15,149

	hAT Buz2	T Buz2	hAT Buz3	T Buz3	hAT Buz11	T Buz11	hAT Buz15	T Buz 15	hAT Buz7	T Buz7	hAT Buz4	T Buz4
hAT Equin5	0,018		0,017		0,018		0,018		0,020		0,018	
hAT Equin2	0,018		0,017		0,017		0,018		0,019		0,017	
hAT Equin6	0,018		0,017		0,018		0,018		0,020		0,018	
hAT Equin4	0,018		0,017		0,018		0,018		0,019		0,018	
hAT Omat11	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Omat5	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Neo2	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Neo1	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Omat7	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Omat10	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Pavani1	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Paulist16	0,016		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Paulist5	0,016		0,017		0,017		0,017		0,019		0,016	
hAT Paulist11	0,016		0,017		0,016		0,017		0,019		0,017	
hAT Paulist9	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Paulist19	0,016		0,017		0,016		0,017		0,019		0,017	
hAT Paulist17	0,016		0,017		0,016		0,017		0,019		0,016	
hAT Omat4	0,016		0,017		0,016		0,017		0,019		0,016	
hAT Paulist23	0,016		0,016		0,016		0,017		0,019		0,016	
hAT Paulist18	0,017		0,017		0,017		0,017		0,019		0,017	
hAT Gau6	0,018		0,018		0,019		0,019		0,021		0,018	
Howilli2	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	
hAT Cap4	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	
hAT Willi23	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	
hAT Cap3	0,014		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	
hAT Willi20	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	
hAT Sturt3	0,016		0,016		0,016		0,016		0,017		0,016	
hAT Sturt5	0,016		0,016		0,016		0,016		0,017		0,016	
hAT Sturt11	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,016	
hAT Sturt2	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	
hAT Cap2	0,016		0,016		0,016		0,016		0,017		0,016	
hAT Suc1	0,016		0,016		0,016		0,016		0,017		0,016	
hAT Sturt6	0,016		0,016		0,016		0,016		0,017		0,017	
hAT Sturt4	0,016		0,016		0,016		0,016		0,017		0,017	
Homo1	0,015		0,015		0,015		0,015		0,017		0,015	

	hAT Buz2	T Buz2	hAT Buz3	T Buz3	hAT Buz11	T Buz11	hAT Buz15	T Buz 15	hAT Buz7	T Buz7	hAT Buz4	T Buz4
hAT Buz6	0,003		0,008		0,004		0,003		0,009		0,009	
hAT Buz2			0,008		0,004		0,003		0,008		0,008	
hAT Buz3	0,049	1,524			0,009		0,008		0,004		0,008	
hAT Buz11	0,012	0,382	0,059	1,858			0,004		0,009		0,009	
hAT Buz15	0,006	0,197	0,054	1,676	0,009	0,296			0,009		0,009	
hAT Buz7	0,049	1,538	0,007	0,218	0,056	1,754	0,054	1,700			0,009	
hAT Buz4	0,066	2,048	0,061	1,903	0,076	2,382	0,073	2,267	0,063	1,974		
hAT Buz18	0,051	1,588	0,005	0,169	0,058	1,812	0,056	1,755	0,005	0,169	0,062	1,925
hAT Willi19	0,215	6,715	0,224	7,013	0,221	6,921	0,223	6,968	0,229	7,165	0,227	7,086
hAT Gris1	0,219	6,829	0,231	7,231	0,228	7,140	0,229	7,141	0,236	7,360	0,234	7,302
hAT Willi13	0,215	6,715	0,224	7,013	0,221	6,921	0,223	6,968	0,229	7,165	0,227	7,086
hAT Willi18	0,218	6,818	0,228	7,116	0,225	7,025	0,226	7,075	0,233	7,286	0,230	7,188
hAT Willi14	0,221	6,921	0,228	7,116	0,228	7,128	0,226	7,075	0,233	7,286	0,233	7,290
hAT Willi10	0,220	6,870	0,226	7,065	0,226	7,076	0,228	7,129	0,235	7,346	0,232	7,239
hAT Willi22	0,213	6,663	0,223	6,962	0,220	6,870	0,223	6,968	0,229	7,165	0,225	7,035
hAT Ornat14	0,225	7,020	0,246	7,683	0,231	7,228	0,235	7,340	0,252	7,871	0,241	7,541
hAT Ornat2	0,221	6,898	0,237	7,408	0,224	7,003	0,229	7,161	0,245	7,652	0,236	7,371
hAT Card1	0,177	5,535	0,213	6,664	0,192	5,996	0,192	6,000	0,216	6,750	0,191	5,974
hAT Card4	0,166	5,189	0,210	6,549	0,188	5,881	0,196	6,125	0,220	6,875	0,188	5,859
hAT Car2	0,177	5,535	0,213	6,664	0,192	5,996	0,192	6,000	0,216	6,750	0,191	5,974
HOBO	0,484	15,124	0,495	15,482	0,489	15,267	0,485	15,156	0,466	14,554	0,486	15,203



	hAT Buz18	T Buz18	hAT Willi19	T Willi19	hAT Gris1	T Gris1	hAT Willi13	T Willi13	hAT Willi18	T Willi18	hAT Willi14	T Willi14
hAT Equin5	0,020		0,016		0,016		0,016		0,016		0,016	
hAT Equin2	0,020		0,016		0,017		0,016		0,016		0,016	
hAT Equin6	0,020		0,017		0,017		0,017		0,016		0,016	
hAT Equin4	0,020		0,017		0,017		0,017		0,017		0,016	
hAT Ornat11	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Ornat5	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Neo2	0,019		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
hAT Neo1	0,019		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
hAT Ornat7	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Ornat10	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Pavani1	0,019		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist16	0,019		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist5	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist11	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist9	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist19	0,019		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Paulist17	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Ornat4	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist23	0,019		0,012		0,013		0,012		0,012		0,012	
hAT Paulist18	0,019		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Gau6	0,022		0,014		0,014		0,014		0,014		0,014	
Howilli2	0,017		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
hAT Cap4	0,017		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
hAT Willi23	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Cap3	0,017		0,011		0,011		0,011		0,011		0,012	
hAT Willi20	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,012	
hAT Sturt3	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Sturt5	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Sturt11	0,017		0,013		0,012		0,013		0,013		0,013	
hAT Sturt2	0,017		0,013		0,013		0,013		0,012		0,012	
hAT Cap2	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Suc1	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Sturt6	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
hAT Sturt4	0,017		0,013		0,013		0,013		0,013		0,013	
Homo1	0,017		0,016		0,016		0,016		0,016		0,015	

	hAT Buz18	T Buz18	hAT Willi19	T Willi19	hAT Gris1	T Gris1	hAT Willi13	T Willi13	hAT Willi18	T Willi18	hAT Willi14	T Willi14
hAT Buz6	0,009		0,016		0,016		0,016		0,016		0,015	
hAT Buz2	0,009		0,015		0,015		0,015		0,015		0,015	
hAT Buz3	0,003		0,016		0,016		0,015		0,016		0,015	
hAT Buz11	0,010		0,016		0,016		0,015		0,015		0,015	
hAT Buz15	0,009		0,016		0,016		0,016		0,016		0,016	
hAT Buz7	0,003		0,018		0,018		0,018		0,017		0,017	
hAT Buz4	0,009		0,016		0,016		0,015		0,016		0,016	
hAT Buz18			0,018		0,018		0,018		0,018		0,018	
hAT Willi19	0,229	7,159			0,003		0,002		0,003		0,004	
hAT Gris1	0,230	7,173	0,006	0,200			0,003		0,005		0,005	
hAT Willi13	0,229	7,159	0,003	0,100	0,006	0,200			0,004		0,004	
hAT Willi18	0,231	7,221	0,008	0,249	0,014	0,449	0,011	0,349			0,002	
hAT Willi14	0,231	7,221	0,011	0,349	0,014	0,449	0,011	0,349	0,003	0,100		
hAT Willi10	0,229	7,159	0,013	0,399	0,016	0,499	0,013	0,399	0,005	0,150	0,005	0,150
hAT Willi22	0,225	7,034	0,005	0,150	0,008	0,250	0,005	0,150	0,013	0,399	0,016	0,498
hAT Ormat14	0,244	7,634	0,144	4,488	0,137	4,274	0,140	4,377	0,142	4,433	0,142	4,433
hAT Ormat2	0,245	7,648	0,135	4,234	0,139	4,353	0,135	4,234	0,134	4,178	0,137	4,289
hAT Card1	0,220	6,875	0,186	5,817	0,191	5,978	0,186	5,817	0,182	5,682	0,182	5,682
hAT Card4	0,224	7,000	0,190	5,952	0,196	6,114	0,190	5,952	0,186	5,817	0,195	6,088
hAT Car2	0,220	6,875	0,186	5,817	0,191	5,978	0,186	5,817	0,182	5,682	0,182	5,682
HOBO	0,456	14,235	0,504	15,750	0,502	15,700	0,505	15,776	0,506	15,826	0,508	15,876

	hAT Willi10	T Willi10	hAT Willi22	T Willi22	hAT Ornat1/ T Ornat14	hAT Ornat2	T Ornat2	hAT Card1	T Card1	hAT Card4	T Card4
hAT Equin5	0,016		0,016		0,018		0,019		0,030		0,029
hAT Equin2	0,016		0,016		0,018		0,018		0,029		0,029
hAT Equin6	0,016		0,017		0,018		0,018		0,029		0,029
hAT Equin4	0,017		0,017		0,019		0,019		0,030		0,029
hAT Ornat11	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Ornat5	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Neo2	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,024
hAT Neo1	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,024
hAT Ornat7	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Ornat10	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Pavani1	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Paulist16	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,024
hAT Paulist5	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,023
hAT Paulist11	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,024
hAT Paulist9	0,012		0,012		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Paulist19	0,013		0,013		0,015		0,015		0,023		0,023
hAT Paulist17	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,023
hAT Ornat4	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,023
hAT Paulist23	0,012		0,012		0,014		0,015		0,023		0,023
hAT Paulist18	0,013		0,013		0,015		0,015		0,025		0,025
hAT Gau6	0,014		0,013		0,016		0,017		0,030		0,029
Howilli2	0,012		0,012		0,014		0,014		0,022		0,022
hAT Cap4	0,012		0,012		0,014		0,014		0,021		0,022
hAT Willi23	0,013		0,013		0,014		0,014		0,022		0,022
hAT Cap3	0,011		0,011		0,013		0,013		0,021		0,021
hAT Willi20	0,012		0,013		0,014		0,014		0,022		0,022
hAT Sturt3	0,013		0,013		0,015		0,014		0,024		0,024
hAT Sturt5	0,013		0,013		0,015		0,014		0,024		0,024
hAT Sturt11	0,012		0,013		0,014		0,014		0,023		0,023
hAT Sturt2	0,012		0,013		0,014		0,014		0,023		0,022
hAT Cap2	0,013		0,013		0,015		0,014		0,023		0,023
hAT Suc1	0,013		0,013		0,015		0,014		0,023		0,023
hAT Sturt6	0,013		0,013		0,015		0,014		0,023		0,023
hAT Sturt4	0,013		0,013		0,015		0,014		0,023		0,023
Homo1	0,015		0,016		0,016		0,016		0,023		0,022

	hAT Willi10	T Willi10	hAT Willi22	T Willi22	hAT Ornat1	T Ornat14	hAT Ornat2	T Ornat2	hAT Card1	T Card1	hAT Card4	T Card4
hAT Buz6	0,015		0,015		0,016		0,016		0,022		0,022	
hAT Buz2	0,015		0,015		0,016		0,016		0,023		0,022	
hAT Buz3	0,016		0,016		0,017		0,017		0,024		0,024	
hAT Buz11	0,016		0,016		0,017		0,016		0,023		0,023	
hAT Buz15	0,016		0,016		0,017		0,017		0,024		0,024	
hAT Buz7	0,018		0,018		0,018		0,017		0,025		0,025	
hAT Buz4	0,016		0,016		0,016		0,016		0,023		0,023	
hAT Buz18	0,018		0,018		0,018		0,018		0,025		0,025	
hAT Willi19	0,004		0,003		0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Gris1	0,005		0,004		0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Willi13	0,004		0,003		0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Willi18	0,003		0,004		0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Willi14	0,003		0,005		0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Willi10			0,004		0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Willi22	0,011	0,349			0,014		0,014		0,025		0,025	
hAT Ornat14	0,140	4,377	0,138	4,322			0,005		0,024		0,024	
hAT Ornat2	0,135	4,234	0,134	4,178	0,015	0,465			0,024		0,023	
hAT Card1	0,195	6,088	0,199	6,223	0,196	6,130	0,192	6,010			0,006	
hAT Card4	0,190	5,952	0,195	6,088	0,192	6,010	0,188	5,889	0,011	0,345		
hAT Car2	0,195	6,088	0,199	6,223	0,196	6,130	0,192	6,010	0,000	0,000	0,011	0,345
HOBO	0,508	15,876	0,503	15,725	0,502	15,677	0,501	15,651	0,309	9,651	0,313	9,766

	hAT Car2	T Card2	HOBO
hAT Equin5	0,030		0,021
hAT Equin2	0,029		0,021
hAT Equin6	0,029		0,021
hAT Equin4	0,030		0,021
hAT Ornat11	0,023		0,021
hAT Ornat5	0,023		0,021
hAT Neo2	0,023		0,021
hAT Neo1	0,023		0,021
hAT Ornat7	0,023		0,021
hAT Ornat10	0,023		0,021
hAT Pavani1	0,023		0,021
hAT Paulist16	0,023		0,021
hAT Paulist5	0,023		0,021
hAT Paulist11	0,023		0,021
hAT Paulist9	0,023		0,021
hAT Paulist19	0,023		0,021
hAT Paulist17	0,023		0,021
hAT Ornat4	0,023		0,021
hAT Paulist23	0,023		0,021
hAT Paulist18	0,025		0,022
hAT Gau6	0,030		0,022
Howilli2	0,022		0,018
hAT Cap4	0,021		0,018
hAT Willi23	0,022		0,018
hAT Cap3	0,021		0,019
hAT Willi20	0,022		0,018
hAT Sturt3	0,024		0,019
hAT Sturt5	0,024		0,019
hAT Sturt11	0,023		0,019
hAT Sturt2	0,023		0,018
hAT Cap2	0,023		0,019
hAT Suc1	0,023		0,019
hAT Sturt6	0,023		0,019
hAT Sturt4	0,023		0,019
Homo1	0,023		0,018

	hAT Car2	T Card2	HOBO
hAT Buz6	0,022		0,019
hAT Buz2	0,023		0,019
hAT Buz3	0,024		0,018
hAT Buz11	0,023		0,019
hAT Buz15	0,024		0,019
hAT Buz7	0,025		0,020
hAT Buz4	0,023		0,018
hAT Buz18	0,025		0,020
hAT Willi19	0,025		0,019
hAT Gris1	0,025		0,019
hAT Willi13	0,025		0,019
hAT Willi18	0,025		0,019
hAT Willi14	0,025		0,019
hAT Willi10	0,025		0,019
hAT Willi22	0,025		0,019
hAT Ornat14	0,024		0,019
hAT Ornat2	0,024		0,019
hAT Card1	0,000		0,027
hAT Card4	0,006		0,027
hAT Car2			0,027
HOBO	0,309	9,651	