

NATHALIA DE SETTA

Diversidade de sequências da subfamília O de transposons
P em espécies do grupo saltans de *Drosophila*



1910001354



NATHALIA DE SETTA

Diversidade de seqüências da subfamília O de *transposons* P em espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.

São José do Rio Preto - SP

2005

NATHALIA DE SETTA

**Diversidade de seqüências da subfamília O de *transposons*
P em espécies do grupo *saltans* de *Drosophila***



T. 1364/05

**Dissertação apresentada
para obtenção do Título
do Mestre em Genética**

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto

São José do Rio Preto, 2005

575

5495d

04/03/2005

Doação

R\$ 21,00

Autor(a)

076/2005

68/05

Setta, Nathalia de.

Diversidade de sequências do subfamília O de *transposon P* em espécies do grupo *saltans* de *Drosophila* / Nathalia de Setta – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

65 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Cláudia Márcia Aparecida Carareto

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

I. Genética. 2. Evolução molecular – Elementos transponíveis. 3. *Drosophila* – Grupo *saltans*. 4. Elemento P – Subfamília O. I. Carareto, Cláudia Márcia Carareto. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575



O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



*Dedico este trabalho à minha mãe Maria Elisa.
Por sua coragem e força em todos os momentos de nossa vida.
Obrigada!!!*



*Diga-me e eu esquecerei,
Mostre-me e eu lembrarei,
Envolva-me e eu entenderei.*

Confúcio, 551-479 a.C.



Agradecimentos

*Sem essa de que: “- Estou sozinho.”
Somos muito mais que isso
Somos pingüim, somos golfinho
Homem, sereia e beija-flor
Leão, leoa e leão-marinho
Eu preciso e quero ter carinho, liberdade e respeito
Chega de opressão: quero viver minha vida em paz.*

*Quero um milhão de amigos
Quero irmãos e irmãs
Deve ser cisma minha
Mas a única maneira ainda
De imaginar a minha vida
É vê-la como um musical dos anos trinta
E no meio de uma depressão
Tê ver e ter beleza e fantasia.*

Vamos fazer um filme – Renato Russo

Agradecimentos

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Cláudia Márcia Ap. Carareto**, pela dedicação, suporte, persistência e paciência, um exemplo de educadora e pesquisadora a ser seguido.

Às **Prof^a. Dr^a. Paula Rahal** e **Prof^a. Dr^a. Heloísa Tajara** e aos **Prof. Dr. Maurício Bacci** e **Prof. Dr. Maurício Nogueira** pelo uso dos seqüenciadores em seus laboratórios;

À **Prof^a. Dr^a. Marie Anne van Sluys** pela colaboração e acolhimento em seu laboratório;

À **Prof^a. Dr^a. Sônia Oliani**, pelo uso de seu *scanner*;

À **Dr^a. Luciane Madureira de Almeida**, por me ensinar a maioria das técnicas de Biologia que apliquei em meu projeto, se hoje eu sei me “virar” em um laboratório a culpa é toda sua.

À **Dr^a. Juliana Polachini de Castro**, que juntamente com a nossa orientadora, idealizaram este projeto de pesquisa;

À **Dr^a. Ana Paula Pimentel Costa** por me ensinar a técnica de *Transposon Display*, e juntamente a todos os outros alunos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da USP – São Paulo pela agradável recepção e companhia;

Aos funcionários do Departamento de Biologia e da sessão de Pós-graduação;

Aos técnicos **Sebastião** e **Paulo**, pelo “papá” de minhas mosquinhas;

Aos colegas **Ana Carolina**, **Fabian** e **Elisa** pelo ajuda e disponibilidade no seqüenciamento de minhas amostras;

Ao **Fabício** por me ceder suas linhagens para a realização do *Transposon Display*;

À **Flávia** por me receber em São Paulo;

Aos amigos que conquistei na Pós-graduação **Luciane**, **Marcelo**, **Elavinha**, **Paula**, **Karina** e **Juliana Polachini**, obrigada por me receberem de braços abertos e por agüentarem meu humor imprevisível, amo todos vocês;

Aos amigos que trago desde a Graduação **Ana Flávia**, **Carolina Panin**, **Caroline Viera**, **Fábio**, **Isabella**, **Márcia**, **Juliana Montá Lage**, **Mineiro**, **Rodrigo** e **Tatiana Mendonça** pela amizade e por todos os momentos MARAVILHOSOS que passamos juntos;

Às minhas amigas **Danielinha** e **Ligia**, nem sei mais quando nossa amizade começou, só sei que ela não deve acabar nunca, obrigada pelo carinho que recebo de vocês;

Aos meus avós **Deanira** e **Francisco**, meus primos **Tatiana** e **Rodrigo** e, agora sim, a minha tia **Cláudia**, pelo amor e respeito que recebo de minha família, vocês são meu segundo porto seguro;

Ao menino mais amado do mundo, **Marcus** obrigada por você ser do jeitinho que você é, amigo, carinhoso e dedicado, saiba que eu te amo;

À minha mãe, quero agradecer novamente por tudo que você representa para mim, exemplo de vida e de professora, obrigada por você existir!!!



SUMÁRIO

I - Introdução	08
A - O grupo <i>saltans</i> de <i>Drosophila</i>	08
B - Características da família <i>P</i>	09
C - Distribuição, classificação e evolução da família <i>P</i>	11
D - O elemento <i>P</i> no grupo <i>saltans</i>	16
II - Objetivos	18
III - Material e Métodos	19
A - Material biológico	19
B - Testes moleculares	20
1 - Extração de DNA	20
2 - Análise da distribuição do elemento <i>P</i> tipo-O no grupo <i>saltans</i>	20
3 - Reação de <i>Transposon Display</i>	22
4 - Clonagem e seqüenciamento do elemento <i>P</i> tipo-O de <i>D. saltans</i>	24
5 - Clonagem e seqüenciamento da extremidade 3' do elemento <i>P</i> tipo-O nas espécies dos subgrupos <i>saltans</i> e <i>sturtevantii</i>	24
6 - Análises Filogenéticas	25
IV - Resultados	27
A - Distribuição do elemento <i>P</i> tipo-O no grupo <i>saltans</i>	27
B - Número de inserções do elemento <i>P</i> tipo-O em linhagens de <i>D. saltans</i> e <i>D. sturtevantii</i>	31
C - Análise de uma seqüência <i>P</i> tipo-O de <i>D. saltans</i>	36
D - Análise da extremidade 3' do elemento <i>P</i> tipo-O nas espécies dos subgrupos <i>saltans</i> e <i>sturtevantii</i>	43
V - Discussão	47
VI - Conclusões	56
VII - Referências Bibliográficas	57
VIII - Resumo	64
IX - Abstract	65

I – INTRODUÇÃO

Os elementos transponíveis são seqüências encontradas nos genomas de virtualmente todos os seres vivos. Os principais questionamentos em relação aos TEs (do Inglês, *Transposable Elements*) dizem respeito à sua origem e ao papel que desempenham na evolução molecular. O que se sabe é que os TEs estão presentes em percentuais significativos no genoma de seus hospedeiros; por exemplo, *Drosophila melanogaster* abriga 4,5 Mb (3,86 %) de elementos transponíveis em seu genoma (KAMINKER et al., 2002).

Dentre as 96 famílias de elementos transponíveis de *D. melanogaster*, a família *P* é foco do maior número de investigações. Porém, nas demais espécies do gênero *Drosophila* esse *transposon* não tem sido tão intensamente estudado. As informações acumuladas se referem principalmente à sua distribuição e atividade; entretanto, muitas questões restam a ser esclarecidas, particularmente aquelas relacionadas à origem e dinâmica evolutiva nessas espécies. Em face dessa necessidade, este trabalho foi realizado com o objetivo geral de ampliar os conhecimentos sobre o elemento *P* em espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*.

A – O grupo *saltans* de *Drosophila*

O gênero *Drosophila*, pertencente à família Drosophilidae, originou-se a cerca de 50 milhões de anos, durante o período Eoceno. É amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e durante sua diversificação originou cinco grandes subgêneros, dentre eles, o subgênero *Sophophora*, ao qual o grupo *saltans* pertence (TROCKMORTON, 1975).

O grupo *saltans*, como o grupo *willistoni*, são originais do Novo Mundo e juntos formam uma das três grandes radiações que compõe o subgênero *Sophophora*, a radiação *saltans-willistoni*. Esse subgênero abriga também o grupo *melanogaster*, natural dos trópicos do Velho Mundo e o grupo *obscura*, que se originou ao norte da zona temperada, também do Velho Mundo (TROCKMORTON, 1975).

As espécies do grupo *saltans* estão agrupadas em cinco subgrupos, de acordo com suas características morfológicas. Os subgrupos *cordata* (*D. neocordata*) e *elliptica* (*D. emarginata* e *D. neoelliptica*), que são considerados os mais primitivos, e os subgrupos *parasaltans* (*D. parasaltans* e *D. subsaltans*), *sturtevantii* (*D. rectangularis*, *D. sturtevantii*, *D. milleri*, *D. magalhaensi* e *D. dacunhai*) e *saltans* (*D. saltans*, *D. lusaltans*, *D. prosaltans*, *D. nigrosaltans*, *D. septentriosaltans*, *D. austrosaltans*, *D. pseudosaltans* e *D. neosaltans*), considerados os mais derivados (MAGALHÃES, 1962).

As análises dos padrões de distribuição geográfica e geológica fundamentaram a proposição de que o ancestral do grupo *saltans* era natural da América do Norte (TROCKMORTON, 1975), onde as espécies dos subgrupos *cordata* e *elliptica* foram primeiramente encontradas. Posteriormente, esse ancestral colonizou todo o continente americano originando os outros três subgrupos (O'GRADY; CLARK; KIDWELL, 1998). Contudo, as seqüências do gene *Xdh* das espécies do grupo *saltans* indicam que o subgrupo *parasaltans* deve ser o mais antigo, seguido pelos subgrupos *sturtevanti*, *elliptica*, *cordata* e *saltans* (RODRÍGUEZ-TRELLES; TARRÍO; AYALA, 1999). Finalmente, um estudo recente, realizado com o elemento transponível *P*, em várias espécies do grupo *saltans*, demonstrou que as seqüências *P* e seus polimorfismos de fragmentos de restrição separam as espécies dos subgrupos *cordata*, *elliptica* e *parasaltans* daquelas dos subgrupos *sturtevanti* e *saltans* (CASTRO; CARARETO, 2004a). É consenso que os subgrupos *cordata* e *elliptica* são mais relacionados entre si, da mesma forma que os subgrupos *sturtevanti* e *saltans*; contudo, as relações do subgrupo *parasaltans* não estão esclarecidas.

B – Características da família *P*

As seqüências *P* podem ser encontradas em duas formas diferenciadas no genoma de seus hospedeiros: como cópias completas ou defectivas. As cópias completas são compostas por quatro exons (0, 1, 2 e 3) capazes de transcrever um RNA mensageiro com cerca de 2,5 Kb (O'HARE; RUBIN, 1983).

A primeira seqüência *P* completa foi identificada em *D. melanogaster*, o elemento *P* canônico, que possui 2907 pb, repetições terminais invertidas (TIRs, do Inglês, *Terminal Inverted Repeats*) de 31 pb e regiões subterminais invertidas de 11 nucleotídeos localizadas a 130 pb de cada extremidade do elemento. Flanqueando a seqüência do elemento são encontradas repetições diretas de 8 pb, originadas durante a integração do *transposon* (O'HARE; RUBIN, 1983). A análise da seqüência *P* canônica revelou que são necessários 183 pb da extremidade 5' e 216 pb da extremidade 3' para sua transposição ou excisão (BEALL; RIO, 1997). A alta conservação dessas seqüências, tanto em nível intra como interpopulacional, indica que as TIRs são essenciais para o processo de transposição.

As cópias defectivas possuem entre 500 e 2500 pb e não são autônomas, já que perderam a capacidade de produção da transposase devido a deleções internas. Se essas cópias retiverem os sítios de ligação da transposase, podem se mobilizar quando a enzima estiver disponível no ambiente celular (ENGELS, 1989). A maioria das populações naturais apresenta elementos completos e defectivos e o número de inserções varia de 0 a 30 ou até 50

cópias (O'HARE et al., 1992). As localizações mais comuns do elemento *P* são regiões eucromáticas (BERG; SPRADLING, 1991) e, em cromossomos politênicos, observou-se que as inserções ocorrem nas regiões de interbandas preferencialmente (SEMESHIN et al., 1986). Ainda, existe uma tendência de inserções ocuparem as extremidades 5' dos genes (SPRADLING et al., 1995).

A expressão do elemento *P* canônico é tecido-específica. Na linhagem germinativa, os elementos *P* completos expressam a transposase, com 87 kDa (751 aminoácidos), responsável pela sua mobilização, tanto em eventos precisos, que originam inserções autônomas, quanto em eventos imprecisos, originando inserções deletadas, não-autônomas (RIO; LASKI; RUBIN, 1986). Nas linhagens somática e germinativa, o elemento *P* codifica uma proteína menor, com 66 kDa (576 aminoácidos), em decorrência de uma falha na retirada do terceiro intron. Nesse caso, a proteína sintetizada é truncada devido à presença de um códon de terminação no nono nucleotídeo do terceiro intron e funciona como regulador negativo da transposição (LASKI; RIO; RUBIN, 1986).

Uma das conseqüências da atividade dos elementos *P* no genoma de seus hospedeiros é a síndrome da disgenesia híbrida. Esse fenômeno é caracterizado por anormalidades genéticas; dentre elas, altas taxas de mutação, desenvolvimento aberrante dos órgãos reprodutivos e rearranjos cromossômicos, quando são cruzados machos da natureza, portadores do elemento *P*, com fêmeas de laboratório, desprovidas do elemento (KIDWELL; KIDWELL; SVED, 1977). O cruzamento recíproco não resulta em fenótipo disgênico pois, o citoplasma do óvulo será portador de proteínas repressoras do elemento.

A repressão da transposição do elemento *P* ocorre normalmente por meio de proteínas expressas pelo próprio elemento. Essas proteínas repressoras estão divididas nos tipos I e II. As repressoras do tipo I são produzidas por elementos que possuem ao menos as regiões dos exons 0, 1 e 2 do gene da transposase e os primeiros 9 pb do terceiro intron; dentre elas, destaca-se a proteína de 66 kDa descrita por Rio; Laski; Rubin (1986). As proteínas repressoras do tipo II apresentam deleções na região dos exons 1 e 2, codificando peptídeos de cerca de 22 kDa com a extremidade amino semelhante à transposase. Os elementos *KP* (BLACK et al., 1987) e *DP* (RASMUSSEN; RAYMOND; SIMMONS, 1993) são exemplos de repressores do tipo II em *D. melanogaster*.

A transposição do *transposon P* pode ser regulada por diversos mecanismos, dentre eles: i) a competição por sítios de ligação ao DNA entre a transposase e repressores, como os repressores de 66 kDa e *KP*; ii) a titulação da transposase por elementos não-autônomos, que consiste na ligação dessa enzima tanto em cópias completas como em cópias deletadas,

diminuindo a concentração de transposase disponível para transposição de elementos autônomos, e; iii) a regulação através de RNA anti-senso, onde pequenas moléculas de RNA, por exemplo, o repressor SP (RASMUSSEN; RAYMOND; SIMMONS, 1993) se ligariam ao RNA mensageiro primário impedindo seu processamento e tradução, ou ainda, causando sua degradação (para uma revisão detalhada ver CASTRO; CARARETO, 2004b).

C – Distribuição, classificação e evolução da família P

Seqüências homólogas ao *transposon* P canônico estão amplamente distribuídas na família Drosophilidae e ocorrem também em outros Diptera, o que indicando que esse TE poderia estar presente no ancestral dessa ordem. Contudo, sua ampla distribuição parece não ser exclusivamente resultado da transferência vertical entre linhagens no curso da evolução dos grupos de espécies dessa família. Vários autores sugerem eventos de transferência horizontal do elemento P mediada por vetores hipotéticos (DANIELS et al., 1990; CLARK; MADDISON; KIDWELL, 1994).

Dentre as espécies do gênero *Drosophila* que abrigam o elemento P estão as do subgênero *Sophophora* (subgrupos *obscura*, *melanogaster*, *willistoni* e *saltans*). No subgênero *Drosophila*, o elemento P foi identificado apenas em *D. mediopunctata* (grupo *tripunctata*), sugerindo que ele invadiu recentemente o genoma dessa espécie (LORETO et al., 1998; 2001). Além do gênero *Drosophila*, o elemento P já foi descrito em espécies dos gêneros *Scaptomyza* (SIMONELIG; ANXOLABÉHERÈ, 1991; HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000), *Lordiphosa* (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000), em *Musca domestica* (LEE; CLARK; KIDWELL, 1999), na mosca varejeira *Lucilia cuprina* (PERKINS; HOWELLS, 1992) e no mosquito *Anopheles* (SARKAR et al., 2003; OLIVEIRA DE CARVALHO; SILVA; LORETO, 2004). Existem, ainda, relatos de seqüências transcricionalmente ativas, que apresentam similaridade com os *transposons* P em alguns gêneros de vertebrados (QUENESVILLE; NOUAUD; ANXOLABÉHERÈ, 2004), inclusive em humanos (HAGEMANN; PINSKER, 2001). No entanto, a origem e as relações filogenéticas entre o elemento P e essas seqüências divergentes ainda não foram esclarecidas.

De acordo com a identidade de suas seqüências, a família P pode ser dividida em cerca de 25 subfamílias, (HAGEMANN; MILLER; PINSKER, 1994; HAGEMANN; HARING; PINSKER, 1996a, b; CLARK; KIDWELL, 1997; NOUAUD; QUENESVILLE; ANXOLABÉHERÈ, 2003; SARKAR et al., 2003; OLIVEIRA DE CARVALHO; SILVA; LORETO, 2004). Dentre elas, quatro estão bem caracterizadas: as subfamílias canônica, M, T e O, que apresentam cerca de 70% de identidade em suas seqüências de nucleotídeos.

A subfamília canônica apresenta essa denominação devido à presença do elemento *P* canônico de *D. melanogaster* (O'HARE; RUBIN, 1983). Esse elemento ocorre nas espécies dos grupos *willistoni* e *saltans* (subgênero *Sophophora*), excetuando-se no grupo *saltans* as espécies dos subgrupos *cordata* e *elliptica* e, no grupo *willistoni*, a espécie *D. insularis* (DANIELS et al., 1990; CLARK et al., 1995; SILVA; KIDWELL, 2000). Elementos canônicos são ainda observados em *D. mediopunctata*, espécie do grupo *tripunctata* (subgênero *Drosophila*), que provavelmente recebeu essa sequência via um evento de transferência horizontal (LORETO et al., 2001).

A invasão do elemento *P* canônico no genoma de *D. melanogaster* é um fenômeno recente, já que as linhagens de laboratório coletadas antes da década de 50 e as espécies do mesmo subgrupo são livres de sequências canônicas (para revisão detalhada ver KIDWELL, 1983). Esses estudos levaram à conclusão de que a subfamília canônica estava ausente no ancestral do subgrupo de *D. melanogaster* e foi introduzida nessa espécie a cerca de 50 anos atrás, a partir de um doador menos relacionado, se espalhando através das populações das Américas para o resto do globo, como é indicado pela análise de linhagens portadoras do elemento (ANXOLABÉHERÈ; KIDWELL; PERIQUET, 1988; RUIZ; CARARETO, 2003). Essa hipótese é corroborada pelas análises de sequências das espécies portadoras desse *transposon*. A alta identidade (apenas uma substituição nucleotídica) entre as sequências de *D. melanogaster* e *D. willistoni*, e a distribuição heterogênea desse TE nas espécies do subgênero *Sophophora*, sugere que a última é a espécie doadora do *transposon* para *D. melanogaster* (DANIELS et al., 1990), sendo o ácaro *Proctolaelaps regalis* o principal candidato a vetor desse evento de transferência horizontal (HOUK et al., 1991).

A subfamília M foi identificada pela primeira vez no genoma de *D. bifasciata* (grupo *obscura*, subgênero *Sophophora*). A sequência *IbifM3* possui 2935 pb de comprimento e é flanqueada por duas sequências idênticas de 8 pb cada. Possui TIRs de 31 e 32 pb, nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Nessas regiões existem apenas quatro diferenças entre a sequência M de *D. bifasciata* e a sequência canônica de *D. melanogaster* (três substituições e uma inserção). Pode-se observar, ainda, duas repetições subterminais invertidas intactas localizadas nas regiões 54 a 64 e 2884 a 2894. Análises de *Southern blot* e hibridização *in situ* em cromossomos politênicos indicam a ocorrência de cinco a dez inserções desse elemento por genoma de *D. bifasciata* (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1995).

Posteriormente, a subfamília M foi descrita nas demais espécies do grupo *obscura*, em algumas espécies do grupo *melanogaster* e dos gêneros *Scaptomyza* e *Lordiphosa* (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000). As relações entre essas sequências não refletem as relações

de parentesco das espécies hospedeiras. Haring; Hagemann; Pinsker (2000) observaram que seqüências presentes em espécies relacionadas (*D. bifasciata* / *D. helvetica*: 5,0% de similaridade) são tão divergentes quanto seqüências em gêneros diferentes (*S. pallida* / *D. bifasciata*: 7,0% e *D. helvetica* / *L. miki*: 3,5% de similaridade).

Análises por seqüenciamento do elemento *P* tipo-M em *D. bifasciata* sugeriram inicialmente que esse *transposon* seria inativo, devido ao acúmulo de diversas mutações em todas as suas regiões e ao seu reduzido número de inserções (HAGEMANN; MILLER; PINSKER, 1990; HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1995). Posteriormente, mostrou-se que existem seqüências transcricionalmente ativas em *D. bifasciata*, *D. helvetica* e *S. pallida* (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1998).

Haring; Hagemann; Pinsker (2000) propuseram a seguinte história evolutiva da subfamília M, em face das similaridade entre as diferentes seqüências desses *transposons*: o subgrupo *montium* (grupo *melanogaster*), que abriga a subfamília M em todas as espécies analisadas, deve ter sido o doador desse elemento *P* para *S. pallida*. Desde que, dentre todas as subfamílias *P*, a tipo-M é a mais similar (80%) ao elemento *P* canônico de *D. melanogaster* e *D. willistoni* (DANIELS et al., 1990), a hipótese mais parcimoniosa é que o elemento *P* tipo-M ancestral estava presente em todos os grupos do subgênero *Sophophora*, sendo perdido posteriormente nos grupos *obscura* e *melanogaster*, com exceção do subgrupo *montium*. As seqüências do subgrupo *montium* devem ter se espalhado entre as espécies do grupo *obscura* e dos gêneros *Lordiphosa* e *Scaptomyza*, por meio de ondas de transferência horizontal ainda não detectadas. Finalmente, dentro da radiação *saltans-willistoni*, seqüências relacionadas à subfamília M evoluíram e invadiram recentemente o genoma de *D. melanogaster*, na forma de elementos canônicos.

Os *transposons* da subfamília T foram identificados em três espécies do subgrupo *subobscura* (*D. subobscura*, *D. madeirensis* e *D. guanche* – MILLER; McDONALD; PINSKER, 1997) e em cinco espécies do subgrupo *obscura* (*D. ambigua*, *D. obscura*, *D. eskoi*, *D. subsilvestris* e *D. tristis* – HARING et al., 1998), ambos subgrupos pertencentes ao grupo *obscura* do subgênero *Sophophora*. Essas seqüências foram observadas na forma de elementos completos e deletados. Suas TIRs possuem 33 pb e a região 3' não codificadora do elemento de *D. ambigua* abriga uma inserção de 300pb. São considerados inativos, específicos do grupo *obscura* e estão agrupados *in tandem* no genoma de *D. tristis* e *D. ambigua* (HAGEMANN; HARING; PINSKER, 1996b).

A subfamília O foi primeiramente identificada em *D. bifasciata*, sendo considerada uma das mais antigas subfamílias do *transposon P*. Existem variações na integridade e na

distribuição genômica dessas seqüências em *D. bifasciata*. São observadas cópias completas e deletadas em todas as linhagens analisadas e, essas cópias, foram localizadas em sítios eucromáticos, indicando atividade transposicional. Entre elas, a seqüência *Ibif-O-1* foi isolada e amplamente analisada (HAGEMANN; MILLER; PINSKER, 1994). As principais características da seqüência de *Ibif-O-1* são: a) é composta por 2986 pb divididos em quatro exons que apresentam seus sítios de processamento do RNA mensageiro homólogos aos do elemento *P* canônico; b) suas repetições subterminais invertidas (SIRs) não-codificantes apresentam correspondência exata a outros tipos de elementos *P*, com 10 pb (posições 60-69 e 2929-2938) e 8 pb (140-147 e 2848-2855); c) possui nas repetições terminais invertidas (TIRs) duas inserções exclusivas, não-complementares, de 12 pb e 14 pb nas regiões não-codificadoras 5' e 3', respectivamente; d) é flanqueada por repetições de 8 pb geradas por duplicação dos sítios de inserção; e) sua seqüência apresenta divergência de cerca de 31% em relação a seqüência *P* tipo-M de *D. bifasciata*; e, f) possui diversos *indels*, nos introns 1 e 3, e no exon 3 (HAGEMANN; MILLER; PINSKER, 1994).

O elemento *P* tipo-O já foi identificado no grupo *obscura* em *D. bifasciata* e *D. imaii* (subgrupo *obscura*) e em cinco espécies do subgrupo *affinis*. Foi descrito, ainda, em quatro espécies do gênero *Scaptomyza*, seis espécies do gênero *Lordiphosa*, quatro espécies dos grupos *saltans* e cinco espécies do grupo *willistoni* (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000). São considerados invasores recentes e transcricionalmente ativos em *D. bifasciata* e *S. pallida*, seguindo o mesmo mecanismo observado na seqüência *P* canônica de *D. melanogaster*: o RNA mensageiro do repressor é expresso em tecidos somáticos e germinativos, e o RNA mensageiro da transposase é produzido apenas no tecido germinativo (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1998).

A alta similaridade (95%) entre as seqüências *P* tipo-O de *D. bifasciata*, *D. imaii* e *S. pallida* é uma evidência clara da ocorrência de transferência horizontal entre duas dessas espécies (HAGEMANN; HARING; PINSKER, 1996a), sendo *S. pallida* a espécie doadora. Haring; Hagemann; Pinsker (2000) propuseram que vários eventos de transferência horizontal teriam ocorrido durante a evolução do elemento *P* tipo-O nessas espécies. O ancestral do elemento *P* tipo-O estaria presente no ancestral das linhagens *saltans* e *willistoni*, tendo sido transmitido verticalmente entre as espécies desses grupos. No primeiro evento de transferência horizontal, os elementos do grupo *willistoni* teriam invadido o genoma do ancestral do subgrupo *affinis* (grupo *obscura*), já que esse TE está presente em todas as espécies do grupo investigadas (*D. azteca*, *D. affinis* e *D. athabasca*), seguindo-se novo período de herança vertical, levando à diferenciação das seqüências em 3,4 a 5,8%. Após esse

período de transmissão vertical no subgrupo *affinis*, uma onda de transmissões horizontais teria resultado em infecções de diversas espécies dos gêneros *Drosophila*, *Scaptomyza* e *Lordiphosa*. A baixa divergência entre essas seqüências (0,1-0,6%) é sugestiva de que esses eventos tenham ocorrido num período mais recente. A rota de propagação mais provável teria se iniciado na América do Norte, por meio da infecção de *S. pallida* por alguma das espécies do subgrupo *affinis*. Sendo *S. pallida* uma espécie cosmopolita, ela pode ter sido a mediadora da transferência através do Oceano Atlântico e infectado as espécies Paleárticas (gênero *Drosophila* e *Lordiphosa*). Não existe um cenário estabelecido para a transmissão do elemento *P* tipo-O dentro de gênero *Scaptomyza*. A transmissão vertical, seguida de perda estocástica em algumas espécies ou, vários eventos de transferência horizontal são as hipóteses mais cogitadas (Figura 1).

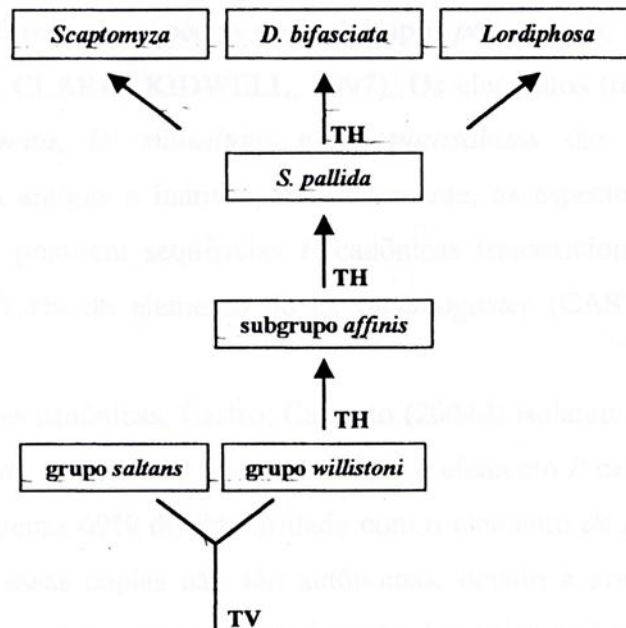


Figura 1. Hipótese da rota evolutiva do elemento *P* tipo-O. TV: transferência vertical; TH: transferência horizontal (modificado de Haring; Hagemann; Pinsker, 2000).

Apesar das investigações realizadas nas últimas duas décadas, a história evolutiva do elemento *P* continua fornecendo motivos para especulações. Sabe-se somente que sua evolução é complexa, certamente envolvendo a coexistência e evolução independente de múltiplas subfamílias dentro de certas linhagens de drosofilídeos, divergência de nucleotídeos e extinção de elementos em algumas espécies. A alta variabilidade de seqüências dentro de um mesmo genoma deve ser, ainda, resultado de múltiplas ondas de transferência horizontal.

D - O elemento *P* no grupo *saltans*

Transposons pertencentes à família *P* estão presentes nos cinco subgrupos do grupo *saltans*. O número de inserções estimado por meio da técnica de *Southern blot* é bastante variável, sendo observada apenas uma cópia do elemento nos genomas de *D. neocordata* e *D. emarginata*; duas em *D. parasaltans*; três em *D. subsaltans*; nove cópias em *D. milleri*; 10 em *D. dacunhai*; 11 em *D. sturtevantii* e *D. saltans*; 12 em *D. austrosaltans*; e 15 em *D. prosaltans* (CASTRO; CARARETO, 2004a).

A divergência entre as seqüências *P* do grupo *saltans* pode chegar a 54%, indicando que os elementos devam pertencer a mais de uma subfamília *P*, já que a divergência entre as seqüências de nucleotídeos de uma mesma subfamília deve estar entre 30 e 50% (CAPY et al., 1998).

Todas as espécies do grupo *saltans* estudadas abrigam elementos *P* em seus genomas. Elementos canônicos ocorrem nas espécies dos subgrupos *parasaltans*, *sturtevantii* e *saltans* (DANIELS et al., 1990; CLARK; KIDWELL, 1997). Os elementos transponíveis *P* de *D. neocordata*, *D. emarginata*, *D. subsaltans* e *D. parasaltans* são rearranjados, sendo provavelmente inserções antigas e inativas; diferentemente, as espécies *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. sturtevantii* possuem seqüências *P* canônicas transcricionalmente ativas, que divergem entre 2,8 a 11,3% do elemento de *D. melanogaster* (CASTRO; CARARETO, 2004c).

Além das inserções canônicas, Castro; Carareto (2004d) isolaram seqüências *P* em *D. prosaltans* e *D. sturtevantii*, cerca de 50 pb menores que o elemento *P* canônico, com 88% de similaridade entre si e apenas 69% de similaridade com o elemento de *D. melanogaster*. As autoras concluíram que essas cópias não são autônomas, devido à presença de códons de terminação ao longo dos quatro exons e à deterioração dos sítios de ligação da transposase, TATA, *helix-turn-helix* e nos zíperes de leucina. Quanto às relações filogenéticas com as demais seqüências *P* conhecidas, essas pertencem ao clado F do trabalho de Clark; Kidwell (1997), o qual contém elementos dos grupos *saltans* e *willistoni*.

A subfamília O também foi identificada em algumas espécies do grupo *saltans*. Trechos das seqüências *P* tipo-O de *D. prosaltans* (GenBank - AF313782.1 e AF313795.1) e *D. austrosaltans* (GenBank - AF313776.1 e AF313789.1) sugerem que esses elementos estão inativos nessas espécies e são antigos componentes desses genomas, uma vez que apresentam mutações nos códons de iniciação da transcrição e pequenas deleções ao longo de suas seqüências (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000). Outro indício da inatividade dessas seqüências no grupo seria o baixo número de inserções em *D. austrosaltans*, *D. lusaltans* e *D.*

prosaltans. A análise por hibridização *in situ* revelou apenas uma ou duas cópias eucromáticas no genoma dessas espécies (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000).

A variabilidade na distribuição da família *P* dentro de um mesmo grupo é um fenômeno constante. Como citado anteriormente, seqüências *P* canônicas estão ausentes nos subgrupos *cordata* e *elliptica* do grupo *saltans* e em *D. insularis*, espécie do grupo *willistoni*; porém essa seqüência está presente nas demais espécies desses dois grupos (DANIELS et al., 1990; CLARK et al., 1995; SILVA; KIDWELL, 2000), estando transcricionalmente ativa em duas espécies do subgrupo *saltans* (*D. saltans* e *D. prosaltans*) e em uma do subgrupo *sturtevantii* (*D. sturtevantii*), como demonstrado por Castro; Carareto (2004c). Assim, a inatividade da subfamília O no grupo *saltans*, inferida apenas pela análise de trechos das seqüências de *D. austrosaltans* e *D. prosaltans*, pode não representar perfeitamente o estado das seqüências em todo o grupo. Adicionalmente, a rota de transmissão dessa subfamília dentro dos grupos *saltans* e *willistoni* não foi ainda traçada. Para que se obtenha um maior conhecimento da ocorrência e da atividade e dispersão do elemento *P* tipo-O no grupo *saltans*, é necessária uma ampla análise de todas as espécies do grupo.



II - OBJETIVOS

Este trabalho consistiu na investigação sobre o elemento transponível *P* tipo-O no genoma de nove espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, com os seguintes objetivos:

1. averiguar a ocorrência do elemento em todas as espécies do grupo disponíveis para a análise;
2. avaliar o número de inserções genômicas em linhagens de *D. saltans* e *D. sturtevanti*, na tentativa de inferir atividade transposicional;
3. seqüenciar o elemento, total ou parcialmente, em todas as espécies nas quais for identificado, e;
4. avaliar as relações filogenéticas entre as seqüências obtidas e as depositadas no GENBANK.



III – MATERIAL E MÉTODOS

A - Material biológico

As linhagens utilizadas neste estudo são procedentes dos estoques do Laboratório de Evolução Molecular de Insetos, Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto, SP (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies e linhagens isofêmeas dos cinco subgrupos do grupo *saltans* de *Drosophila*, procedências geográficas e datas de coleta (**D. bifasciata*: controle positivo para a presença do elemento *P* tipo-O).

Subgrupo	Espécie	Linhagem	Procedência Geográfica	Coleta
<i>cordata</i>	<i>D. neocordata</i>	NEO	Minas Gerais – Brasil	<1960
<i>elliptica</i>	<i>D. emarginata</i>	EVC	Vera Cruz – México	<1962
<i>parasaltans</i>	<i>D. parasaltans</i>	PAT	Tapuruquara (AM) – Brasil	< 1962
	<i>D. subsaltans</i>	SUB	Belém (PA) – Brasil	< 1962
<i>sturtevantii</i>	<i>D. milleri</i>	MEY	El Yunque – Porto Rico	< 1962
		SMX	Matlapa – México	1998
	<i>D. sturtevantii</i>	SCR	Turrialba – Costa Rica	< 1960
		SCO	Villavicencio – Colômbia	< 1960
		SPN	Gamboa – Panamá	1999
		SSR	Santana do Riacho (MG) – Brasil	1995
		SMN	Mangaratiba (RJ) – Brasil	1999
		SMI1	Mirassol (SP) – Brasil	1971
		SMI2	Mirassol (SP) – Brasil	1999
		SRP	São José do Rio Preto (SP) – Brasil	1999
		SMQ	Maquine (RS) – Brasil	1995
		SPG	Encarnación – Paraguai	1999
<i>saltans</i>	<i>D. austrosaltans</i>	API	Chilpancingo – México	1998
		ABB	Barra Bonita (SP) – Brasil	1999
		ARP	São José do Rio Preto (SP) – Brasil	1999
	<i>D. saltans</i>	SAH	Huichihuayan – México	< 1960
		SAC	Chilpancingo – México	1962
		SAM	Matlapa – México	1998
		SAS	San Salvador – El Salvador	< 1960
		SAG	Guatemala – Guatemala	<1960
	<i>D. prosaltans</i>	PTT	Sangre Grande – Trinidad Tobago	<1962
		PSR	Santana do Riacho (MG) – Brasil	1997
		PMI	Mirassol (SP) – Brasil	1999
		PBB	Barra Bonita (SP) – Brasil	1999
		PE1	Eldorado (RS) – Brasil	<1962
		PE2	Eldorado (RS) – Brasil	1995

B - Testes moleculares

1 – Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado de acordo com o protocolo descrito em Daniels; Strausbaugh (1986), com algumas modificações. Cerca de 50 indivíduos foram macerados em microtubos em 400 µL de Tampão de Lise (uréia 3,33M; NaCl 0,07M; tris 0,05M; EDTA 0,02M; N-lauril 0,017M, pH 8,0). A seguir, os microtubos foram incubados a 56 °C durante 1 hora, sendo então adicionados 400 µL de Tampão de Extração (fenol/tris, pH 7,8). Após 10 minutos de agitação cuidadosa, os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos, a 12.000 rpm, a 15 °C, e o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo.

O procedimento de centrifugação acima foi repetido duas vezes, adicionando-se na primeira repetição um volume igual ao do sobrenadante de solução (1:1) de fenol : clorofórmio/álcool isoamílico (2%) e, na segunda repetição, o mesmo volume do sobrenadante, da solução de clorofórmio/álcool isoamílico (2%). Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos adicionando-se dois volumes de álcool etílico (PA) gelado e 1/5 do volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2), agitando-se levemente. Para favorecer a precipitação do DNA, os microtubos foram mantidos a -70 °C durante 1 hora.

Após a precipitação, os microtubos foram centrifugados durante cinco minutos, a 12.000 rpm, a 15 °C, e os precipitados foram desidratados com um banho de álcool etílico 70% durante 10 minutos e secos em estufa por 30 minutos, a 37 °C. A seguir, foram adicionados a cada tubo 50 µL de água ultrapura autoclavada e esses foram mantidos durante 12 horas, à temperatura ambiente para que ocorresse a completa eluição do DNA. A solução obtida foi tratada com 0,01 mg de RNase H durante 1 hora, a 37 °C. O DNA extraído foi quantificado com auxílio do Kit DNA Quantification Standard (Gibco), segundo as especificações do fabricante.

2 – Análise da distribuição do elemento *P* tipo-O no grupo *saltans*

a) Amplificações pela PCR: a ocorrência do elemento *P* tipo-O foi investigada por meio da técnica da PCR utilizando-se principalmente os oligonucleotídeos iniciadores O-IR5 e O-IR3, que se ligam a regiões específicas dos invertidos terminais do elemento *P* tipo-O e amplificam o elemento completo de cerca de 2,9 Kb. Iniciadores adicionais foram utilizados no caso de ausência de amplificação em algumas espécies. Na Tabela 2 encontram-se as

seqüências e os sítios de ancoramento dos iniciadores utilizados neste estudo. Na Figura 2 encontram-se suas representações esquemáticas.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados (O-IR5 e O-IR3, HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1998; os demais iniciadores foram construídos durante as análises).

Iniciador	Seqüência (5'- 3')	Região de anelamento	Sítios de ancoramento
O-IR5	CATGGCAAAACGAGTGCCTTCG	TIR 5'	1-22
O-IR3	CATGGCAAAATAAGTGCTTGTG	TIR 3'	2987-2966
O-e3	TTTACATATGTGGATGAGGTATCG	exon3	2479-2502
O-5Sam1	CCATGGAAATGAAGAGTCTGAGGC	exon 1	543-566
O-3Sam1	CAAGCCCGCCCGTGCGATACC	exon 3	2329-2309
O-5Smi21	GAAGGCTACGCTAATGCGAGTACGC	intron 1	454-475
O-3Smi21	GAACCATCGCTCGTATACAACG	exon 1	1015-994
O-3Sam2	GGTGACGGATGGTCATGCTGTCC	exon 2	1783-1761
O-IR3TD	TACACAAGCACTTATTTTGCCATG	TIR 3'	2964-2987

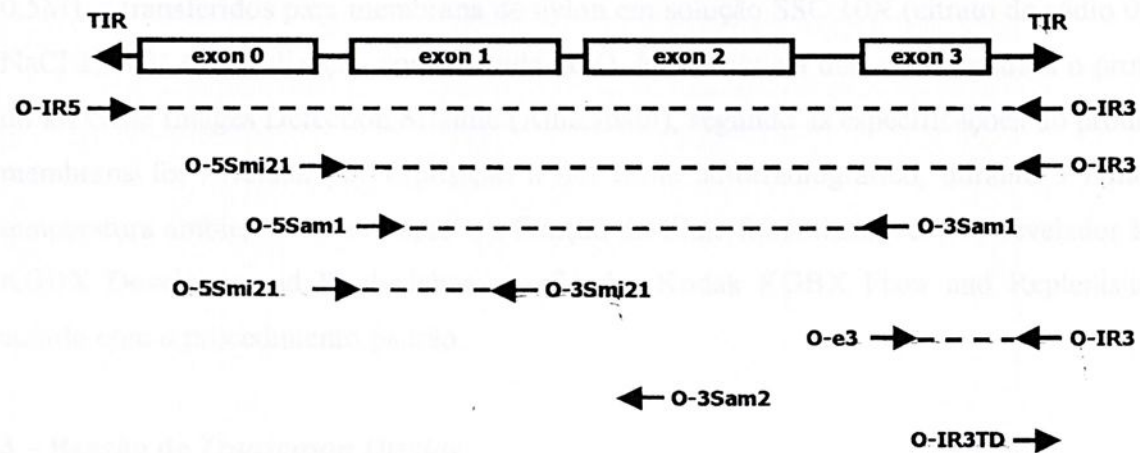


Figura 2. Representação do elemento P, composto por 4 exons, 3 introns e as TIRs. As setas correspondem aos iniciadores descritos na Tabela 2 e as linhas tracejadas às seqüências amplificadas pela reação de PCR.

As reações das PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico em uma solução de 160 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 1,25 mM de MgCl₂ e 1U de Taq polimerase (Invitrogen) em tampão 1X, submetida a 95°C durante 10

minutos; 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias. Os amplificados foram corados com brometo de etídeo e separados a 90V em gel de agarose 1%.

b) *Southern blot*: foi realizada uma hibridização por *Southern blot* dos produtos obtidos pela técnica da PCR com o objetivo de confirmar a natureza das seqüências amplificadas e verificar a presença de amplificados não detectados pela coloração com brometo de etídeo. Para a hibridização foi sintetizada uma sonda do elemento *P* tipo-O de *D. bifasciata* utilizando o fragmento obtido com os iniciadores O-IR5 e O-IR3, correspondente ao elemento completo. O produto da PCR foi extraído de um gel de agarose 1% com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham) e marcado utilizando o kit Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham), que produz sondas quimioluminescentes. Essas metodologias foram realizadas segundo as orientações do fabricante.

Sete microlitros do produto de amplificação das linhagens em que não foram visualizados fragmentos em gel de agarose, e quatro microlitros daquelas em que os fragmentos estavam presentes, foram novamente separados em gel de agarose 1% e lavados com soluções de desnaturação (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M) e de neutralização (NaCl 1,5M; Tris 0,5M), e transferidos para membrana de nylon em solução SSC 10X (citrato de sódio 0,15M; NaCl 1,5M). A hibridização com a sonda de *D. bifasciata* e a detecção seguiram o protocolo do kit Gene Images Detection Module (Amersham), segundo as especificações do produto. A membrana foi revelada por exposição a um filme autorradiográfico, durante 5 minutos à temperatura ambiente. A revelação e a fixação do filme foi realizada com o revelador Kodak KGBX Developer and Replenisher e o fixador Kodak KGBX Fixer and Replenisher, de acordo com o procedimento padrão.

3 – Reação de *Transposon Display*

A técnica *Transposon Display* é uma variação da técnica de AFLP e foi desenvolvida por Van den Broeck et al. (1998). Essa metodologia consiste na digestão do DNA genômico com uma endonuclease de restrição, ligação de adaptadores específicos para as seqüências das extremidades digeridas e, na realização de uma PCR, onde um iniciador ancora na região do adaptador e o outro (marcado radioativamente) ancora na extremidade da seqüência de interesse. Após a reação da PCR, os fragmentos produzidos são separados em um gel de poliacrilamida e expostos a um filme autorradiográfico para visualização dos amplificados. Os fragmentos amplificados consistem, dessa forma, de regiões genômicas adjacentes à

seqüência de interesse e, apresentam variação em seu comprimento de acordo com a localização dos sítios de restrição no DNA genômico.

Neste trabalho, a técnica *Transposon Display* foi utilizada com o objetivo de avaliar o número de inserções genômicas do elemento *P* tipo-O nas linhagens de *D. saltans* e *D. sturtevantii*, já que cada fragmento de tamanho diferente representará um local diferenciado de inserção do TE no genoma hospedeiro. Assim, pode-se considerar cada banda como uma inserção independente do TE. As linhagens analisadas foram as descritas na Tabela 1.

O protocolo realizado está de acordo com Ellis et al. (1998), com algumas modificações. Foram testados iniciadores que ancorassem em ambas extremidades do TE e duas endonucleases de restrição, *Pst* I e *Eco* RI. O melhor resultado foi o obtido com a seguinte condição: 500 ng de DNA genômico de cada linhagem digeridos com a endonuclease de restrição *Eco*RI, durante 15 horas, a 37 °C, em Tampão 1XRL (Tris-acetato 10 mM, pH 7,5; acetato de magnésio 10 mM; acetato de potássio 50 mM; DTT 5mM), em um volume final de 25 µl. Após a digestão, foram adicionados a cada reação 25µL de uma solução contendo ATP 0,2 mM, 1 pM adaptador *Eco* RI (1: CTCGTAGACTGCGTACC; 2: AATTGGTACGCAGTCTAC) e 1U T4 DNA Ligase (Promega) em tampão 1XRL, seguindo-se a incubação a 37 °C, por 4 horas. O volume final de 50µl foi diluído pela adição de 150 µl de tampão Tampão de Estabilização (Tris-HCl 10mM, EDTA 0,1mM pH 8) e armazenado a -20 °C até utilização.

Para a amplificação pela PCR foram utilizados 5 µL do volume total da solução de digestão / ligação do DNA genômico, sendo acrescentados 0,24 mM de dNTP, 50 ng do iniciador do adaptador (E00: GTAGACTGCGATCCAATTC), 50 ng do iniciador O-IR3TD (Figura 1 e Tabela 2) marcado com γ P³³ dATP (Amersham), MgCl₂ 3mM, 1,5U de Taq polimerase (Invitrogen) em tampão 1X em um volume total de 25 µL. Para a marcação do oligonucleotídeo radioativo, 35 ng do iniciador O-IR3S-SAP foram ligados a 1 µCi de γ P³³ dATP (Amersham) por 0,5U da enzima T4 Kinase (Invitrogen) durante 1 hora, a 37 °C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de poliacrilamida PAGE 6% (uréia 7M; TEMED 0,1%; persulfato de amônio 0,05% em TBE 1X) em TBE 1X (Tris 100 mM; ácido bórico 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8), sob potência constante de 40 W, durante 2 horas e 30 minutos. Após a migração, o gel foi transferido para papel Whatman 3 MM e seco à vácuo a 80°C durante 1 hora. Os padrões de bandas foram revelados por meio da exposição do gel a um filme autorradiográfico, em cassete à temperatura ambiente durante 10 dias. A revelação e a fixação do filme foi realizada com o revelador KodaK KGBX

Developer and Replenisher e o fixador Kodak KGBX Fixer and Replenisher, de acordo com o procedimento padrão.

As bandas produzidas em cada reação de amplificação foram analisadas diretamente no filme autorradiográfico, sobre transiluminador de luz branca, quanto à sua presença (1) e ausência (0). Todas as bandas nítidas que ocorressem no mínimo em uma linhagem foram consideradas e, a partir desses dados, uma matriz binária foi construída e interpretada em análises numéricas e filogenéticas.

4 – Clonagem e seqüenciamento do elemento *P* tipo-O de *D. saltans*

O fragmento amplificado durante a reação da PCR com os iniciadores O-IR5 e O-IR3, com aproximadamente 3 Kb (SAM-O) da linhagem SAM foi isolado do gel de agarose 1% e purificado com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham). A seguir, foi clonado no plasmídeo pCR®-XL-TOPO®, utilizando-se o TOPO® XL PCR Cloning kit (Invitrogen), específico para a clonagem e transformação de insertos com grandes dimensões. As condições seguidas foram as sugeridas pelo fabricante.

Os plasmídeos de 10 colônias foram extraídos pelo método “miniprep” segundo o FlexiPrep kit (Amersham), e testados para a presença do inserto, utilizando os iniciadores M13F e M13R (fornecidos no kit de clonagem) sob as seguintes condições: 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 1,25 mM de MgCl₂ e 0,5U de Taq polimerase (Invitrogen) em tampão 1X, submetidos a 95°C durante 10 minutos; 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias. Os amplificados foram corados com brometo de etídeo e separados a 90V em gel de agarose 1%.

Três purificados, onde se confirmou a presença do inserto, foram seqüenciados automaticamente (seqüenciador automático ABI 377). Devido à longa extensão da seqüência clonada, cinco iniciadores foram utilizados para que se obtivesse a seqüência completa do elemento (Figura 1 e Tabela 2). As combinações de iniciadores foram as seguintes: os pares M13F/M13R e O-IR5Sam2/O-IR3Sam1, e o iniciador O-IR3Sam2.

5 – Clonagem e seqüenciamento da extremidade 3' do elemento *P* tipo-O nas espécies dos subgrupos *saltans* e *sturtevantii*

a) Amplificação pela PCR: após a identificação do transposon *P* tipo-O nas linhagens do grupo *saltans*, a extremidade 3' do elemento foi amplificada em uma linhagem

de cada espécie nas quais o elemento foi identificado. As linhagens analisadas foram MEY, SMX, ARP, PMS e SAC.

Para a amplificação da região 3' o par de iniciadores O-e3/O-IR3 foi utilizado (Figura 2 e Tabela 2) e a reação foi realizada sob as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico em uma solução de 160 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 1,25 mM de $MgCl_2$ e 1U de Taq polimerase (Invitrogen) em tampão 1X, submetida a 95°C, durante 10 minutos; 30 ciclos de 95°C, por 1 minuto, 55°C, por 1 minuto e 72°C, por 1 minuto e, 10 minutos, a 72°C, para extensão final das cadeias. Os amplificados foram corados com brometo de etídeo e separados a 90V em gel de agarose 1%.

b) Clonagem e Sequenciamento: todos os fragmentos obtidos foram clonados no plasmídeo pCR®-TOPO® utilizando-se o kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. Dez colônias de cada placa foram testadas para a presença do inserto, utilizando os iniciadores M13F e M13R (fornecidos no Kit de clonagem) sob uma reação de PCR nas seguintes condições: metade de uma colônia em uma solução de 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 1,25 mM de $MgCl_2$ e 0,5U de Taq polimerase (Invitrogen) em tampão 1X, submetida a 95°C durante 10 minutos; 30 ciclos de 95°C, por 1 minuto, 56°C, por 1 minuto e 72°C, por 1 minuto e, 10 minutos, a 72°C, para extensão final das cadeias. Os amplificados foram corados com brometo de etídeo e separados a 90V em gel de agarose 1%.

Três colônias de cada placa, na qual se confirmou a presença do plasmídeo com o inserto, foram selecionadas ao acaso e tiveram seus plasmídeos extraídos pelo método de "miniprep" por lise alcalina do kit FlexiPrep (Amersham), segundo as especificações do fabricante. O sequenciamento automatizado dos insertos foi realizado no sequenciador automático ABI 377, utilizando os iniciadores M13F e M13R que anelam em regiões do plasmídeo que flanqueiam os fragmentos clonados.

6 – Análises Evolutivas

A partir das matrizes binárias derivadas da presença ou ausência de bandas específicas produzidas por meio da técnica *Transposon Display* foram construídas árvores de similaridade utilizando o método de *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987).

As seqüências de DNA produzidas foram manipuladas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e os alinhamentos realizados pelos programas Blast 2 Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) e Clustal W 1.81 (THOMPSON;



HIGGINS; GIBSON, 1994) ambos no formato *default* dos programas. Com os alinhamentos gerados foram realizadas análises filogenéticas utilizando o método de máxima parcimônia, usando o algoritmo *branch-and-bound*.

As análises de *neighbor-joining* e de máxima parcimônia foram realizadas com o programa PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD, 1997). A consistência dos ramos dos cladogramas foi testada por análise de *bootstrap* com 500 réplicas. Os índices de distância genética foram calculados pelo método de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980).



IV – RESULTADOS

Neste trabalho foram analisadas 23 linhagens de espécies do grupo *saltans* (nove espécies no total) quanto à ocorrência do elemento *P* tipo-O e o seu número de inserções genômicas em 9 linhagens geográficas de *D. sturtevantii* e 4 de *D. saltans*. Nas espécies que apresentaram inserções da subfamília O, uma linhagem foi selecionada para análise de seqüências de nucleotídeos.

A – Distribuição do elemento *P* tipo-O no grupo *saltans*

A reação de PCR com os iniciadores O-IR5 e O-IR3 e a hibridização dos produtos com a sonda do elemento *P* tipo-O de *D. bifasciata* demonstraram que a subfamília O está presente em três dos cinco subgrupos do grupo *saltans*: subgrupos *parasaltans*, *sturtevantii* e *saltans* (Figura 3).

Apenas *D. subsaltans* apresentou amplificação para o elemento *P* tipo-O no subgrupo *parasaltans*. O produto é maior que 2,9 Kb e visível somente por meio do *Southern blot* com a sonda para o elemento completo.

No subgrupo *sturtevantii*, foram obtidos amplificados correspondentes ao elemento completo apenas em *D. sturtevantii* (linhagem SMN), somente observáveis por meio da hibridização. Além disso, todas as linhagens de *D. sturtevantii* apresentaram fragmentos menores que 2,9 Kb, provavelmente correspondentes a cópias deletadas do elemento *P* tipo-O. Em *D. milleri*, foi identificado apenas um amplificado com comprimento superior a 2,9 Kb.

Analisando os resultados obtidos para o subgrupo *saltans*, podemos observar que apenas *D. saltans* tem um produto correspondente ao elemento completo, visível em gel de agarose. Todas as linhagens de *D. austrosaltans* e apenas uma de *D. prosaltans* (PE2) apresentaram fragmentos equivalentes ao elemento completo, porém, apenas observáveis por meio da hibridização com a sonda da seqüência *P* tipo-O de *D. bifasciata*. Ainda, as três espécies produziram vários fragmentos correspondentes a cópias defectivas, visíveis somente por meio da hibridização quimioluminescente e, um fragmento em *D. saltans* (SAM) visível em gel de agarose.

Na tentativa de identificar elementos completos em outras espécies do grupo, os conjuntos de iniciadores O-5Smi21/O-3Smi21 e O-5Smi21/O-IR3 foram testados (Figura 4). O primeiro par amplifica a região correspondente ao início do intron 1 até o final do exon 1 e, o segundo, a região inicial do intron 1 até a extremidade 3' da seqüência

completa do elemento *P* tipo-O. Em todas as espécies dos subgrupos *sturtevanti* e *saltans* foram produzidos fragmentos correspondentes à região intron 1/exon1. Nessas mesmas espécies, exceto em *D. milleri*, ocorrem fragmentos correspondentes à região intron 1/TIR 3' de seqüências completas (Figura 4). Estes resultados indicam a presença de cópias de cerca de 2,5 Kb da subfamília O em *D. sturtevanti*, *D. austrosaltans* e *D. prosaltans*, possivelmente completas. Contudo, essas cópias devem apresentar as TIRs 5' degradadas, devido a ausência de amplificação com os iniciadores que anelam na extremidade 5' do elemento (Figura 3). Novos iniciadores serão testados com o objetivo de amplificar a extremidade 5' o mais próximo possível da TIR e, desse modo, esclarecer se esses elementos são efetivamente completos.

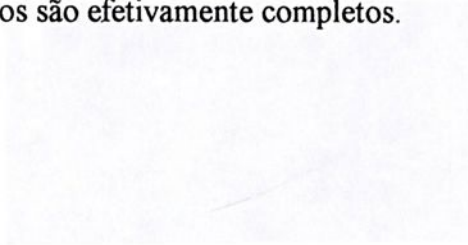


Figura 4. Resultados da amplificação do elemento P tipo-O por meio da técnica da PCR e do eletroforese em gel de agarose 2%. A) Amplificação do 2,5 Kb correspondente ao intron 1/exon 1. B) Amplificação do 2,5 Kb correspondente ao intron 1/TIR 3'. As condições de amplificação foram: 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s, 25 ciclos. Os produtos foram corados com o corante de etídio e visualizados sob luz UV. As bandas correspondentes à região intron 1/exon 1 e intron 1/TIR 3' são indicadas por setas. As condições de eletroforese foram: 100V, 100mA, 1h. As condições de coração foram: 100V, 100mA, 1h. As condições de visualização foram: 254nm.

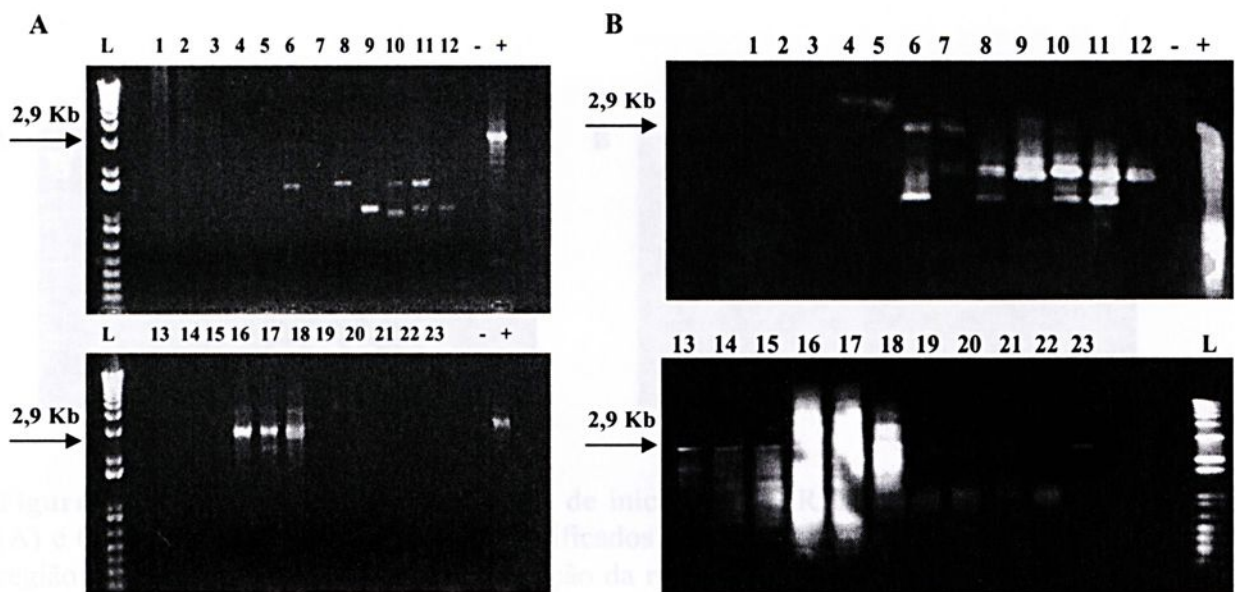


Figura 3. Identificação do elemento *P* tipo-O por meio da técnica da PCR e *Southern blot* com os iniciadores O-IR5 e O-IR3. A: amplificados de 2,9 Kb e fragmentos adicionais visualizados em gel de agarose 1%; B: Hibridização dos amplificados de A com a sonda construída a partir do elemento completo de *D. bifasciata*. (1: NEO; 2: EVC; 3: PAT; 4: SUB; 5: MEY; 6: SMX; 7: SPN; 8: SSR; 9: SMN; 10: SMI1; 11: SMI2; 12: SPG; 13: API; 14: ABB; 15: ARP; 16: SAC; 17: SAM; 18: SAG; 19: PTT; 20: PMI; 21: PBB; 22: PE1; 23: PE2; +: *D. bifasciata*; -: branco).

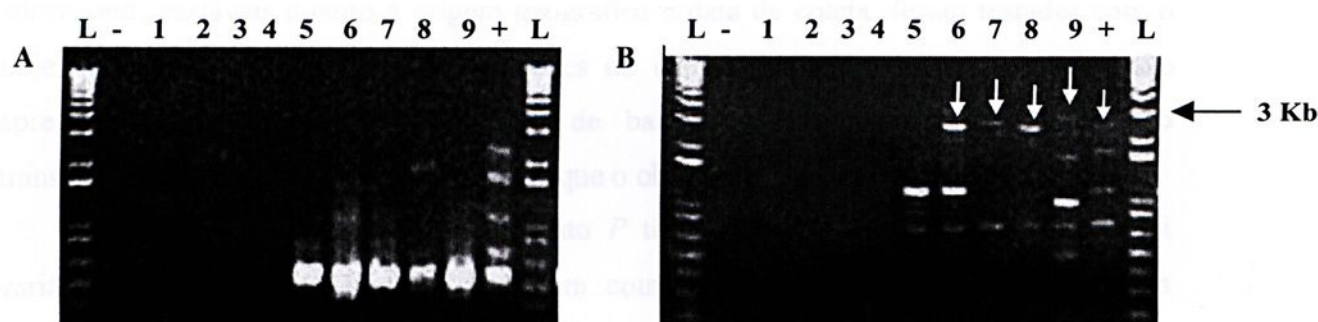


Figura 4. Reação da PCR com os pares de iniciadores OIR5Smi2-O12/OIR3Smi2-O12 (A) e OIR5Smi2-O12/OIR3 (B). A: Amplificados com cerca de 600 pb correspondentes a região do intron 1 e exon 1. B: Amplificação da região entre o intron 1 e TIR 3'; as setas brancas correspondem a possíveis seqüências *P* tipo-O completas (-: branco; 1: NEO; 2: EVC; 3: PAT; 4: SUB; 5: MEY; 6: SMX; 7: ARP; 8: SAM; 9: PMS; +: *D. bifasciata*).

B – Número de inserções do elemento *P* tipo-O em linhagens de *D. saltans* e *D. sturtevantii*

A técnica *Transposon Display* fornece informações a respeito do número de inserções genômicas de *transposons*. Cinco linhagens de *D. saltans* e nove de *D. sturtevantii*, variáveis quanto à origem geográfica e data de coleta, foram testadas com o objetivo de avaliar o número de inserções do elemento *P* tipo-O. Os resultados são apresentados na Figura 5 (o número de bandas observadas com o auxílio do transiluminador de luz branca foi maior do que o observado na Figura escaneada).

O número de inserções do elemento *P* tipo-O nas linhagens de *D. saltans* foi variável, sendo SAC (México) a linhagem com o menor (4) e SAG (Guatemala) a linhagem com o maior número de inserções (28). As linhagens SSR (Minas Gerais – Brasil), SMN (Rio de Janeiro – Brasil) e SPG (Paraguai) de *D. sturtevantii* apresentaram apenas três inserções e SMX (México) foi a linhagem que apresentou o maior número de cópias do elemento *P* tipo-O (18).

Com o objetivo de analisar as relações entre a localização das inserções genômicas do *transposon P* tipo-O e a distribuição geográfica de *D. saltans* e *D. sturtevantii* foram construídos dois fenogramas, utilizando-se uma matriz derivada do padrão de bandejamento da análise de *display* entre linhagens dessas duas espécies. A presença e ausência de bandas específicas foram consideradas como caracteres. O total e as proporções das diferenças entre as linhagens estão relacionadas nas Tabelas 3 e 4.

A árvore que representa as distâncias entre as linhagens de *D. sturtevantii* revelou três agrupamentos (Figura 6). No primeiro, estão contidas as linhagens procedentes do México (SMX), Costa Rica (SCR), Colômbia (SCO) e do Estado do Rio de Janeiro – BR (SMN); a linhagem SSR (coletada em Minas Gerais – BR) não está contida neste agrupamento, porém apresenta apenas 6% de divergência em relação à linhagem do Rio de Janeiro. No segundo agrupamento estão presentes as linhagens provenientes do estado de São Paulo (SRP e SMI) e, no terceiro, as linhagens coletadas no Rio Grande do Sul – BR (SMQ) e no Paraguai (SPG). Os agrupamentos refletem claramente a distribuição geográfica das populações de *D. sturtevantii*.

Quanto às relações de similaridade das linhagens de *D. saltans* também pode-se observar a mesma associação entre a localização das inserções genômicas com a distribuição geográfica das espécies (Figura 6). Dois agrupamentos foram formados, o primeiro reúne as linhagens procedentes do México (SAC, SAM e SAH) e o segundo as da América Central (SAS – El Salvador e SAG – Guatemala).

Tabela 3. Proporção de diferenças (acima) e número total de diferenças (abaixo) do número de inserções do elemento *P* tipo-O entre linhagens de *D. saltans*.

	1	2	3	4	5	6
1 SCR	-	0,27	0,25	0,22	0,29	0,40
2 SAM	26	-	0,15	0,14	0,25	0,39
3 SAH	24	14	-	0,09	0,19	0,30
4 SAC	21	13	9	-	0,18	0,31
5 SAS	28	24	18	17	-	0,26
6 SAG	39	37	29	30	25	-

Tabela 4. Proporção de diferenças (acima) e número total de diferenças (abaixo) do número de inserções do elemento *P* tipo-O entre linhagens de *D. sturtevantii*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 SAC	-	0,23	0,22	0,18	0,07	0,07	0,18	0,11	0,09	0,07
2 SMX	22	-	0,26	0,22	0,22	0,16	0,28	0,26	0,24	0,22
3 SCR	21	25	-	0,25	0,19	0,17	0,27	0,25	0,23	0,21
4 SCO	17	21	24	-	0,15	0,12	0,25	0,19	0,17	0,17
5 SSR	7	21	18	14	-	0,06	0,18	0,10	0,08	0,06
6 SMN	7	15	16	12	6	-	0,17	0,10	0,08	0,06
7 SMI	17	27	26	24	16	16	-	0,19	0,17	0,17
8 SRP	11	25	24	18	10	10	18	-	0,10	0,10
9 SMQ	9	23	22	16	8	8	16	10	-	0,06
10 SPG	7	21	20	16	6	6	16	10	6	-

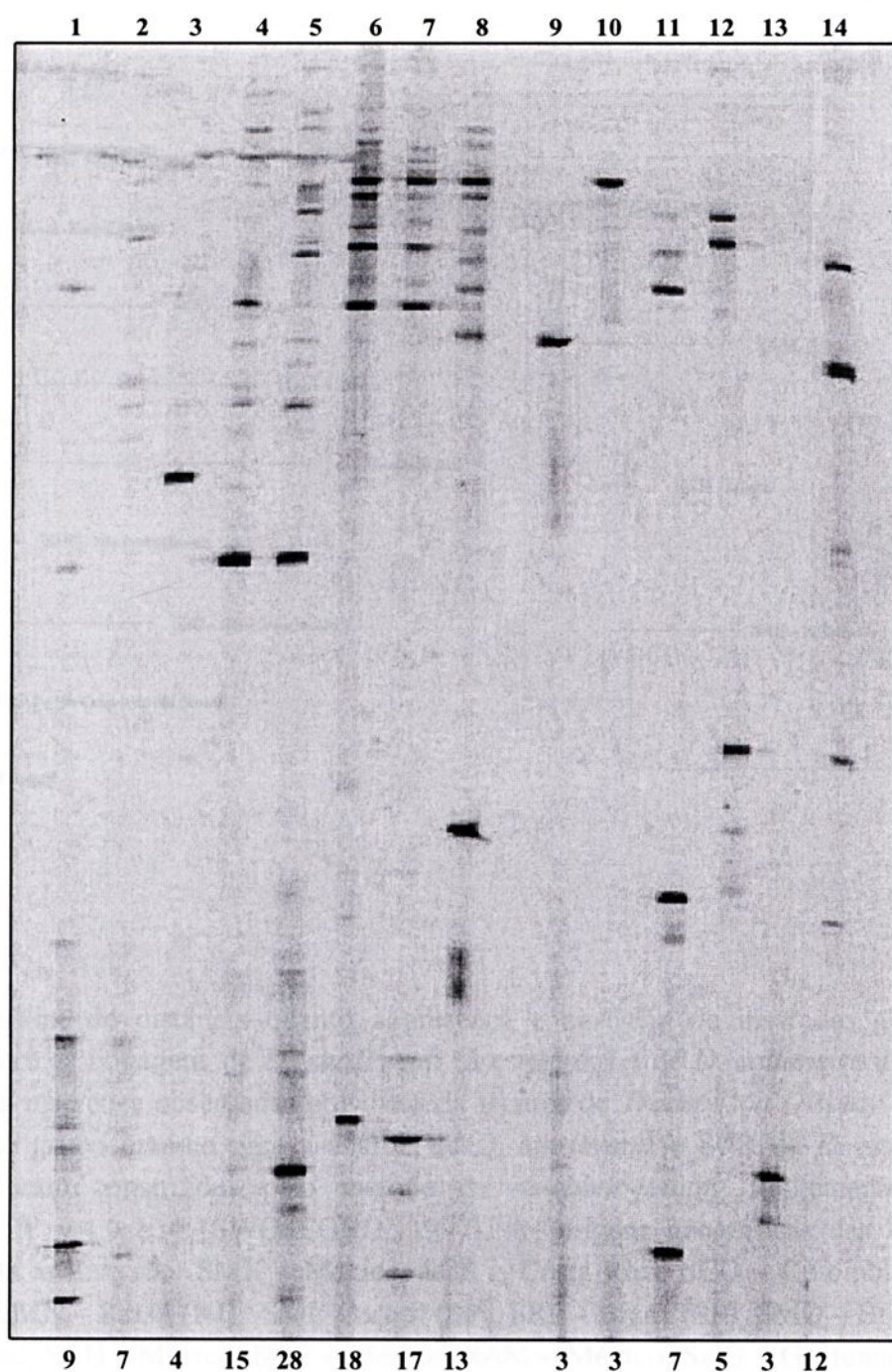


Figura 5. *Transposon Display* exibindo os números inserções genômicas do elemento transponível *P* tipo-O em linhagens de *D. saltans* e *D. sturtevantii*. As bandas na autorradiografia representam inserções em sítios particulares do genoma. Os números totais de inserções em cada linhagem são indicados na parte inferior da figura (1: SAM; 2: SAH; 3: SAC; 4: SAS; 5: SAG; 6: SMX; 7: SCR; 8: SCO; 9: SSR; 10: SMN; 11: SRP; 12: SMQ; 13: SPG; 14: SMI).

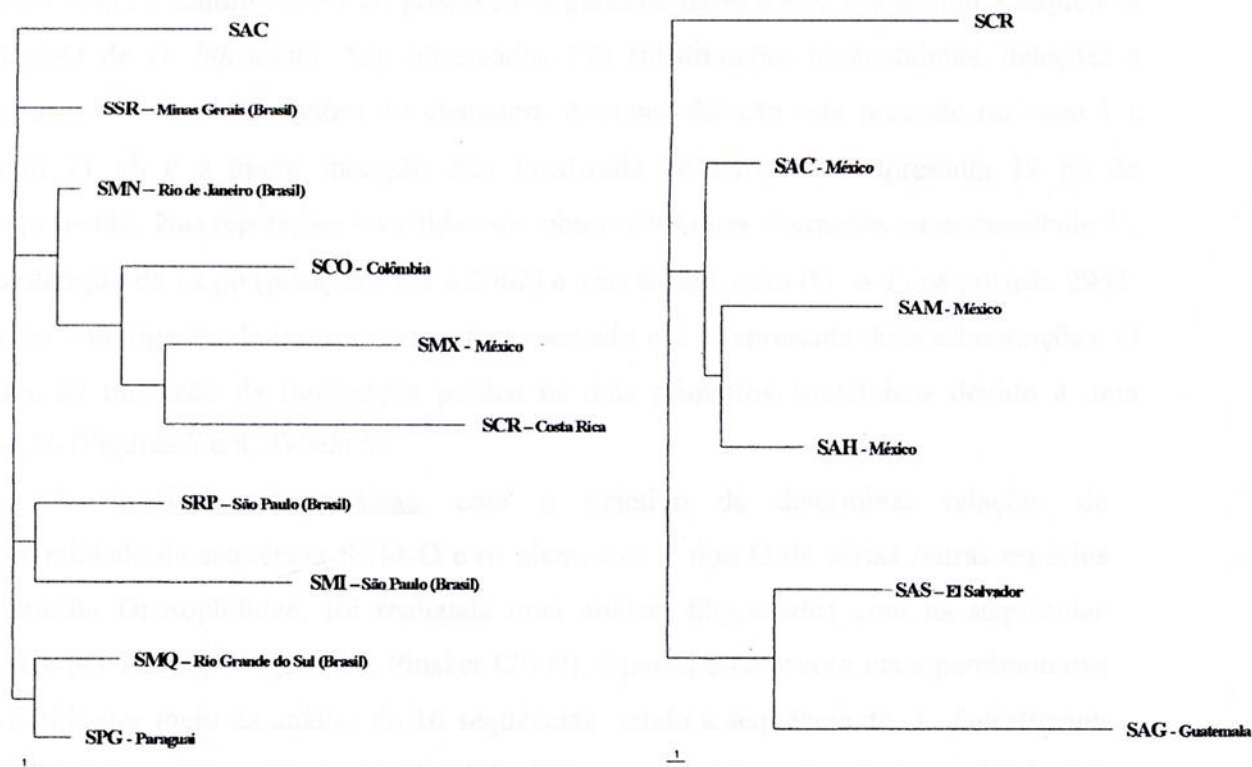


Figura 6. Análise de distância quanto à presença e ausência de inserções genômicas específicas entre as linhagens de *D. sturtevantii* (à esquerda) e de *D. saltans* (à direita) de acordo com as inserções observadas por meio da técnica de *Transposon Display*. SAC foi utilizada como grupo externo para a análise de *D. sturtevantii* e SCR de *D. saltans*. Os fenogramas foram construídos pelo método de *neighbor-joining* implementado pelo programa PAUP v.4.0 b10 (SWOFFORD, 1997). As origens geográficas das linhagens utilizadas nesta análise são: SMX – México, SCR – Costa Rica, SCO – Colômbia, SSR – Brasil (MG), SMN – Brasil (RJ), SMI – Brasil (SP), SRP – Brasil (SP), SMQ – Brasil (RS), SPG – Paraguai, SAH – México, SAC – México, SAM – México, SAG – Guatemala e SAS – El Salvador.

C – Análise de uma sequência *P* tipo-O de *D. saltans*

a) Caracterização da sequência: o fragmento amplificado com os iniciadores O-IR5 e O-IR3 em *D. saltans* (SAM-O) possui 2778 pares de bases e é 92,8% similar à sequência *P* tipo-O de *D. bifasciata*. São observadas 196 substituições nucleotídicas, deleções e inserções em todas as regiões do elemento. A maior deleção está presente no exon 1 e possui 71 pb e a maior inserção está localizada no intron 1 e apresenta 12 pb de comprimento. Nas repetições invertidas são observadas duas alterações na extremidade 3', uma deleção de 12 pb (posição 2951 a 2962) e uma substituição (G → T) na posição 2941. O sítio 5' de ligação da transposase está conservado e o 3' apresenta duas substituições. O códon de iniciação da transcrição perdeu os dois primeiros nucleotídeos devido a uma deleção (Figuras 7 e 8, Tabela 5).

b) Análises filogenéticas: com o objetivo de determinar relações de ancestralidade da sequência SAM-O e os elementos *P* tipo-O de várias outras espécies da família Drosophilidae, foi realizada uma análise filogenética com as sequências obtidas por Haring; Hagemann; Pinsker (2000). Apenas uma árvore mais parcimoniosa foi obtida por meio da análise de 16 sequências, sendo a sequência de *L. fenestrarum* utilizada como grupo externo. Um total de 891 caracteres correspondentes ao início dos *transposons*, excluindo a região dos iniciadores, foi utilizada na análise; desses, 71 caracteres são informativos. O índice de consistência foi igual a 0,9496 e o índice de retenção igual a 0,9557 (Tabela 6, Figura 9).

A topologia da árvore revela três clados e três ramos não resolvidos, nesses ramos estão contidos os elementos de *L. miki*, *L. stackelbergi* e *S. pallida*. O primeiro clado reúne *L. magnipectinata* e *S. okadai* e o segundo agrupa *D. imaii* e *D. bifasciata*. O terceiro clado se repete em 100% das réplicas e contém *D. athabasca*, *D. affinis*, *D. azteca*, *D. willistoni*, *D. nebulosa*, *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. austrosaltans*. Dentro desse clado existem dois agrupamentos, o primeiro abriga as espécies do grupo *willistoni* e o segundo as do grupo *saltans*; as espécies do grupo *obscura* não participam desses agrupamentos. O cálculo da distância (Tabela 6) por meio do método Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) demonstra que a sequência mais divergente em relação à de *D. saltans* é a de *D. imaii* (índice igual a 0,112) e a sequência de *D. austrosaltans* é idêntica à de *D. saltans*.

Tabela 5. Deleções (del) e inserções (ins) do elemento *P* tipo-O de *D. saltans* em relação à sequência de *D. bifasciata* (X71634). Os números representam os comprimentos (em nucleotídeos) de cada alteração. Hífens indicam que os eventos continuam nas regiões adjacentes. ^a Comprimento (em nucleotídeos) das regiões do elemento *P* tipo-O de *D. bifasciata* (I: intron; E: exon; TIR: invertido terminal).

		Regiões do elemento <i>P</i> tipo-O								
Sequência		TIR 5'	E 0	I 1	E 1	I 2	E 2	I 3	E 3	TIR
		(172)	(280)	(89)	(679)	(67)	(725)	(185)	(584)	3'
SAM-O	del	31-	-2; 1; 1; 3	3	71; 10; 24	0	32; 40	2	9; 11; 3	1; 12
	ins	1	1	12; 1	0	7; 1	0	2; 3	8; 1; 1; 4	1

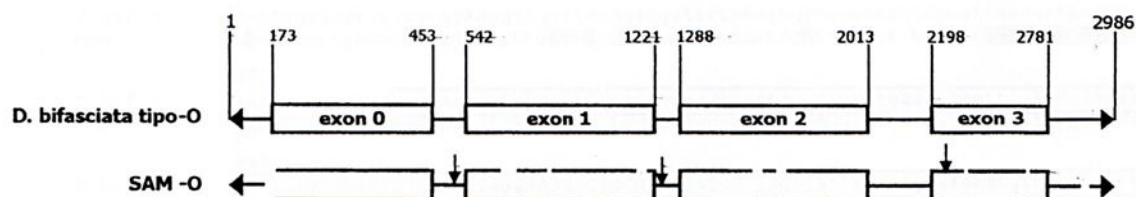


Figura 7. Representação esquemática das principais mutações (≥ 5 pb) de SAM-O em relação à sequência *P* tipo-O de *D. bifasciata*. As regiões interrompidas representam deleções e as setas verticais representam as inserções.

D.bif-O	1	80
SAM-O	CATGGCAAAAcgagtgcccttcgTAAGGTAGTCTACTCGGCTGCCcttgccttcgggtttACTAGCTCTTtggccagtgc	
	-----CATGGCAAAAcgagtgcccttcgTAAGGTAGTCTACTCGGCTGCCcttgccttcgggtttACTAGCTCTTtggccagtgc	
	Iniciador O-IR5	Sítio de Ligação da Transposase
D.bif-O	81	160
SAM-O	c-tttgcttgcaaaagtgaaggttggttacggacgattttttctcgttttatttttcgcattaaccctaacgtgttcaa	
	cgtttgccttgcaaaagtgaaggttggttacggacgattttttctcgttttatttttcgcattaaccctaacgtgttcaa	
D.bif-O	161	240
SAM-O	aaaaaagaaaaatgaactattgttatttttgcgcgaagaatgtaccggcggtgaaaaatcattcatgccccgaaatgtg	
	-----aaactatttctacttttgcgcgaagaatgtaccggcggtgaaaaatcattcatgccccgaaatgtg	
D.bif-O	241	320
SAM-O	aaatgaagagaaagctgtgggaggaagcctgggtgcagcc-taagcaaaaattcccaaatatgtgatacacattttaa	
	atctgaagagaaagctgtacgaggaagcctggagtgagcc-ttagtaaaaattcccaaatatgtgatacacattttag	
D.bif-O	321	400
SAM-O	-tgcgcttc-agtggaggactgc-cctcaagggaagatttataagaagagacgcttaacaatgatgccgttccgcaaa	
	-tgcgcttc-agtggaggactgctcc-caagggaagatttataaga-gacgctttaacaatgatgccgttccgcaaa	
D.bif-O	401	480
SAM-O	gagagaaagaggtgaaagtgttaagaaggctatgctaagccagtcaggaaactga	
	tagagaaagagaaagaaagtgttaagaaggctagcttaatgcgagtgccgaaactgagtaagtttagcctgtgaaa	
D.bif-O	481	560
SAM-O	atatgtacatatattttctttttgtacatatggatggatat-----gtaaca-taatgaaactgtctgttag	
	atatacatatattttctttttgtacatatgcatgtatatatgtacatatatgtaacaataatgaaactgtctgttag	
D.bif-O	561	640
SAM-O	gacacagtgtataaatcattcaacgtccatggaataaagactctgaggcaaaagattcgtgctttggaggatgaagtaca	
	gacgagtgataaatcattcaacgtccatggaataaagactctgaggcaaaagattcgtgctttggaggatgaagtaca	
D.bif-O	641	720
SAM-O	gagcttacgtaagctcgtagaggacgcaagccagttagagaaatcttaagtaccatcttactcagaccctaaataaaa	
	gagcttacgtaagctcgtagaggacgca-----	
D.bif-O	721	800
SAM-O	ttttaagagtggtggaagaggtcagaatttaattcagatgacatatcatgggctatgtgcctccatccgcaggtcct	
	-----gaggtcagaattcaattcagatgacatatcatgggctatgtgcctccatccgcaggtcct	
D.bif-O	801	880
SAM-O	agggcatataaacatctgtacaaaaaggatttccattacctgtcgggcaacattatacaagtggtgtcaaacgtgga	
	ggga-----ttgtacaaaaaggatttcccttactttgtcgggcaacattatacaagtggtgtcaaacgtgga	
D.bif-O	881	960
SAM-O	aatacagactggttgccgtggtgtggtcatcgatcttatggacaatatggacatggatacggcagataagctttgcgtat	
	aataagactggttgccgtggtgtggtcatcgatcttatggacaatatggacatggatacggcagataagctttgcgtat	
D.bif-O	960	1040
SAM-O	tagcattcgacgaaatgaaggttgctggttacattcgagtcagacagctcgccggatctgtatcacgaccaagcgaatac	
	tggcattcgacgaaatgaaggttgctggttacattcgagtcagacagctcgccggatctgtatcacgaccaagcgaatac	
D.bif-O	1041	1120
SAM-O	gtgcaacttgcatggttcgaggattgaaaaaatcgtggaagcaaccagtggtcttcgactatgataccagaatggacgt	
	gtgaacttgcatggttcgaggattgaaaaaatcgtggaagcaaccagtggtcttcgactatgataccagaatggacgt	
D.bif-O	1121	1200
SAM-O	gccaaactctttatgaattaataaaaaaactacacagaagagatatttttggtatcaattgtctccgatatgggtgctg	
	gccaaactctttatgaattaataaaaaaactacacagaagagatatttttggtg-----ctg	
D.bif-O	1201	1280
SAM-O	gaaaccaaagattatggagagagctcggtatatctgaaggtaaagtatat-----tcttattatgaatgaaatcaaag	
	gaaaccaaagattatgaagagagctcggtatatctgaaggtaaagtatatgaataatcttattatgaatgaaatcaaag	
D.bif-O	1281	1360
SAM-O	ata-gttgttaatttttttaatttaca-----attagaaaaaacctgggttggccatcccgaggatgaagatctgaaa	
	ataagtttttaatttttttaatttaca-----tttagaaaaaacctgggttggccatcccgaggatgaagatctgaaa	
D.bif-O	1361	1440
SAM-O	attttcgtgttttcagatgcaccacatctaataaagctg-gttcgttaaccattattttggctacaggtttacatataaacg	
	attttcgtgttttcagatgcaccacatctaataaagctg-gtgcataaccattattttggattatggtttacatataaacg	
D.bif-O	1441	1520
SAM-O	gacaaacattgaccaagtgcactgtcgaaacaaactataactcactgttgtaaaacagatgtaacaatattgttcaaagta	
	gacaaacattgaccaagtgcactgtcgaaacaaactataactcactgttgtaaaacagatgtaacaatattgttcaaagta	
D.bif-O	1521	1600
SAM-O	aatgagagccattttaaagtgtcgctcctttgccaagcaaaaggtcaaatagcaacacaaatttttgaatacaaccgc	
	aatgagagccattttaaagtgtcgctcctttgccaagcaaaaggtcaaatagcaacacaaatttttgaatacaaccgc	
D.bif-O	1601	1680
SAM-O	gagtgccatcagacgctgctactcttttagctatcaagttgaaaatgcagtcgaaacctcgattttatttaaactcctca	
	-----tatcaaatgaaaaagcagtcgaaacctcgattttatttaaactcctca	
D.bif-O	1681	1760
SAM-O	acgatttggttcgacgttttcaattcaaagctgtcaacgtccaactgcacgaaactactcagccttatggcaagcagctc	
	acgatttggttcgacgttttcaattcaaagctgtcaacgtccaactgcacgaaactactcagccttatggcaagcagctc	

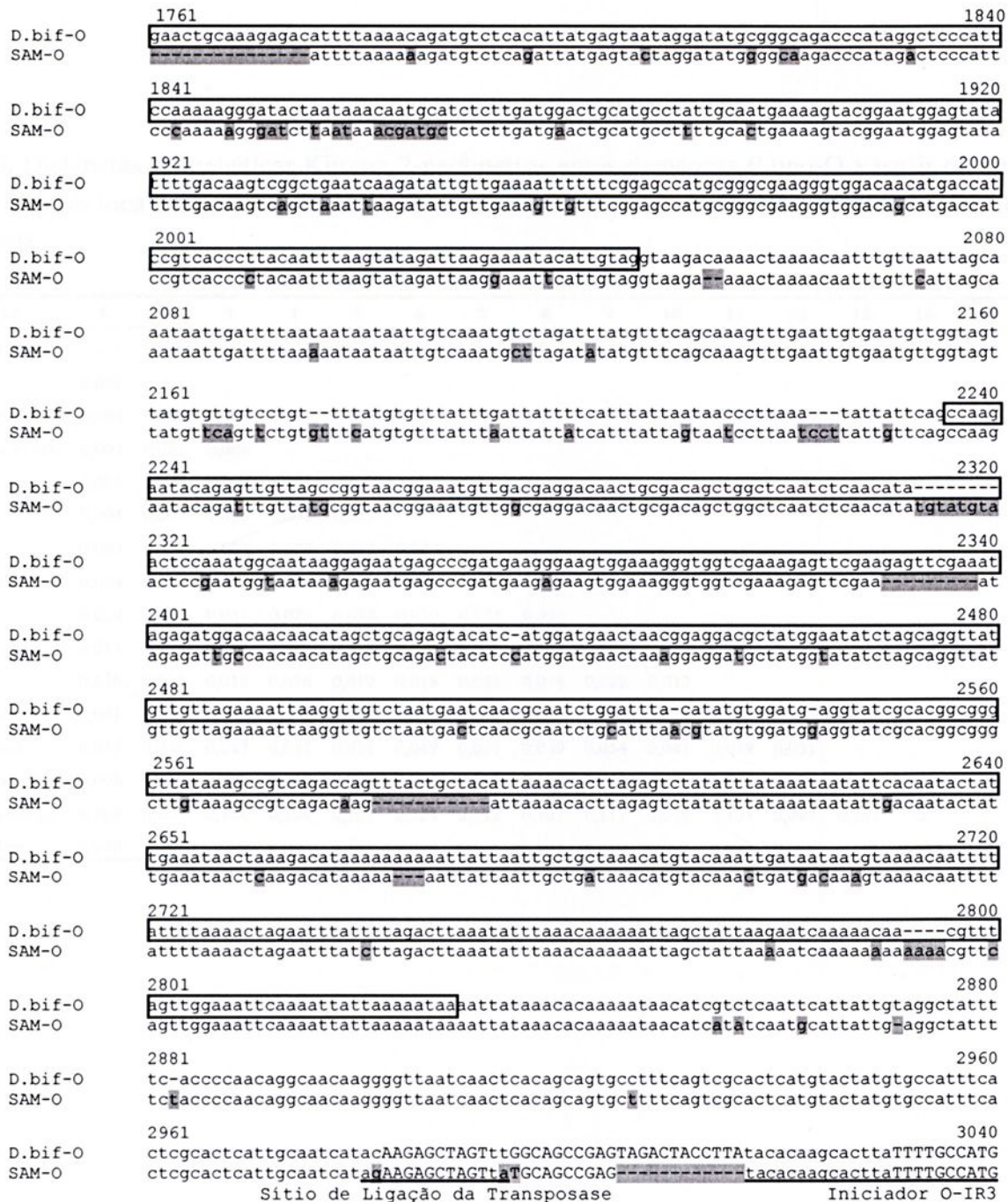


Figura 8. Alinhamento entre as seqüências P tipo-O de *D. bifasciata* e de *D. saltans*. As TIRs e as SIRs estão representadas por letras maiúsculas, as caixas cinza correspondem às regiões divergentes em relação ao elemento de *D. bifasciata*, caixas vazias às ORFs de *D. bifasciata* e as seqüências sublinhadas nas extremidades do alinhamento são correspondentes à região de anelamento dos iniciadores usados na sua amplificação e ao sítio de ligação da transposase.

Tabela 6. Distâncias filogenéticas Kimura 2-parâmetros entre elementos *P* tipo-O a partir de uma seção de 891 pb localizados a partir da extremidade 5' dos TEs. A região dos iniciadores não foi considerada.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>L. fenestrarum</i>	-														
2 <i>L. miki</i>	0,001	-													
3 <i>L. stackelbergi</i>	0,004	0,003	-												
4 <i>L. magnipectinata</i>	0,003	0,001	0,004	-											
5 <i>S. pallida</i>	0,005	0,004	0,007	0,005	-										
6 <i>S. okadai</i>	0,004	0,003	0,005	0,001	0,007	-									
7 <i>D. imaii</i>	0,007	0,005	0,005	0,005	0,012	0,007	-								
8 <i>D. bifasciata</i>	0,004	0,003	0,005	0,004	0,007	0,005	0	-							
9 <i>D. azteca</i>	0,029	0,027	0,031	0,029	0,032	0,030	0,028	0,030	-						
10 <i>D. athabasca</i>	0,012	0,011	0,014	0,012	0,015	0,014	0,016	0,014	0,021	-					
11 <i>D. affinis</i>	0,016	0,015	0,018	0,016	0,019	0,018	0,021	0,018	0,022	0,012	-				
12 <i>D. willistoni</i>	0,041	0,040	0,043	0,041	0,044	0,043	0,053	0,043	0,043	0,036	0,034	-			
13 <i>D. nebulosa</i>	0,047	0,046	0,047	0,048	0,051	0,049	0,051	0,049	0,054	0,041	0,039	0,031	-		
14 <i>D. saltans</i>	0,098	0,096	0,098	0,098	0,100	0,098	0,112	0,100	0,109	0,092	0,097	0,094	0,108	-	
15 <i>D. austrosaltans</i>	0,104	0,103	0,104	0,104	0,107	0,104	0,112	0,107	0,117	0,099	0,103	0,099	0,107	0	-
16 <i>D. prosaltans</i>	0,099	0,097	0,099	0,099	0,101	0,099	0,100	0,101	0,010	0,093	0,096	0,095	0,107	0,053	0,058

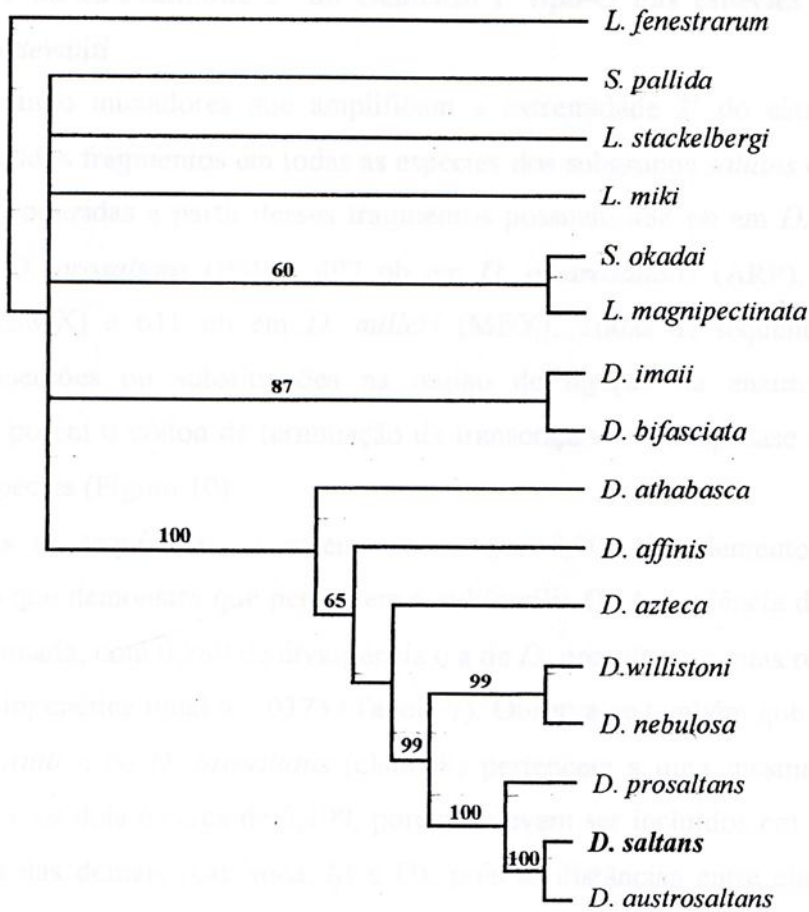


Figura 9. Relações filogenéticas entre as seqüências *P* tipo-O de *D. saltans* (SAM-O) obtida neste trabalho e as de Haring; Hagemann; Pinsker (2000). As seqüências utilizadas no alinhamento estão localizadas na extremidade 5' dos *transposons*. Os números de acesso no GenBank das seqüências de Haring; Hagemann; Pinsker (2000) são: *L. fenestrarum* - AF313777.1, *L. miki* - AF313779.1, *L. stackelbergi* - AF313783.1, *S. pallida* - AF313781.1, *L. magnipectinata* - AF313778.1, *S. okadai* - AF313784.1, *D. imaii* - X84974.1, *D. bifasciata* - X71634, *D. athabasca* - AF313775.1, *D. affinis* - AF313774.1, *D. azteca* - AF313785.1, *D. willistoni* - AF313786.1, *D. nebulosa* - AF313780.2, *D. prosaltans* - AF313782.1 e *D. austrosaltans* - AF313776.1. Para a análise de máxima parcimônia foi utilizado o algoritmo *branch-and-bound*. Dos 891 caracteres, 765 foram constantes, 55 não-informativos e 71 foram informativos. O índice de consistência foi 0,9496 e o índice de retenção foi igual a 0,9557. A análise de *bootstrap* foi realizada com 500 réplicas.

D – Análise da extremidade 3' do elemento *P* tipo-O nas espécies dos subgrupos *saltans* e *sturtevantii*

Utilizando iniciadores que amplificam a extremidade 3' do elemento *P* tipo-O foram produzidos fragmentos em todas as espécies dos subgrupos *saltans* e *sturtevantii*. As seqüências produzidas a partir desses fragmentos possuem 488 pb em *D. saltans* (SAC), 469 pb em *D. prosaltans* (PMS), 497 pb em *D. austrosaltans* (ARP), 495 pb em *D. sturtevantii* (SMX) e 611 pb em *D. milleri* (MEY). Todas as seqüências apresentam deleções, inserções ou substituições na região de ligação da enzima IRBP ou da transposase, porém o códon de terminação da transcrição da transposase está conservado nas cinco espécies (Figura 10).

Todas as seqüências divergem menos que 0,300 do elemento tipo-O de *D. bifasciata*, o que demonstra que pertencem à subfamília O. A seqüência de *D. milleri* é a menos relacionada, com 0,280 de divergência e a de *D. prosaltans* a mais relacionada, com a distância filogenética igual a 0,0373 (Tabela 7). Observa-se também que os elementos *P* de *D. sturtevantii* e de *D. prosaltans* (clado F) pertencem a uma mesma subfamília. A distância entre os dois é cerca de 0,199, portanto devem ser incluídos em uma subfamília independente das demais (canônica, M e O), pois as distâncias entre eles encontram-se entre 0,464 e 0,717 (Figura 11).

Para analisar as relações entre essas seqüências, os elementos *P* tipo-O e M de *D. bifasciata* e as seqüências de *D. sturtevantii* e *D. prosaltans* obtidas por Castro; Carareto (2004d) foi realizada uma análise de parcimônia, onde o elemento *P* canônico de *D. melanogaster* foi utilizado como grupo externo. Apenas uma árvore mais parcimoniosa foi obtida por meio da análise de 509 caracteres, excluindo a região dos iniciadores, onde 195 caracteres foram informativos. O índice de consistência foi igual a 0,8302 e o índice de retenção igual a 0,7429 (Figura 11). A árvore de máxima parcimônia revela um clado consistente (*bootstrap* igual a 100%) que se ramifica em outros dois também com *bootstrap* de 100%. No primeiro clado estão agrupadas as seqüências *P* tipo-O de *D. prosaltans*, *D. austrosaltans*, *D. saltans*, *D. sturtevantii*, *D. milleri* e *D. bifasciata*. Nesse mesmo clado ocorre uma segunda ramificação que separa as seqüências do subgrupo *sturtevantii* daquelas do subgrupo *saltans* e de *D. bifasciata*. No segundo clado estão agrupadas as seqüências tipo F de *D. sturtevantii* e *D. prosaltans* (*bootstrap* igual a 100%).

Tabela 7. Distâncias filogenéticas calculadas por meio do método de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) entre as extremidades 3' dos elementos *P* tipo-O, M, canônico e F.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>D. melanogaster</i>	-								
2 <i>D. bifasciata</i> M	0,206	-							
3 <i>D. bifasciata</i> O	0,414	0,430	-						
4 <i>D. milleri</i> O	0,670	0,689	0,280	-					
5 <i>D. sturtevantii</i> O	0,513	0,556	0,171	0,290	-				
6 <i>D. austrosaltans</i> O	0,445	0,481	0,056	0,317	0,202	-			
7 <i>D. prosaltans</i> O	0,446	0,500	0,037	0,304	0,180	0,067	-		
8 <i>D. saltans</i> O	0,427	0,481	0,055	0,301	0,208	0,080	0,055	-	
9 <i>D. prosaltans</i> F	0,490	0,491	0,445	0,699	0,552	0,520	0,504	0,477	-
10 <i>D. sturtevantii</i> F	0,464	0,472	0,487	0,718	0,567	0,556	0,548	0,520	0,199

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

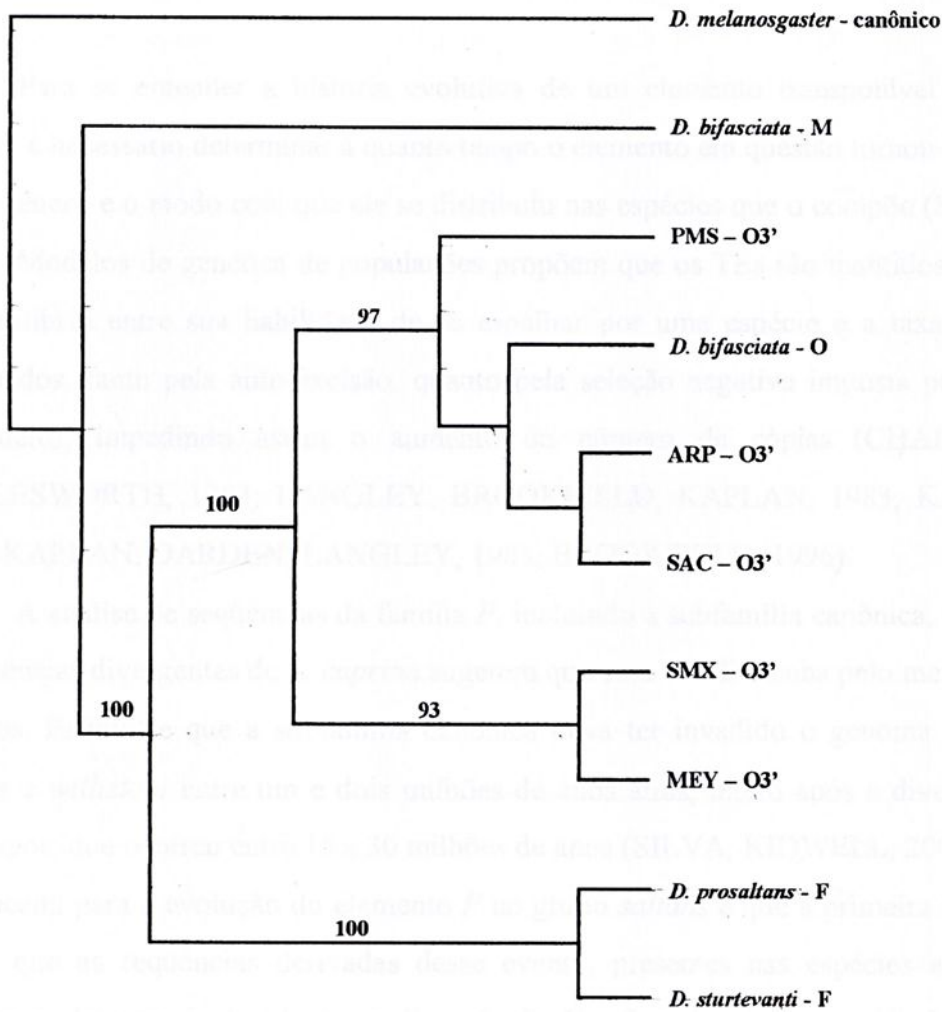


Figura 11. Análise filogenética de elementos *P* tipo-O, M e F. Este cladograma foi gerado pelo método da máxima parcimônia implementado pelo programa PAUP 4.0 b10 (SWOFFORD, 1997). Dentre os 509 caracteres analisados, 195 eram constantes, 119 não-informativos e 195 eram informativos. O índice de consistência foi igual a 0,8302 e o índice de retenção foi igual a 0,7429. A sequência do elemento *P* canônico de *D. melanogaster* foi utilizada como grupo externo e a consistência dos ramos foi testada pela análise de *bootstrap* com 500 réplicas. (PMS: *D. prosaltans*; ARP: *D. austrosaltans*; SAC: *D. saltans*; SMX: *D. sturtevantii*; MEY: *D. milleri*).

V – DISCUSSÃO

Para se entender a história evolutiva de um elemento transponível dentro de um gênero, é necessário determinar a quanto tempo o elemento em questão tornou-se estabelecido nesse gênero e o modo com que ele se distribuiu nas espécies que o compõe (STACEY et al., 1986). Modelos de genética de populações propõem que os TEs são mantidos em um estado de equilíbrio entre sua habilidade de se espalhar por uma espécie e a taxa pela qual são eliminados, tanto pela auto-excisão, quanto pela seleção negativa imposta pelo genoma do hospedeiro, impedindo assim o aumento do número de cópias (CHARLESWORTH; CHALESWORTH, 1983; LANGLEY; BROOKFIELD; KAPLAN, 1983, KAPLAN et al., 1988; KAPLAN; DARDEN; LANGLEY, 1985; BROOKFIELD, 1996).

A análise de seqüências da família *P*, incluindo a subfamília canônica, a subfamília O e seqüências divergentes de *L. cuprina* sugerem que essa família tenha pelo menos 40 milhões de anos. Estima-se que a subfamília canônica deva ter invadido o genoma dos subgrupos *saltans* e *willistoni* entre um e dois milhões de anos atrás, muito após a divergência desses subgrupos, que ocorreu entre 15 a 30 milhões de anos (SILVA; KIDWELL, 2000). A hipótese mais aceita para a evolução do elemento *P* no grupo *saltans* é que a primeira invasão foi tão antiga que as seqüências derivadas desse evento, presentes nas espécies atuais, não são facilmente detectáveis devido à sua divergência. Em face do número variável de inserções e da presença de mais de uma subfamília de elementos assume-se que ondas de transferência horizontal teriam ocorrido posteriormente, introduzindo as seqüências canônicas (CLARK; KIDWELL, 1997; HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000; CASTRO; CARARETO 2004 c,d), as do tipo-O (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 2000) e as agrupadas no clado F de Clark; Kidwell (1997) de *D. prosaltans* e *D. sturtevantii* (CASTRO; CARARETO, 2004d).

O primeiro objetivo deste trabalho, verificar a ocorrência da subfamília O do elemento *P* tipo-O em todas as espécies disponíveis para a análise do grupo *saltans*, revelou que ela está presente em três de seus cinco subgrupos: subgrupos *parasaltans*, *sturtevantii* e *saltans*.

Até recentemente assumia-se que as espécies dos subgrupos *cordata* (*D. neocordata*) e *elliptica* (*D. emarginata*) não abrigavam elementos da família *P* em seus genomas (DANIELS et al., 1990; CLARK; KIDWELL, 1997). Entretanto, Castro; Carareto (2004a) demonstraram que as espécies desses subgrupos contêm seqüências *P*, muito divergentes, somente

detectáveis após o uso de sondas especiais, que devem ser derivadas das seqüências ancestrais. No presente estudo, os oligonucleotídeos e as sondas também não permitiram detectar a subfamília O nesses dois subgrupos de espécies; entretanto, em face do exposto não podemos excluir a possibilidade da existência de seqüências *P* tipo-O, muito divergentes, no genoma dessas espécies.

Em *D. subsaltans* e *D. milleri*, a subfamília O foi identificada por meio da técnica de *Southern blot*, na forma de um fragmento com tamanho superior ao do elemento completo. Essa cópia deve corresponder a uma seqüência com inserções ao longo do *transposon*. A presença de seqüências completas ou defectivas, apenas visíveis por meio da hibridização, pode ser atribuída à baixa complementaridade dos iniciadores que anelam nos invertidos terminais com as seqüências do elemento *P* tipo-O do grupo *saltans*. A baixa complementaridade pode ser explicada pela divergência entre os elementos de *D. bifasciata* e os do grupo *saltans*, já que o par de iniciadores utilizado foi construído a partir da seqüência de *D. bifasciata*.

A única espécie na qual se conseguiu isolar um TE com tamanho aproximado ao do elemento *P* tipo-O completo foi *D. saltans*. Essa seqüência acumula substituições e mutações, dentre elas, uma que elimina o códon de iniciação da transcrição da transposase. No entanto, nas espécies *D. sturtevantii*, *D. austrosaltans*, *D. saltans* e *D. prosaltans* houve a amplificação de fragmentos com cerca de 2,5 Kb, quando se utiliza o par de iniciadores que ancora no início de intron 1 e na TIR 3', que podem corresponder a elementos *P* tipo-O completos. Esse resultado sugere a existência de seqüências completas no genoma dessas espécies, sendo que elas devem ser divergentes em relação à seqüência de *D. bifasciata*, devido a falta de complementaridade com o iniciador O-IR5, indicando a degeneração dessa região que é essencial à mobilização.

Elementos da subfamília O já tinham sido identificados no grupo *saltans* nas espécies *D. subsaltans*, *D. austrosaltans*, *D. lusaltans* e *D. prosaltans* por Haring; Hagemann; Pinsker (2000). Os dados obtidos neste trabalho ampliam o conhecimento da distribuição dessa subfamília no grupo *saltans*, identificando-a e caracterizando-a no genoma de *D. milleri* e *D. sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*). Além disso, a presença da subfamília O em *D. saltans* foi confirmada, pois até então existia apenas a suposição de que as seqüências *P* de *D. saltans* presentes no clado E de Clark; Kidwell (1997) pertenciam à subfamília O.

A transposição do elemento *P* canônico ocorre principalmente por meio de um mecanismo denominado “corta e cola” (do Inglês, *cut and paste*, KAUFMAN; RIO, 1992). A enzima transposase reconhece as regiões terminais do *transposon* nas posições 48-68 e 2855-2871 e cliva o elemento em suas extremidades, retirando-o de seu sítio de inserção (KAUFMAN; DOLL; RIO, 1989; BEALL; RIO, 1997). O elemento será posteriormente inserido em um novo local do genoma, gerando uma duplicação de oito nucleotídeos no sítio alvo (O’HARE; RUBIN, 1983). Outros fatores, além da transposase, são necessários ao mecanismo de mobilização. A proteína IRBP (do Inglês, *non-P-element-encoded invetead repeat binding protein*), por exemplo, liga-se aos primeiros 16 pb das TIRs auxiliando a transposase no reconhecimento dos limites do elemento *P* (BEALL; RIO, 1997). Desse modo, além de uma transposase ativa, um elemento *P* mobilizável necessita da conservação dos invertidos terminais para a ligação correta dessa enzima que catalisa a transposição. Devido à similaridade dos sítios de processamento do RNA mensageiro entre o elemento *P* canônico de *D. melanogaster* e o elemento *P* tipo-O de *D. bifasciata* e, pela expressão tecido-específica nas espécies que abrigam elementos ativos da subfamília O, acredita-se que o mecanismo de regulação da transposição dessas duas subfamílias seja conservado (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1998).

Haring; Hagemann; Pinsker (2000) inferiram a inatividade da subfamília O no grupo *saltans* com base na degeneração das seqüências de *D. prosaltans* e *D. austrosaltans*. Dentre as seqüências *P* tipo-O obtidas neste trabalho, a seqüência de *D. saltans* (SAM-O) possui a TIR 5’ intacta, mas apresenta uma deleção que interrompe a TIR 3’ e várias outras mutações que degeneram suas ORFs, indicando que essa seqüência da subfamília O deva corresponder a um TE não-autônomo. Esse resultado corrobora a hipótese da inatividade da subfamília O no grupo *saltans*.

As seqüências correspondentes à extremidade 3’ do elemento de *D. saltans*, *D. austrosaltans*, *D. prosaltans*, *D. milleri* e *D. sturtevantii*, amplificadas com os iniciadores O-e3 e O-IR3, apresentam características próprias. Entre a extremidade 3’ da seqüência SAM-O, derivada de *D. saltans* coletada em Matlapa (México), em 1998, e a da linhagem SAC, coletada em Chilpancingo (México), em 1962, os últimos 245 pb são idênticos, porém, o restante das seqüências acumula algumas alterações, totalizando 0,012 de divergência. A baixa divergência compartilhada entre os elementos *P* tipo-O de SAM e SAC deve ser

consequência da proximidade geográfica das duas populações analisadas. Os poucos polimorfismos acumulados podem ser resultantes do período no qual essas linhagens estão separadas, pois estando essas seqüências inativas, as pressões seletivas impedindo sua diferenciação serão inexistentes.

As extremidades 3' do elemento *P* tipo-O de *D. prosaltans*, *D. austrosaltans*, *D. sturtevantii* e *D. milleri*, apresentam algumas alterações em suas seqüências, dentre elas, inserções e deleções nas TIRs e mutações que alteram a matriz de leitura na região das possíveis ORFs, totalizando uma divergência de 0,037, 0,056, 0,171 e 0,280, respectivamente, com relação à seqüência de *D. bifasciata*. Entre as espécies dos subgrupos *saltans* e *sturtevantii*, as seqüências menos divergentes são as de *D. prosaltans* e de *D. sturtevantii* (0,180) e as mais divergentes são as de *D. austrosaltans* e de *D. milleri* (0,317). As análises de máxima parcimônia e de distância filogenética revelaram que as seqüências do subgrupo *saltans* são mais relacionadas ao elemento de *D. bifasciata* do que àqueles das espécies do subgrupo *sturtevantii*.

A rota de transmissão do elemento *P* tipo-O proposta por Haring; Hagemann; Pinsker (2000) elegeu como doadora da subfamília O para o subgrupo *affinis* uma espécie do grupo *willistoni*. As distâncias apresentadas na Tabela 6, entre *D. bifasciata* e as espécies do subgrupo *willistoni* são menores (0,043 e 0,049 para *D. willistoni* e *D. nebulosa*, respectivamente) do que as distâncias entre *D. bifasciata* e *D. saltans* (0,100). Comparações filogenéticas com a seqüência de *D. willistoni* não puderam ser realizadas, pois o elemento disponível no GenBank não abrange a região 3' do *transposon*. Pode-se observar na Figura 11 que o elemento *P* tipo-O de *D. bifasciata* é mais relacionado com as seqüências das espécies do subgrupo *saltans* do que com aquelas do subgrupo *sturtevantii*. Desse modo, podemos inferir que os elementos *P* da subfamília O do grupo *willistoni* são mais relacionados aos do subgrupo *saltans* do que aos do subgrupo *sturtevantii*. Essa relação de parentesco sugere a ocorrência de um evento de transferência horizontal de seqüências tipo-O do subgrupo *saltans* para o grupo *willistoni*, não detectado por Haring; Hagemann; Pinsker (2000) por não terem analisado espécies do subgrupo *sturtevantii*. Para confirmar essa hipótese, dados adicionais a respeito dessas seqüências devem ser acumulados. A Figura 12 ilustra a nossa proposta da rota de transmissão do elemento *P* tipo-O pela família Drosophilidae.



T. 1354/05



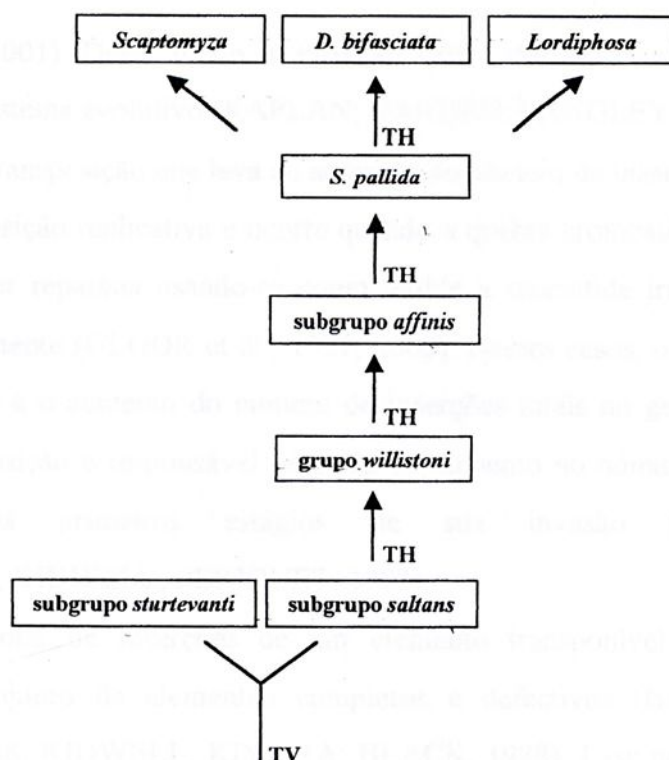


Figura 12. Rota de transmissão do elemento *P* tipo-O dentro da família Drosophilidae. Nesta nova proposta, as relações a partir do evento de transferência horizontal do grupo *willistoni* para o subgrupo *affinis* permanecem as mesmas; entretanto, sugere-se que o elemento do grupo *willistoni* tenha sido doado por alguma espécie do subgrupo *saltans* por um evento de transferência horizontal. A transferência dessa subfamília de *transposons* nos subgrupos *saltans* e *sturtevantii* foi vertical. TH: transferência horizontal e TV: transferência vertical (modificado de Haring; Hagemann; Pinsker, 2000).

O ciclo de vida do elemento *P* é similar ao de outros *transposons*, tais como elementos *mariner-like* (ENGELS, 1989; HARTL; LOHE; LOZOVSKAYA, 1997). Tal ciclo evolutivo é caracterizado por três fases distintas: replicação dinâmica, inativação e degradação. Durante a replicação dinâmica ocorre o rápido aumento do número de cópias e a dispersão do *transposon* na população hospedeira. A segunda e a terceira fase desse ciclo estão intimamente relacionadas; após a sua inativação, que ocorre pela evolução de mecanismos repressores pelo hospedeiro, as seqüências dos TEs ficarão sujeitas a eventos de degradação, dentre eles mutações, deleções, deriva e seleção (KAPLAN; DARDEN; LANGLEY, 1985). Essa última fase do processo, conhecida como senescência, pode durar milhares de anos

(PINSKER et al., 2001). Desse modo, a extinção será o destino provável dos *transposons* submetidos a esse sistema evolutivo (KAPLAN; DARDEN; LANGLEY, 1985).

O modo de transposição que leva ao aumento do número de inserções do *transposon* é denominado transposição replicativa e ocorre quando a quebra cromossômica no sítio doador da inserção pode ser reparada usando-se como molde a cromátide irmã ou outra inserção localizada ectopicamente (GLOOR et al., 1991; 2000). Nesses casos, ocorrerá a manutenção do TE naquele sítio e o aumento do número de inserções totais no genoma do hospedeiro. Esse tipo de transposição é responsável pelo rápido aumento no número de cópias e ocorre principalmente nos primeiros estágios de sua invasão (KIDWELL, 1983; ANXOLABÉHERÈ; KIDWELL; PERIQUET, 1988).

O número total de inserções de um elemento transponível *P* em um genoma corresponde ao conjunto de elementos completos e defectivos (BLACK et al., 1987; BOUSSY et al., 1988; KIDWELL; KIMURA; BLACK, 1988). Esse número pode indicar a fase do ciclo evolutivo em que o TE se encontra no genoma de seu hospedeiro. Devido à falta de mobilização e aos eventos de degradação, se um elemento transponível está representado por poucas inserções, pode-se assumir que ele esteja inativo e seja um componente ancestral desse genoma (KAPLAN; DARDEN; LANGLEY, 1985).

Inserções de elementos transponíveis raramente são encontradas em regiões codificadoras ou perto delas (CHARLESWORTH; LANGLEY, 1991), já que eles tendem a se acumular em regiões onde os coeficientes de seleção são muito menores que a taxa de transposição (CHARLESWORTH, 1991). A β -heterocromatina do gênero *Drosophila* geralmente contém uma série de fragmentos incompletos de TEs, produtos de sucessivas inserções (VAURY; BUCHETON; PELISSON, 1989; SANMIGUEL et al., 1998). Sob essas circunstâncias, não há seleção para mutações de perda de função e os TEs poderiam se acumular por deriva genética e pressão de mutação (CHARLESWORTH; LANGLEY, 1989). Contudo, existem evidências da transcrição da β -heterocromatina quando quebras cromossômicas levam locos eucromáticos para a proximidade dessas regiões (SPOFFORD, 1976). Nesse caso, os elementos transponíveis inseridos na β -heterocromatina ocasionalmente poderiam recuperar sua atividade transcricional, se ainda mantivessem as seqüências necessárias a transcrição conservadas.

A avaliação do número de inserções de elementos transponíveis a partir de PCRs radioativos têm sido constantemente realizada em *D. melanogaster* (PERDUE; NUZHDIN, 2000; YANG; NUZHDIN, 2003), ervilha (ELLIS et al., 1998), cevada (WAUGH et al., 1997), *Hibiscus tiliaceus* (TANG et al., 2004) e em *Petunia hybrida* (KEUKELEIRE et al., 2001) demonstrando a eficácia dessa metodologia. Apenas uma ou duas inserções dos elementos da subfamília O de *D. austrosaltans*, *D. prosaltans* e *D. lusaltans* tinham sido identificados por Haring; Hagemann; Pinsker (2000) por meio da hibridização *in situ* em cromossomos politênicos. Como se sabe, essa técnica permite detectar apenas as inserções da eucromatina. Ainda, a comparação entre as técnicas de hibridização *in situ* em cromossomos politênicos e por *Southern blot*, baseadas na identificação de inserções de nove famílias de TEs, indicou que a segunda técnica fornece resultados subestimados em relação à primeira (MASIDE et al., 2001). A técnica de *Transposon Display* propicia uma quantificação mais precisa do número de inserções, pois utiliza uma reação de PCR que amplifica as seqüências inseridas nas diferentes posições permitindo avaliar todo o genoma da espécie e, desse modo, detectar cópias presentes tanto na eucromatina como na heterocromatina.

A análise do número de inserções do elemento *P* tipo-O em *D. saltans* e *D. sturtevantii* por meio da técnica de *Transposon Display* revelou que essas duas espécies apresentam maior quantidade de cópias do que o inferido para o grupo anteriormente, em média $12,60 \pm 9,50$ e $9,00 \pm 6,10$, respectivamente, com até 18 inserções em *D. sturtevantii* (SMX) e 28 em *D. saltans* (SAG). A variabilidade interpopulacional observada nas duas espécies pode ser consequência de eventos de perdas estocásticas, mediadas pela deriva genética nas populações originais, ou mais recentemente, já que todas as linhagens analisadas são conservadas em pequenas populações de laboratório. Variabilidade intrapopulacional não é esperada, já que todas as linhagens são isofêmeas; se existir, não deve ser significativa ao ponto de levar a superestimativa do número de inserções. De qualquer maneira, esse número de inserções ainda é inferior ao de espécies onde o elemento *P* está ativo, como por exemplo, em *D. melanogaster*; espécie em que determinadas linhagens apresentam de 30 a 50 cópias do elemento *P* canônico (O'HARE et al., 1992). Em face dos dados apresentados, pode-se assumir que as seqüências *P* tipo-O do genoma de *D. saltans* e *D. sturtevantii* estão em processo de senescência.

No modelo da “cópia mestre” (do Inglês, *master-copy*), uma ou poucas inserções de um determinado TE tem capacidade de se mobilizar e as outras seriam inativas. Esse modelo foi confirmado com a sequência *Alu* em humanos por Shen; Batzer; Deininger (1991). Têm se assumido para a família *P* que a presença de duas subfamílias dentro de uma única espécie também resulta na inativação de uma delas (HARING; HAGEMANN; PINSKER, 1998, 2000). Aceitando-se o contexto da hipótese da cópia mestre, as variantes ativas de um TE devem ser aquelas que invadiram mais recentemente o genoma de seu hospedeiro, pois quando ocorre uma invasão, o valor adaptativo da nova cópia autônoma é maior do que o das cópias antigas não-autônomas, já que as primeiras devem possuir os motivos requeridos para a transposição intactos, podendo se espalhar livremente no genoma. No entanto, as sequências não-autônomas podem ser mobilizadas *in trans*, desde que os sítios necessários para a mobilização se mantenham conservados.

Dentre as quatro subfamílias de elementos *P* identificadas no grupo *saltans* (CLARK; KIDWELL, 1997), três estão melhor caracterizadas; os elementos *P* canônicos de *D. sturtevantii*, *D. prosaltans* e *D. saltans*, que são transcricionalmente ativos, as sequências incluídas no clado F de Clark e Kidwell (1997) obtidas por Castro e Carareto (2004d), que não devem codificar transposases funcionais e as sequências da subfamília O avaliadas neste trabalho, que por acumularem mutações nas TIRs e ORFs são necessariamente inativas.

O fenograma construído com base na variabilidade dos sítios de inserção do elemento *P* tipo-O em *D. sturtevantii* indica que a distribuição dessas sequências no genoma dessa espécie é parafilética. Também Almeida; Langeani; Carareto (2003), avaliando polimorfismos de fragmentos de restrição de elementos *P* canônicos completos, demonstraram relações parafiléticas entre linhagens de *D. sturtevantii* coletadas ao norte da América do Sul e no México, enquanto linhagens brasileiras são monofiléticas. Adicionalmente, a análise filogenética de sequências *P* canônicas de linhagens de *D. sturtevantii* (SILVA; KIDWELL, 2004), indicou a existência de sequências parafiléticas, que se agrupam de acordo com suas origens geográficas das linhagens. Três clados foram observados, um reunindo sequências de linhagens procedentes do México e América Central, outro das Antilhas e, um último clado composto por linhagens brasileiras. As sequências do primeiro clado são mais relacionadas às sequências canônicas de *D. willistoni* e *D. melanogaster* apresentando também, menor grau de polimorfismos. O alto grau de polimorfismos indica que as sequências *P* canônicas são

antigos componentes do genoma de *D. sturtevantii*, porém as relações parafiléticas e o menor polimorfismo entre as linhagens procedentes das Américas Central e do Norte devem ser derivadas de atividade recente desse TE, no mínimo logo após a origem dessa espécie.

Desse modo, o cenário exibido pelas seqüências da subfamília O é exatamente inverso ao da subfamília canônica. Enquanto as linhagens coletadas ao norte da linha do Equador são mais relacionadas quanto aos sítios de inserções do elemento *P* tipo-O, as seqüências das linhagens brasileiras são menos relacionadas entre si. Esses dados sugerem que as inserções da subfamília O devem estar inativas a menos tempo nas linhagens ao sul do Equador do que nas linhagens ao norte. Os dados obtidos para *D. saltans*, espécie que possui distribuição geográfica menos ampla do que *D. sturtevantii*, não são muitos conclusivos, mas pode-se observar que as linhagens do México são mais relacionadas entre si do que com as da América Central, refletindo uma distribuição contínua da subfamília O em *D. saltans*. Assim, esses dois conjuntos de dados, de um lado os polimorfismos de fragmentos de restrição (ALMEIDA; LANGEANI; CARARETO, 2003) e as seqüências *P* canônicas (SILVA; KIDWELL, 2004) de *D. sturtevantii* e, de outro, a distribuição dos sítios de inserção do elemento *P* tipo-O sugerem que as duas subfamílias podem ter estado ativas em populações contemporâneas de localidades diferentes.

Em face dessa discussão, podemos sugerir que a atividade transcricional de elementos *P* canônicos em linhagens de *D. prosaltans*, *D. sturtevantii* e *D. saltans* (CASTRO; CARARETO, 2004c) está de acordo com a teoria da cópia mestre, sendo que a família canônica deve ser a última variante *P* a estar ativa nas populações de *D. sturtevantii*, *D. prosaltans* e *D. saltans*. Ainda, no genoma dessas três espécies, as seqüências divergentes de Castro; Carareto (2004d) e as da subfamília O são as atuais representantes inativas da família *P*. Não se descarta, entretanto, que possam existir alguns redutos localizados de elementos ativos, o que poderá ser esclarecido por análises adicionais de subpopulações de espécies do grupo *saltans*.

VI – CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. A distribuição do elemento *P* tipo-O abrange as espécies dos subgrupos *parasaltans*, *sturtevantii* e *saltans*, no grupo *saltans* de *Drosophila*;
2. Todas as seqüências obtidas neste trabalho são equivalentes a elementos *P* tipo-O inativos, corroborando a hipótese da inatividade dessa subfamília no grupo *saltans*;
3. As seqüências *P* tipo-O do subgrupo *saltans* são mais relacionadas às seqüências de *D. bifasciata* do que às do subgrupo *sturtevantii*, sugerindo que alguma espécie do subgrupo *saltans* deva ter doado esse elemento para o grupo *willistoni* por meio de um evento de transferência horizontal;
4. A metodologia de *Transposon Display* é eficiente para quantificar o número de inserções do elemento *P* tipo-O.
5. Devido ao baixo número de inserções *P* tipo-O em *D. sturtevantii* e *D. saltans*, podemos inferir que essa subfamília está em processo de senescência no genoma dessas espécies;
6. As relações parafiléticas das subfamílias O e canônica, entre as populações de *D. sturtevantii*, sugerem que em algum momento da evolução dessa espécie, mais de uma subfamília pode ter estado ativa em populações contemporâneas de regiões geográficas diferentes.



VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.M.; LANGEANI, F.; CARARETO, C.M.A. Geographic polymorfism of *P* element populations of *Drosophila sturtevantii*. **Genet. Mol. Biol.**, v.26, n.2, p.175-179, 2003.

ANXOLABÉHERÈ, D.; KIDWELL, M.G.; PERIQUET, G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with the hypothesis of a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements. **Mol. Biol. Evol.**, v.5, n.3, p.252-269, 1988.

BEALL, E.L.; RIO, D.C. *Drosophila P*-element transposase is a novel site-specific endonuclease. **Genes Dev.**, v.11, n.16, p.2137-2151, 1997.

BERG, C.A.; SPRADLING, A.C. Studies on the rate and site-specificity of *P*-element transposition. **Genetics**, v.127, n.3, p.515-524, 1991.

BLACK, D.M. et al. KP elements repress *P*-induced hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. **EMBO J.**, v.6, n.13, p.4125-4135, 1987.

BOUSSY, I.A. et al. Molecular analysis of the P-M gonadal dysgenesis cline in eastern Australian *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.119, n.4, p.889-902, 1988.

BROOKFIELD, J.F. Models for the spread of non-autonomous selfish transposable elements when transposition and fitness are coupled. **Genet. Res.**, v.67, p.199-210, 1996.

CAPY, P. et al. Dynamics and Evolution of Transposable Elements. 1st ed France: Landes Bioscience, pp.195, 1998.

CASTRO, J.P.; CARARETO, C.M.A. *P* elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. **Mol. Phylogen. Evol.**, v.32, n.1, p.383-387, 2004a.

_____. *Drosophila melanogaster P* transposable elements: mechanisms of transposition and regulation. **Genetica**, v.121, n.2, p.107-118, 2004b.

_____. Canonical *P* elements are transcriptionally active in the *saltans* group of *Drosophila*. **J. Mol. Evol.**, v.59, n.1, p.31-40, 2004c.

_____. Characterization of two full-sized *P* elements from *D. sturtevantii* and *D. prosaltans*. **Gen. Mol. Biol.**, v.27, n.3, p.373-377, 2004d.

CHARLESWORTH, B. Transposable elements in natural populations with a mixture of insertion sites. **Genet. Res.**, v.57, p.127-134, 1991.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. The population dynamics of transposable elements. **Genet. Res.**, v.42, n.1, p.1-27, 1983.

CHARLESWORTH, B.; LANGLEY, C.H. The population genetics of *Drosophila* transposable elements. **Annu. Rev. Genet.**, v.23, p.251-258, 1989.

_____. Population genetics of transposable elements in *Drosophila*. pp.150-176 Em: SELANDER, R.K.; CLARK, A.G.; WHITTAM, T.S. Evolution at the molecular level. USA: Sinauer, Sunderland, 1991.

CLARK, J.B.; KIDWELL, M.G. A phylogenetic perspective on *P* transposable element evolution in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, n.21, p.11428-11433, 1997.

CLARK, J.B.; MADDISON, W.P.; KIDWELL, M.G. Phylogenetic analysis supports horizontal transfer of *P*-transposable elements. **Mol. Biol. Evol.**, v.11, n.1, p.40-50, 1994.

CLARK, J.B. et al. Molecular evolution of *P* transposable elements in the genus *Drosophila* I. The *saltans* and *willistoni* species groups. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, n.5, p.902-913, 1995.

DANIELS, K.R. et al. Evidence for horizontal transmission of the *P* element between *Drosophila* species. **Genetics**, v.124, p.339-355, 1990.

DANIELS, S.B.; STRAUSBAUGH, L.D. The distribution of *P* element sequences in *Drosophila*: the *willistoni* and *saltans* species groups. **J. Mol. Evol.**, v.23, n.2, p.138-148, 1986.

ELLIS, T.H.N. et al. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class Retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. **Mol. Gen. Genet.**, v.260, n.1, p.9-19, 1998.

ENGELS, W.R. *P* elements in *Drosophila*. pp.437-484 Em: BERG, D.; HOWE, M. Mobile DNA. USA: American Society of Microbiology, 1989.

GLOOR, G.B. et al. Distinct *P*-element excision products in somatic and germline cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.155, n.4, p.1821-1830, 2000.

GLOOR, G.B. et al. Targeted gene replacement in *Drosophila* via *P* element-induced gap repair. **Science**, v.253, n.5024, p.1110-1117, 1991.

HAGEMANN, S.; HARING, E.; PINSKER, W. Repeated horizontal transfer of *P* transposons between *Scaptomyza pallida* and *Drosophila bifasciata*. **Genetica**, v.98, n.1, p.43-51, 1996a.

_____. A new *P* element subfamily from *Drosophila tristis*, *D. ambigua* and *D. obscura*. **Genome**, v.39, n.5, p.978-985, 1996b.

HAGEMANN, S.; MILLER, W.J.; PINSKER, W. *P*-related sequences in *Drosophila bifasciata*: a molecular clue to the understanding of *P*-element evolution in the genus *Drosophila*. **J. Mol. Evol.**, v.31, n.6, p.478-484, 1990.

_____. Two distinct *P* element subfamilies in the genome of *Drosophila bifasciata*. **Mol. Gen Genet.**, v.244, n.2, p.168-175, 1994.

HAGEMANN, S.; PINSKER, W. *Drosophila P* transposons in the human genome? **Mol. Biol. Evol.**, v.18, n.10, p.1979-1982, 2001.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.

HARING, E et al. The phylogenetic position of *Drosophila eskoii* deduced from *P* element and *Adh* sequence data. **Hereditas**, v.128, n.3, p.235-244, 1998.

HARING, E.; HAGEMANN, S.; PINSKER, W. Different evolutionary behavior of *P* element subfamilies: M-type and O-type elements in *Drosophila bifasciata* and *D. imaii*. **Gene**, v.163, n.2, p.197-202, 1995.

_____. Transcription and Splicing Patterns of M- and O-type *P* elements in *Drosophila bifasciata*, *D. helvetica*, and *Scaptomyza pallida*. **J. Mol. Evol.**, v.46, n.5, p.542-551, 1998.

_____. Ancient and Recent Horizontal Invasions of Drosophilids by *P* Elements. **J. Mol. Evol.**, v.51, n.6, p.577-586, 2000.

HARTL, D.L.; LOHE, A.R.; LOZOVSKAYA, E.R. Regulation of the transposable element *mariner*. **Genetica**, v.100, n.1-3, p.177-184, 1997.

HOUK, M.A. et al. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. **Science**, v.253, n.5024, p.1125-1129, 1991.

KAMINKER, J.S. et al. The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. **Genome Biol.**, v.3, n.12, research0084, 2002.

KAPLAN, N.L.; DARDEN, T.; LANGLEY, C. Evolution and extinction of transposable elements in Mendelian populations. **Genetics**, v.109, n.2, p.459-480, 1985.

KAUFMAN, P.D.; DOLL, R.F.; RIO, D.C. *Drosophila P* element transposase recognize internal *P* element DNA sequence. **Cell**, v.59, n.2 p.359-371, 1989.

KAUFMAN, P.D.; RIO, D.C. *P* element transposition *in vitro* proceeds by a cut-and-paste mechanism and uses GTP as a cofactor. **Cell**, v.69, n.1, p.27-39, 1992.

- KEUKELEIRE, P. et al. Analysis by Transposon Display of the behavior of the *dTph1* element family during ontogeny and inbreeding of *Petunia hybrida*. **Mol. Genet. Genomics**, v.265, n.1, p.72-81, 2001.
- KIDWELL, M.G. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.80, n.6, p.1655-1659, 1983.
- KIDWELL, M.G.; KIDWELL, J.E.; SVED, J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including, sterility and male recombination. **Genetics**, v.86, n.4, p.813-833, 1977.
- KIDWELL, M.G.; KIMURA, K.; BLACK, D.M. Evolution of hybrid dysgenesis potential following *P* element contamination in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.119, n.4, p.815-828, 1988.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, v.16, n.2, p.111-120, 1980.
- LANGLEY, C.H.; BROOKFIELD, J.F.; KAPLAN, N. Transposable elements in Mendelian populations I. A theory. **Genetics**, v.104, p.457-471, 1983.
- LANGLEY, C.H. et al. On the role of unequal exchange in the containment of transposable element copy number. **Genet. Res.**, v.52, n.3, p.223-235, 1988.
- LASKI, F.A.; RIO, D.C.; RUBIN, G.M. Tissue specificity of *Drosophila P* element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. **Cell**, v.44, n.1, p.7-19, 1986.
- LEE, S.H.; CLARK, J.B.; KIDWELL, M.G. A *P* element-homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. **Insect Mol. Biol.**, v.8, n.4, p.491-500, 1999.
- LORETO, E.L. et al. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. **Genetica**, v.101, n.3, p.153-165, 1998.
- LORETO, E.L. et al. *Drosophila mediopunctata P* elements: a new example of horizontal transfer. **J. Hered.**, v.92, n.5, p.375-381, 2001.
- MAGALHÃES, L.E. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with descriptions of four new species. **Univ. of Texas Publ.**, v.6205, p.135-154, 1962.
- MASIDE, X. et al. Rates of movement and distribution os transposable elements in *Drosophila melanogaster*: in situ hybridization vs Southern blotting data. **Genet. Res.**, v.78, n.2, p.121-136, 2001.

MILLER, W.J.; McDONALD, J.E.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, v.100, n.1-3, p.261-270, 1997.

NOUAUD, D.; QUENESVILLE, H.; ANXOLABÉHERÈ, D. Recurrent exon shuffling between distant *P*-element families. **Mol. Biol. Evol.**, v.20, n.2, p.190-199, 2003.

O'GRADY, P.M.; CLARK, J.B.; KIDWELL, M.G. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v.15, n.6, p.656-664, 1998.

O'HARE, K.; RUBIN, G.M. Structures of *P* transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster*. **Cell**, v.34, n.1, p.25-35, 1983.

O'HARE, K. *et al.* Distribution and structure of cloned *P* elements from the *Drosophila melanogaster* *P* strain pi2. **Genet. Res.**, v.60, n.1, p.33-41, 1992.

OLIVEIRA DE CARVALHO, M.; SILVA, J.C.; LORETO EL. Analyses of *P*-like transposable element sequences from the genome of *Anopheles gambiae*. **Insect. Mol. Biol.**, v.13, N. 1, p.55-63, 2004.

PERDUE, S.; NUZHIDIN, S.V. Master copy is not responsible for the high rate of *copia* transposition in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, n.6, p.984-986, 2000.

PERKINS, H.D.; HOWELLS, A.J. Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in the blowfly *Lucinia cuprina*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, n.22, p.10753-10755, 1992.

PINSKER, W. *et al.* The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domestical neogenes. **Chromosoma**, v.110, n.3, p.148-158, 2001.

QUENESVILLE, H.; NOUAUD, D.; ANXOLABÉHERÈ, D. Recurrent recruitment of the THAP DNA-binding domain and molecular domestication of the *P* transposable element. **Mol Biol Evol.**, *in press*, 2004.

RASMUSSEN, K.E.; RAYMOND, J.D.; SIMMONS, M.J. Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by individual naturally occurring *P* elements. **Genetics**, v.133, n.3, p.605-622, 1993.

RIO, D.C.; LASKI, F.A.; RUBIN, G.M. Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila P* element transposase. **Cell**, v.44, n.1, p.21-32, 1986.

RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; TARRÍO, R.; AYALA, F.J. Molecular evolution and phylogeny of the *Drosophila saltans* species group inferred from the *Xdh* gene. **Mol. Phylogen. Evol.**, v.13, n.1, p.110-121, 1999.

RUIZ, M.T.; CARARETO, C.M. Copy number of P elements, KP/full-sized P element ratio and their relationships with environmental factors in Brazilian *Drosophila melanogaster* populations. **Heredity**, v.91, n.6, p.570-576, 2003.

SANMIGUEL, P. et al. The paleontology of intergene Retrotransposons in maize. **Nat. Genet.**, v.20, n.1, p.43-45, 1998

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SARKAR, A. et al. P elements are found in the genomes of nematoceran insects of the genus *Anopheles*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.33, n.4, p.381-387, 2003.

SEMESHIN, V.F. et al. Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. **Chromosoma**, v.93, n.6, p.461-468, 1986.

SHEN, M.R.; BATZER, M.A.; DEININGER, P.L. Evolution of the master *Alu* gene(s). **J Mol Evol.**, v.33, n.4, p.311-320, 1991.

SILVA, J.C.; KIDWELL, M.G. Horizontal transfer and selection in the evolution of P elements. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, n.10, p.1542-1557, 2000.

_____. Evolution of P elements in Natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. **Genetics**, v.168, n.3, p.1323-1335, 2004.

SIMONELIG, M.; ANXOLABÉRE, D. A P element of *Scaptomyza pallida* is active in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, n.14, p.6102-6106, 1991.

SPOFFORD, J.D. Position-effect variegation in *Drosophila*. pp.955-1019. Em: ASHBURNER, M.; NOVITSKI, E. The genetics and biology of *Drosophila*. London: Academic Press, 1976.

SPRADLING, A.C. et al. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, n.24, p.10824-10830, 1995.

STACEY, S.M. et al. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v.3, n.6, p.522-534, 1986.

SWOFFORD, D. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony. Version 4.0b10. Smithsonian Institution, Washington, D.C, 1997.

TANG, T. et al. High-throughput S-SAP by fluorescent multiplex PCR and capillary electrophoresis in plants. **J. Biotechnol.**, v.114, n.1-2, p.59-68, 2004.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. pp.421-469. Em: KING, R.C. Handbook of genetics. USA: Plenum, 1975.

VAN DEN BROECK, D. et al. Transposon display indentifies individual transposable elements in high copy number lines. **Plant J.**, v.13, n.1, p.121-129, 1998.

VAURY, C.; BUCHETON, A.; PELISSON, A. The β -heterochromatin sequences flanking the *I* elements are themselves defective transposable elements. **Chromosoma**, v.98, n.3, p.215-224, 1989.

WAUGH R. et al. Genetic distribution of *Bare-1-like* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). **Mol. Gen. Genet.**, v.253, n.6, p.687-694, 1997.

YANG, H.P.; NUZHDIN, S.V. Fitness costs of *Doc* expression are insufficient to Stabilize its copy number in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.**, v.20, n.5, p.800-804, 2003.



SETTA, N. Diversidade de seqüências da subfamília O de *transposons P* em espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*. São José do Rio Preto, 2005. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A subfamília *P* tipo-O apresenta-se como um conjunto de elementos transponíveis de distribuição descontínua e atividade transcricional variável na família *Drosophilidae*. Desse modo, o presente estudo objetivou ampliar o conhecimento quanto à sua distribuição, diversidade de seqüências, número de inserções genômicas e relações filogenéticas no grupo *saltans* de *Drosophila* visando relacionar os resultados obtidos com as demais espécies que abrigam essa subfamília. Para realizar essas análises foram empregadas as metodologias PCR, *Southern blot*, *Transposon Display* e seqüenciamento de DNA. Os resultados obtidos demonstraram que a subfamília O está ausente nos subgrupos *cordata* e *elliptica* e ocorre nos subgrupos *parasaltans*, *sturtevantii* e *saltans*; entretanto, a inatividade do elemento *P* tipo-O foi inferida pelo acúmulo de mutações em todas as espécies nas quais a subfamília foi identificada e pelo baixo número de inserções desse *transposon* no genoma de *D. saltans* e *D. sturtevantii*. Esses resultados indicam que a subfamília *P* tipo-O está em processo de senescência nessas espécies. As relações parafiléticas das subfamílias O e canônica entre as populações de *D. sturtevantii*, indicam que em algum momento da evolução dessa espécie, mais de uma subfamília pode ter estado ativa em populações contemporâneas de regiões geográficas diferentes. Uma das espécies do subgrupo *saltans* deve ter sido a doadora da subfamília O para o grupo *willistoni*. Esse novo evento de transferência horizontal na rota de transmissão da subfamília O em *Drosophilidae* foi sugerido por meio das distâncias e relações filogenéticas entre as seqüências de *D. bifasciata* e das espécies do subgrupo *saltans* e subgrupo *sturtevantii*.

Palavras-chave: elemento *P* tipo-O, grupo *saltans*, número de inserções, relações filogenéticas, transferência horizontal, *Transposon Display*, *Drosophila*.



SETTA, N. Diversidade de seqüências da subfamília O de *transposons P* em espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*. São José do Rio Preto, 2005. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

The O subfamily of *P* elements is a group of transposons with discontinuous distribution and variable activity in the Drosophilidae. This study aimed at broaden the knowledge about its distribution, diversity of sequences, number of genomic insertions and evolutionary relationships in the *saltans* group of *Drosophila* comparing the obtained results with those of the species that harbor this subfamily. The methodologies PCR, *Southern blot*, *Transposon Display* and DNA sequencing were used. The obtained results demonstrated that the O-type *P* element is absent in the *cordata* and *elliptica* subgroups and occurs in species of the *parasaltans*, *sturtevantii* and *saltans* subgroups. The inactivity of this transposon was inferred based on the mutations accumulated along its sequences in all the species in which the subfamily was identified and due its low number of insertions in *D. saltans* and *D. sturtevantii*. These results suggest that the O subfamily is in process of aging in these species. The paraphyletic relationships of the O and canonical subfamilies among the populations of *D. sturtevantii* suggest that in some moment of the evolutionary process of this species, more than a subfamily can have been active in contemporary populations of different geographical areas. The data also suggest that a species of the *saltans* subgroup might have been the donor of the O subfamily to the *willistoni* group. This new event of horizontal transfer in the O-type *P* element transmission route inside the Drosophilidae was suggested based on the distances and evolutionary relationships between the sequences of *D. bifasciata* and the species of the *saltans* and *sturtevantii* subgroups.

Keywords: O-type *P* element, *saltans* group, insertions number, phylogenetic relationships, horizontal transfer, *Transposon Display*, *Drosophila*.



