

Valéria Cristina Rufo Vetorazzi

Disgenesia Híbrida Induzida pelos Elementos
Transponíveis P e Hobo em Linhagens de
D Melanogaster de Diferentes
Regiões Brasileiras



Valéria Cristina Rufo Vetorazzi

**DISGENESIA HÍBRIDA INDUZIDA PELOS ELEMENTOS
TRANSPONÍVEIS *P* E *HOB* EM LINHAGENS DE *D. melanogaster*
DE DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS.**

Dissertação apresentada para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências Biológicas
(Genética), junto ao curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista - IBILCE -
UNESP.

**São José do Rio Preto
São Paulo
1997**



751/98

4



Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto



Este 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, câmpus de São José do Rio Preto, com auxílios do CNPq e da FUNDUNESP.



SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	01
II. MATERIAL E MÉTODOS	
A. Material biológico	15
B. Testes fenotípicos	15
C. Teste molecular	16
D. Análise estatística	22
III. RESULTADOS	
A. Análises fenotípicas em cruzamentos realizados a 29°C	21
1. Morfologia das gônadas originárias	21
2. Disgenese gonadal	24
3. Fertilidade e produtividade	40
4. Similaridade das linhagens para o conjunto de variáveis estudadas a 29°C	54
B. Análises fenotípicas em cruzamentos realizados a 25°C	53
1. Disgenese gonadal	54
2. Fertilidade e produtividade	55
3. Similaridade das linhagens para o conjunto de variáveis estudadas a 25°C	77
C. Grau de similaridade das linhagens experimentais em cruzamentos realizados a 29°C e a 25°C em relação ao quanto aos potenciais de atividade P e JH e a habilidade regulatória do cérebro	73
D. Análise molecular	82
IV. DISCUSSÃO	85
V. RESUMO E CONCLUSÃO	
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

Aos meus pais, Nelson e Helena

e

ao Carlos,

por tudo que representam para mim.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO -----	01
II. MATERIAL E MÉTODOS	
A. Material biológico -----	15
B. Testes fenotípicos -----	16
C. Teste molecular -----	18
D. Análise estatística -----	20
III. RESULTADOS	
A. Análises fenotípicas em cruzamentos realizados a 29°C ---	21
1. Morfologia das gônadas disgênicas-----	21
2. Disgenesia gonadal-----	28
3. Fertilidade e produtividade-----	40
4. Similaridade das linhagens para o conjunto de variáveis estudadas a 29°C-----	51
B. Análises fenotípicas em cruzamentos realizados a 25°C ----	53
1. Disgenesia gonadal-----	54
2. Fertilidade e produtividade-----	66
3. Similaridade das linhagens para o conjunto de variáveis estudadas a 25°C-----	77
C. Grau de similaridade das linhagens experimentais em cruzamentos realizados a 29°C e a 25°C e classificação quanto aos potenciais de atividade <i>P</i> e <i>hobo</i> e habilidade regulatória do citotipo -----	79
D. Análise molecular -----	82
IV . DISCUSSÃO -----	85
V . RESUMO E CONCLUSÕES -----	101
VI . SUMMARY AND CONCLUSIONS -----	104
VII . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	107



I. INTRODUÇÃO

Na década de 40, Barbara McClintock, estudando fenótipos variantes em grãos de milho, revolucionou a genética clássica propondo que estas variações eram devidas à movimentação de um elemento genético que induzia quebras nos seus pontos de inserção no cromossomo que resultavam em rearranjos cromossômicos. Como a expressão dos genes próximos aos pontos de quebra era alterada, afetando o fenótipo do grão de milho, McClintock chamou-os de elementos controladores. O primeiro elemento a ser geneticamente identificado foi chamado de *Ds* (do inglês, Dissociation); mais tarde, esta pesquisadora mostrou que a mobilidade de *Ds* dependia de um segundo elemento, também móvel, chamado *Ac* (do inglês, Activator). Sua proposição não foi aceita na época sendo, entretanto, tardiamente reconhecida quando em 1983 recebeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina.

Hoje sabe-se que no sistema *Ac/Ds*, descoberto por McClintock, o elemento funcionalmente autônomo, *Ac*, apresenta 4563 pb sendo que 11 pb em cada extremidade estão repetidos em orientação oposta àquela da outra extremidade. O elemento *Ds* apresenta heterogeneidade estrutural, sendo derivado do elemento *Ac* por deficiências internas. *Ds* é um elemento que determina um local de quebra cromossômica ou mutação gênica, entretanto, é capaz de transposição apenas na presença do elemento *Ac*. A integração de *Ds* em um novo loco promove uma mutação recessiva; na presença continuada de *Ac*, *Ds* pode ser novamente transposto e, assim, ocorre uma reversão da mutação ao normal. Na ausência de *Ac*, o elemento *Ds* não tem capacidade de transpor-se, tornando as mutações estáveis. O elemento *Ac*, sendo autônomo, pode transpor-se de um loco para outro, produzindo mutações instáveis (*apud* Burns & Bottino, 1989; Gardner *et al.*, 1991). Os elementos transponíveis (TEs) são seqüências particulares de DNA moderadamente repetidas, geralmente com 10^3 a 10^4 pb de comprimento e que têm a habilidade de mudar de posição dentro e entre seqüências gênicas (Hartl *et al.*, 1992). O genoma de muitos, se não de todos os organismos, contém estas seqüências, que foram detectadas em diversos níveis taxonômicos, incluindo plantas, animais, bactérias e fungos (Engels, 1989). As espécies do gênero *Drosophila* são um excelente sistema experimental para o estudo destes elementos; 10% do genoma de *Drosophila* e



uma parcela aproximada do genoma dos demais eucariotos é constituída por elementos transponíveis (Finnegan, 1989). Como são capazes de se moverem no genoma, propõe-se que os TEs desempenhem um importante papel na produção de variabilidade genética, podendo alterar a estrutura e a função do genoma ao promoverem mutações e rearranjos cromossômicos, afetarem a regulação gênica ou codificarem produtos gênicos que podem interagir com o metabolismo celular.

De acordo com Cummings (1994), considerando o mecanismo utilizado para sua transposição, pode-se classificar os TEs em dois grandes grupos. No Grupo 1, são incluídos os elementos que transpõem-se via transcrição reversa de um RNA intermediário. Este grupo subdivide-se em duas classes: a Classe 1, que é representada pelos retrotransposons, ou retroposons, caracteriza-se por apresentar elementos com longas repetições terminais invertidas (LTRs). A transposição destes elementos é replicativa, segundo a qual, novas cópias vão ocupar outras posições no genoma sem que ocorra a saída do elemento do sítio original. A transposição dos retrotransposons lembra o ciclo de vida dos retrovírus: uma cópia do elemento integrada no genoma é transcrita por uma RNA polimerase, gerando um RNA mensageiro que codifica as enzimas necessárias para a transposição e síntese de uma nova cópia de DNA do elemento, a partir do RNA. Uma dessas enzimas, a integrase, insere a nova cópia de DNA no genoma hospedeiro, criando no processo uma pequena repetição direta da sequência do sítio de inserção (Bingham & Zachar, 1989).

Entre os elementos da Classe 1 estão os elementos *gypsy* e *copia*. Os elementos da família *gypsy* estão amplamente distribuídos e já foram encontrados em lepidópteros, coleópteros, leveduras e dípteros, incluindo *D. virilis*, *D. subobscura*, *D. annanassae* e *D. melanogaster*. O elemento completo apresenta três Fases Abertas de Leitura (ORFs): (*gag*), que codifica grupos de antígenos associados, formando as proteínas do nucleocapsídeo; (*pol*), que codifica uma poliproteína que após clivada formará a transcriptase reversa, uma protease, a RNase H e a integrase, e (*env*), que codifica glicoproteínas do envelope viral o que, nos retrovírus, está intimamente associada com o processo de infecção (Bingham & Zachar, *op. cit.*). Este elemento está presente em células somáticas, na linhagem geneticamente instável de *D. melanogaster*



conhecida como "Mutator" (MS), causando numerosas mutações devido à sua alta frequência de transposição (Kim *et al.*, 1990).

A família *copia* está presente em plantas, leveduras e insetos, entre eles, o gênero *Drosophila*. Nesta família, o gene da integrase precede o da transcriptase reversa, e o gene *env* está ausente (Mount & Rubin, 1985; *apud* Loreto, 1997). Altas taxas de transcritos *copia* podem ser encontradas em cultura de células de *Drosophila*, sugerindo que sob condições de estresse a taxa de transposição dos elementos deste grupo possa ser alterada.

Na Classe 2 estão incluídos os retroposons que não apresentam repetições terminais e têm seqüências ricas em adenina em sua extremidade 3'. Esta classe pode ser subdividida nos SINES (do inglês, *short interspersed nucleotide elements*) e nos LINES (do inglês, *long interspersed nucleotide elements*). Os SINES podem apresentar diferentes tamanhos, variando de 75 pb a 500 pb. São encontrados em mamíferos e em insetos, como *Bombyx mori*, mas ainda não foram encontrados em *Drosophila*. Os LINES, que podem apresentar 5 a 9 kb, codificam uma transcriptase reversa, que realiza sua transposição. Foram identificados em mamíferos (família L1 em primatas), em milho, em *Trypanosoma* (elemento *ingi*) e os elementos *I*, *F*, *G* e *Doc*, em *D. melanogaster* (Deininger, 1989; Bucheton *et al.*, 1984; *apud* Loreto, 1997).

O elemento *I* é responsável pela síndrome de disgenesia híbrida, caracterizada por altas frequências de mutações, rearranjos e esterilidade em descendentes de cruzamentos entre machos de uma linhagem chamada de Indutora (I), portadora do elemento *I*, com fêmeas de uma linhagem chamada de Reativa (R), desprovida deste elemento (Kidwell, 1986). Os elementos *F* e *G* foram descritos como inserções dentro de genes mutados, mas sobre eles pouco é conhecido. Outro elemento desta classe, com 4,7 kb, que parece estar relacionado ao elemento *I*, chamado de *Doc*, foi seqüenciado em *D. melanogaster* (O'Hare *et al.*, 1991; *apud* Loreto, 1997).

Os elementos do Grupo 2 transpõem-se via DNA e também estão agrupados em 2 classes. A Classe 1 apresenta elementos que contêm curtas repetições terminais invertidas e que codificam a enzima transposase, necessária para a ocorrência da transposição. Entre os elementos móveis representantes desta classe estão os elementos *P* e *hobo*, presentes em



espécies do gênero *Drosophila* e em *Caenorhabditis elegans*. Na segunda classe, estão os elementos com regiões centrais heterogêneas, flanqueadas por longas repetições terminais invertidas, representados pela família FB (*fold-back*) em *D. melanogaster* (Pimpinelli *et al.*, 1995).

Além do modo replicativo, característico dos retrotransposons, um segundo modo de transposição, o não-replicativo, pode ocorrer. Neste mecanismo de transposição, também conhecido como "*cut and paste*" (corte e transferência), o elemento é precisamente cortado do antigo sítio e transpõe-se para um sítio novo podendo, neste caso, ocorrerem reversões de mutações. Propõe-se que o mecanismo "*cut and paste*" seja mediado por remoção física de um fragmento da dupla fita de DNA contendo o elemento transponível e sua posterior reinserção em outro sítio do cromossomo. Por este mecanismo, ocorrem quebras na dupla fita de DNA que serão reparadas por processos moleculares de recombinação dos homólogos. A recombinação é iniciada por uma quebra da dupla fita de DNA produzida pela excisão destes elementos no sítio doador. Esta quebra é reparada por um processo similar ao da conversão gênica, no qual as extremidades quebradas usam um homólogo como um molde para a síntese do DNA (Nassif *et al.*, 1994; *apud* Lankenau, 1995). O mecanismo "*cut and paste*" é característico dos elementos do Grupo 2.

O genoma de *D. melanogaster* é constituído por cerca de 10 a 15% de DNA móvel sendo a família *P*, uma das muitas que habitam o seu genoma. O'Hare & Rubin (1983) dividiram os elementos *P* em duas classes principais: a primeira contendo os elementos completos e, a segunda, os incompletos. Elementos *P* completos possuem 2907 pb de comprimento e podem apresentar muitas estruturas repetidas. Além disso existem repetições invertidas de 31 pb na região terminal e de 11 pb na região subterminal, iniciando-se a 125 pb de cada extremidade. Ocorrem também repetições diretas de 8 pb nas extremidades, originadas no momento da inserção. Internamente, encontram-se 17 pb repetidos e invertidos separados por 29 pb não-repetidos e 20 pb de repetições diretamente duplicadas. O elemento *P* completo apresenta quatro Fases Abertas de Leitura (ORFs 0,1,2,3), intercaladas por três introns, como esquematizado na Figura 1, que codificam a transposase. O sítio de transcrição da transposase tem seu início próximo à posição nucleotídica 85 e término após



um sinal de poliadenilação, na posição 2696. Para que a transposase seja funcional o intron 3 necessita ser removido.

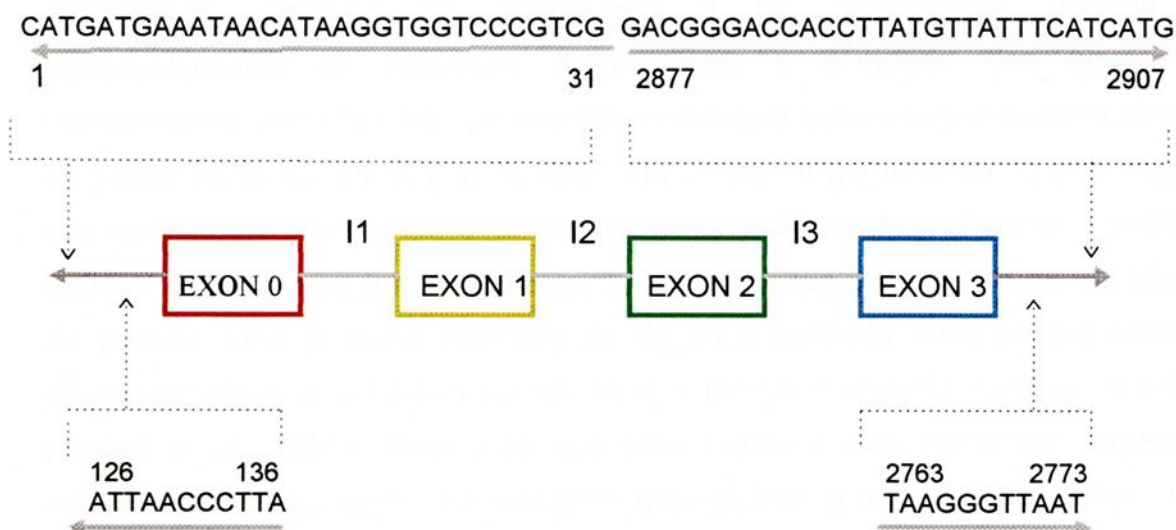


Figura 1. Representação gráfica do elemento *P*, com indicações das quatro Fases Abertas de Leitura (Exons 0, 1, 2, 3) e dos três introns (I1, I2, I3) e das regiões invertidas.

No processo de transposição podem ocorrer quebras nestes elementos, tornando-os mais curtos, sendo chamados de incompletos. O tamanho e a localização dessas deficiências podem ser altamente variáveis, mas não envolvem as repetições terminais. A formação destes elementos pode ocorrer em altas frequências durante a mobilização do elemento no genoma (Boussy *et al.*, 1988).

Além dessas duas classes, existem duas categorias funcionais que são os elementos autônomos e os não-autônomos (Engels, 1989). Elementos autônomos podem auto-transpor-se e auto-excisar-se. Elementos não-autônomos surgiram por deficiências internas de elementos autônomos e necessitam, para a transposição e excisão, da presença de pelo menos um elemento *P* autônomo que agirá *in trans* para promover a transposição. O

número relativo de elementos *P* autônomos e não-autônomos no genoma e suas manifestações fenotípicas variam de acordo com a localização geográfica da população (Anxolabéhère *et al.*, 1987a; Kidwell *et al.*, 1988).

A taxa de transposição do elemento *P* depende da própria estrutura do elemento, de seus sítios de integração no genoma do hospedeiro, da composição genética do hospedeiro e da temperatura durante o desenvolvimento do indivíduo. Além disso, a atividade dos elementos transponíveis desta família parece estar restrita à linhagem germinativa devido ao processamento diferencial do RNA. Na linhagem germinativa os três introns são removidos, produzindo uma transposase de 87 kd. Na linhagem somática, entretanto, o terceiro intron não é removido e, devido à presença de um códon de parada, uma proteína truncada de 66 kd é formada. Este processamento diferencial deve-se a fatores somáticos que inibem a retirada do terceiro intron (Siebel *et al.*, 1992). Propõe-se que esta proteína atue como um regulador negativo da transposição. Na linhagem germinativa, a atividade transposicional ocorre quando há pelo menos uma cópia do elemento completo; em indivíduos susceptíveis à sua ação podem ocorrer redução da fertilidade (Engels, 1989), da fecundidade (Kidwell, 1984) e alteração do valor adaptativo (Pasyukova *et al.*, 1986; Ajioka & Hartl, 1989).

Alguns experimentos, utilizando linhagens transformadas nas quais os elementos *P* foram introduzidos *in vitro*, evidenciam danos genéticos causados pelos TEs em células somáticas de *D. melanogaster*. Estes resultados sugerem que estes elementos possam mudar a função de genes normais e a estrutura cromossômica, podendo alterar a função celular e a viabilidade dos adultos, reduzindo o seu tempo de vida. Woodruff (1992) e Woodruff & Nikitin (1995) relataram que movimentos do elemento *P* causaram, em células somáticas de linhagens de *Drosophila* transformadas, redução significativa na duração de vida de machos. Estes autores concluíram que o decréscimo da longevidade dos indivíduos podia ser devido à danos genéticos somáticos, como por exemplo, a indução de quebras cromossômicas.

A regulação dos elementos transponíveis, além de ser variável entre as espécies, pode também variar entre os indivíduos de uma espécie, devido a ocorrência de efeitos maternos e de diferenças genômicas específicas da



linhagem (Engels, 1989). Existem evidências de que a manutenção destes elementos nas populações seja resultante de um equilíbrio entre o aumento do número de cópias e algumas forças opostas, tais como a auto-regulação, a seleção contra inserções mutacionais e a indução de rearranjos cromossômicos deletérios por recombinação desigual (Charlesworth & Charlesworth, 1983; Kaplan & Brookfield, 1983; Kaplan *et al.*, 1985; Charlesworth & Langley, 1986; Langley *et al.*, 1988).

Os elementos *P* estão completamente ausentes na maioria das linhagens originadas de populações naturais de *D. melanogaster* há mais de três décadas (Anxolabéhère *et al.*, 1987a). Em contraste, todas as populações recentes apresentam numerosas cópias deste TE por genoma. Foram propostas três explicações para esta ausência: o elemento nunca esteve presente nestas linhagens; houve divergência de suas seqüências no tempo, de tal forma que não foram identificáveis; ou, ainda, estes podem ter sido perdidos casualmente ao longo do tempo (Clarck *et al.*, 1995).

Kidwell (1983) propôs que os elementos *P* são muito recentes no genoma de *D. melanogaster* uma vez que não ocorrem em estoques antigos de laboratório. Embora o modo de introdução do elemento *P* no genoma desta espécie permaneça desconhecido, propõe-se que alguma forma de transferência gênica interespecífica rara e sua subsequente propagação em populações naturais tenham ocorrido por transmissão horizontal. Alguns autores, entre eles Houck *et al.* (1991), sugeriram que algumas espécies de ácaros, como por exemplo *Proctolaelaps regalis*, um parasita de *Drosophila*, possam ter servido como vetores. Segundo estes autores, o comportamento alimentar desta espécie de acarínídeo, que preda todos os estádios imaturos de *Drosophila*, parece simular o método de micro-injeção usado por pesquisadores para transferir genes. Após a alimentação, podem ficar em suas quelíceras inclusões celulares que poderiam ser transferidas de uma espécie à outra. Outros vetores poderiam ser os vírus, como o *sigma*, por exemplo, que é transmitido de mosca para mosca através dos gametas, sem serem integrados aos cromossomos (Brun & Plus, 1980).

Se durante a evolução de uma espécie o elemento transponível for perdido, então, por transmissão vertical, descendentes desta espécie não terão

cópias deste elemento em seus genomas. Mas, se a transmissão ocorrer horizontalmente, entre espécies isoladas reprodutivamente, este elemento tem maior chance de permanecer no genoma da espécie. Assim, a transferência horizontal se contrapõe à força contra a perda do elemento autônomo que, por este meio, pode ser transmitido apesar das barreiras reprodutivas entre as espécies (Daniels et al., 1990; Maruyama & Hartl, 1991). Desta forma, após o elemento autônomo ter sido introduzido no genoma de uma determinada espécie, pode multiplicar-se antes do acúmulo significativo de elementos não-autônomos decorrentes de quebras durante a sua transposição.

Diversos autores propõe que a transferência horizontal do elemento *P* tenha ocorrido de *D. willistoni* para *D. melanogaster*, uma vez que essas duas espécies são simpátricas na Flórida, México e sul do Brasil (Kidwell et al., 1990; Houck et al., 1991). Esta proposição encontra-se fundamentada na descoberta de um elemento *P* funcional de *D. melanogaster* praticamente idêntico ao de *D. willistoni*, sendo que as duas seqüências diferem apenas por uma mutação tipo transição A-G na posição 32 e, além disso, na observação que este elemento está presente apenas em *D. melanogaster* e não em populações naturais de *D. simulans* e *D. mauritiana*, espécies do grupo *melanogaster*.

O elemento móvel *P* causa em *D. melanogaster* o fenômeno disgenesia híbrida. Este fenômeno tem sido definido como uma síndrome de traços genéticos aberrantes, tais como alta frequência de esterilidade, recombinação em machos e mutações, que são induzidos na progênie híbrida de certos cruzamentos intra-específicos (Kidwell, 1984). Estes traços disgênicos estão associados com a redução da viabilidade e fecundidade, podendo levar à redução do valor adaptativo do seu portador (Mackay, 1986; Fitzpatrick & Sved, 1986).

Dentre os sistemas disgênicos, dois são distintos, o sistema I-R e o sistema P-M. Na disgenesia I-R, fêmeas da linhagem R, quando cruzadas com machos da linhagem I, apresentam postura normal de ovos mas com um bloqueio no desenvolvimento embrionário e poucos embriões chegando ao estágio de larva (Bregliano & Kidwell, 1983). Na disgenesia P-M, a descendência do cruzamento entre fêmeas da linhagem M (contribuição citoplasmática materna) e machos da linhagem P (contribuição cromossômica



paterna) apresenta alta taxa de esterilidade gonadal. Neste caso, as gônadas das moscas F1 disgênicas não se desenvolvem além de um estágio precoce. Este fenômeno ocorre antes do terceiro ou quarto dias de desenvolvimento e é dependente da temperatura, que nesta condição é superior a 23°C. O período de sensibilidade à temperatura foi determinado como sendo 7 horas após a oviposição e também durante o segundo estágio larval (Engels & Preston, 1979; Kidwell & Novy, 1979).

Na progênie de cruzamentos entre fêmeas P e machos M e em cruzamentos entre machos e fêmeas P ou machos e fêmeas M, o elemento P não apresenta ou apresenta taxa de transposição baixa (Preston & Engels, 1984) não ocorrendo disgenesia. Isto indica que uma maneira de regular a atividade do elemento P é através de um estado celular transmitido maternalmente, chamado citotipo P. O citotipo P, que é característico de linhagens P, reprime a transposição. O citotipo M, característico de linhagens M, é susceptível à ação do elemento P, uma vez que não apresenta atividade repressora (Engels, 1979).

Kidwell *et al.* (1977) sugeriram que a disgenesia híbrida possa ter um papel adaptativo e explicaram que uma das possíveis causas da propagação do elemento P nas últimas décadas seria a grande quantidade de pesticidas usados na agricultura. Jouan-Dofournel *et al.* (1996) propuseram que condições de estresse ambiental possam mobilizar elementos transponíveis, agindo desta forma no nível genômico. Do mesmo modo, Fontdevilla (1992) sugeriu que em certas condições, como as encontradas nas populações marginais, o estresse genômico possa induzir a mobilização dos elementos transponíveis, gerando rearranjos cromossômicos e que essa variabilidade genética possa ser mantida por deriva genética ou forças seletivas.

Kidwell *et al.* (1988) salientaram que redução do valor adaptativo decorrente da disgenesia híbrida tem efeito regulador contra a tendência do elemento P se propagar rapidamente nas populações naturais, devido a alta frequência de transposição. Entretanto, estudos realizados com diferentes populações inter cruzadas e com linhagens transformadas (Kidwell *et al.*, 1981, Kiayasu & Kidwell, 1984; Daniels *et al.*, 1985, 1987; Anxolabéhère *et al.*, 1987b; Good & Kickey, 1987) mostraram que a eficiência da transposição



frequentemente sobrepõe-se à redução do valor adaptativo e, conseqüentemente, o elemento *P* aumenta em frequência e invade rapidamente o genoma de linhagens *M*. Stearns & Kaiser (1996) relataram que alguns reguladores estão associados com a inserção de elementos *P* de diferentes tamanhos. O estudo foi realizado com diferentes composições genéticas e em diferentes temperaturas; as relações entre as taxas médias de nascimento e de morte e entre componentes do valor adaptativo foram fortemente dependentes da temperatura, reforçando a idéia de que as interações ambientais-genotípicas e a fisiologia têm um papel fundamental na expressão dos reguladores.

A habilidade de mobilização do elemento *P*, que está no estado não-regulado, é chamada de potencial de atividade *P*. As linhagens podem variar na propriedade de regular ou suprimir a atividade do elemento *P* autônomo presente em seu genoma; esta propriedade é referida como susceptibilidade a *P*. Quanto a estas propriedades, as linhagens podem ser classificadas em quatro tipos: 1) Linhagens *P*, que podem apresentar baixo ou alto nível de atividade *P* e baixo nível de susceptibilidade a *P*; 2) linhagens *Q*, com baixos níveis de potencial de atividade *P* e susceptibilidade a *P*. Indivíduos *P* e *Q* têm cerca de 25 a 60 cópias de seqüências *P* por genoma haplóide.

Os tipos 3 e 4, as linhagens *M* e *M'*, respectivamente, raramente têm qualquer nível significativo de potencial de atividade *P*. Linhagens *M* estão livres de quaisquer elementos *P* e têm alta susceptibilidade a estes elementos, enquanto que linhagens *M'* carregam cerca de 50 cópias de elementos *P* por genoma haplóide, mas quase todas as seqüências são defectivas. Um subtipo da linhagem *M'*, chamado *KP*, abriga muitas cópias de uma deficiência específica, derivada do elemento *P* completo. Elementos *KP* têm 1154 pb de comprimento, apresentando uma deficiência simples na posição 808-2560. Podem ser responsáveis por metade das seqüências *P* homólogas em muitas populações naturais. Black *et al.* (1987) propuseram que um número alto de cópias do elemento *KP* teria função repressora e controlaria a transposição, proporcionando vantagem seletiva aos indivíduos que possuam maior número destes elementos por genoma. Segundo Boussy *et al.* (1988), esta interpretação é controversa, uma vez que muitas linhagens com elementos *KP* mostram baixa ou nenhuma habilidade repressora.



A repressão mediada pelos elementos KP é menos intensa que aquela mediada pelo citotipo P, mas difere desta última pelo fato de poder ser transmitida através de reprodução sexual, constituindo um sistema genético transmitido por cromossomos (Corish *et al.*, 1996). Em um estudo sobre a repressão causada por elementos P defectivos, Rasmussom *et al.* (1993) relataram a ocorrência de um elemento deficiente que continha apenas 517 pb de comprimento e que reprimia fortemente a disgenesia na linhagem híbrida "Sexi"; este elemento foi denominado SP.

A distribuição dos elementos P em populações naturais de *D. melanogaster* tem sido investigada por muitos autores. Existem dados relativos a populações locais (Engels & Preston, 1980) e a grandes áreas geográficas (Black *et al.*, 1987). Alguns resultados consistem de informações sobre cruzamentos entre as linhagens P-M (Anxolabéhère *et al.*, 1987b, 1988) e outros são o produto de análises diretas dos números e tipos destes elementos, obtidos através de hibridização *in situ* ou *southern blots* (Boussy *et al.*, 1988; Paik *et al.*, 1992). Destes estudos resultaram algumas generalizações: (1) existe pequeno grau de disgenesia híbrida em populações naturais. Algumas populações são estáveis pela supressão do citotipo P, outras produzem transposase em baixos níveis e outras são estáveis devido a estas duas razões, constituindo as linhagens Q, que não apresentam traços disgênicos após serem cruzadas com machos P; (2) todas populações testadas têm alguns elementos P no genoma; (3) sítios P são altamente polimórficos; (4) as linhagens P e Q predominam na América e África central, e M' no norte Africano, Europa e Ásia; (5) elementos KP são comuns em todas as populações da Europa e Rússia, mas são raros ou inexistentes em populações da América do Norte.

Outra família de elementos transponíveis do Grupo 2, conhecida em *D. melanogaster*, é a família *hobo*. Este elemento móvel foi descrito pela primeira vez por McGinnis *et al.* (1983) a partir de um mutante inserido no gene que codifica a proteína Sgs-4.

Estruturalmente *hobo* apresenta 3,0 kb de comprimento, com repetições terminais invertidas de 12 pb e inclui seqüências TATA e CAAT e uma seqüência de 2,6 kb, característica do elemento completo (Streck *et al.*, 1986). Este elemento apresenta uma Fase Aberta de Leitura de 2,0 Kb (ORF1) e, se o



RNAm não sofrer processamento interno, essa ORF é capaz de codificar uma transposase de 73 Kd.

Além do elemento *hobo* completo, existem muitos com comprimentos menores, os incompletos, que não codificam a transposase; para sofrer transposição estes elementos defectivos necessitam da presença de um elemento completo. Linhagens que contém elementos completos e incompletos são conhecidas como linhagens H; outras que não apresentam a seqüência de 2,6 kb e nem as derivadas são chamadas de linhagens E. Periquet *et al.* (1989a, 1990) relataram a existência de linhagens na Eurásia que apresentavam elementos defectivos com cerca de 1,5 kb, chamados de elemento Th1 e Th2, que diferiam um do outro em 20 pb. Estes elementos estavam presentes em todas as linhagens examinadas e pareciam ter um papel importante na regulação do elemento completo.

O número de elementos *hobo* completos no genoma é baixo, 2 a 10 cópias, sugerindo que numerosas cópias completas produzam efeitos deletérios no genoma, devido aos altos níveis de instabilidade que provocam. Entretanto, o número de elementos incompletos é cerca de 30 a 70 cópias (Streck *et al.*, 1986).

O número de cópias do elemento *hobo* e o sítio de inserção nos cromossomos variam entre as linhagens. Diferentes linhagens H apresentam diferentes classes de tamanhos de elementos incompletos; a propagação de elementos incompletos por todo genoma parece sugerir que a taxa de transposição do elemento *hobo* é maior que a taxa de deficiências internas. Este fato parece ainda sugerir que existe uma preferência por elementos incompletos em relação aos completos (Blackman & Gelbart, 1989).

A família *hobo* provavelmente sofre transposição por um mecanismo semelhante ao do elemento *P* (Engels, 1989). Em cruzamentos entre machos H e fêmeas E ocorre hipermutabilidade na linhagem germinativa da progênie, entretanto, o sistema *hobo* apresenta diferenças em relação ao sistema P-M. A persistência da instabilidade *hobo* em estoques híbridos e o fato de altos níveis de atividade não serem restritos à progênie dos cruzamentos entre fêmeas E e machos H, sugerem um modelo diferente de disgenesia híbrida (Blackman *et al.*, 1987; Lim, 1988; Bazin *et al.*, 1991; Shenn *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1993). Em



contraste aos elementos *P*, que são praticamente imóveis em células somáticas, observações demonstram que *hobo* é somaticamente ativo. Este elemento é responsável pela instabilidade genética do complexo gênico decapentaplégico, a linhagem *ddp* (Blackman *et al.*, 1987), pela instabilidade cromossômica da linhagem *Uc* (Lim, 1988) e pelo fator de recombinação (MRF) em machos 23,5 (Hatzopoulos & Louis, 1987).

Segundo Pascual & Periquet (1991), as populações naturais, quando testadas para o sistema disgênico *hobo*, podem ser classificadas em H^- , que não possuem potencial de atividade *hobo* e nem potencial de repressão; H^0 , que não possuem potencial de atividade, mas apresentam algum potencial de repressão e linhagens H^+ , que possuem potencial de atividade e de repressão ao elemento *hobo*.

Seqüências *hobo* parecem estar restritas às espécies do grupo *melanogaster* e estão amplamente distribuídas entre espécies dos subgrupos *montium* e *melanogaster*. Segundo Periquet *et al.* (1989a), as linhagens derivadas de populações naturais procedentes da América e Europa antes dos anos cinqüentas apresentam poucos destes elementos em seus genomas. Em contraste, as populações recentes apresentam numerosas cópias, sugerindo que *hobo* foi introduzido no genoma de *D. melanogaster* por transferência horizontal, provavelmente a partir de *D. simulans*, como sugere a similaridade de seqüências encontradas em mapas de restrição destas duas espécies (Pascual & Periquet, 1991). O elemento *hobo* parece estar difundido em populações naturais de *D. melanogaster* e *D. simulans*. A distribuição deste elemento foi estudada e, de seis linhagens de laboratório de *D. melanogaster* examinadas por Streck *et al.* (1986) três continham o fragmento de 2,6 kb, pertencendo à linhagem H, enquanto que as demais não apresentavam este fragmento sendo, portanto, classificadas como linhagens E.

A transposição espontânea dos elementos genéticos móveis ocorre muito raramente (Rubin, 1983), entretanto, alguns sistemas genéticos apresentam altas freqüências de transposição. Entre esses sistemas podemos citar a linhagem "Mutator", que é geneticamente instável em *D. melanogaster*. A taxa de mutação espontânea desse mutante é elevada, cerca de 10^{-3} a 10^{-4} , devido às mutações instáveis de origem pré-meiótica (Kim *et al.*, 1990), aberrações



cromossômicas em neuroblastos das larvas (Derzhavetz et al., 1988) e ocorrência de mutações em células somáticas. Kim & Belyaeva (1991) relataram que o elemento transponível *hobo* é um dos que sofrem transposição nesta linhagem.

De modo geral, a frequência de transposição varia entre os diferentes elementos. Inserções em sítios individuais ocorrem com a taxa de mutação espontânea, 10^{-5} a 10^{-7} por geração. A reversão geralmente é pouco frequente, ocorrendo em taxas de 10^{-6} a 10^{-10} por geração, aproximadamente 10^3 menos frequente que as inserções.

Poucos são os trabalhos relativos à distribuição dos elementos transponíveis em populações naturais brasileiras de *D. melanogaster*, e outras espécies do gênero, e muitas das questões sobre a genética e evolução destes elementos continuam sem respostas. Este trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência dos elementos *P* e *hobo* em populações de *Drosophila melanogaster*, procedentes de sete regiões brasileiras, através de testes fenotípicos, pela avaliação do grau de disgenesia gonadal e de testes moleculares, por amplificação das seqüências *P* e *hobo*. Desta maneira, procurou-se avaliar as diferenças interpopulacionais quanto à manifestação da disgenesia híbrida e investigar suas possíveis causas.



II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Material biológico

Neste trabalho, foram utilizadas sete linhagens de *Drosophila melanogaster*, recém-coletadas, provenientes de sete regiões geográficas bastante distintas e três linhagens-referência, com atividades *P* e *hobo* conhecidas.

As linhagens recém-coletadas, que serão denominadas como linhagens experimentais e abreviadas por duas letras, representativas do Estado brasileiro em que foram coletadas, têm as seguintes procedências:

1- **RS**: região urbana de Porto Alegre (RS), constituída a partir de cinco fêmeas coletadas em setembro de 1995, pela Prof^a Dr^a Vera Lúcia Valente Gaiesky, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS);

2- **SC**: região urbana de Joinville (SC), constituída a partir de duas fêmeas coletadas em fevereiro de 1996, por esta autora;

3- **PR**: região urbana de Maringá (PR), constituída a partir de cinco fêmeas coletadas em abril de 1996, pela Prof^a Ana Sylvia Lapenta, da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR);

4- **SP**: região urbana de São José do Rio Preto (SP); constituída a partir de oito fêmeas coletadas em novembro de 1995, pela Prof^a Dr^a Cláudia Márcia Aparecida Carareto, da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto (São José do Rio Preto, SP);

5- **MG**: Serra do Cipó (MG), constituída a partir de dez fêmeas coletadas em setembro de 1995, pelo Prof. Dr. Carlos Ribeiro Vilela; da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP);

6- **PI**: região urbana de Teresina (PI), constituída a partir de 15 fêmeas coletadas em março de 1996, pela Prof^a Zeneide Martins da Silva, da Universidade Federal do Piauí (Teresina, PI);

7- **MA**: região urbana de São Luís (MA), constituída a partir de sete fêmeas coletadas em outubro de 1995, pela Prof^a Silma Regina Pereira Martins, da Universidade Federal do Maranhão (São Luís, MA).



As linhagens-referência, utilizadas nos testes fenotípicos para a verificação da presença dos elementos transponíveis *P* e *hobo* nas linhagens experimentais, foram as seguintes:

1- **Canton-S (CS)**: linhagem M-E): entre suas características destaca-se por não conter qualquer elementos *P* em seu genoma e possuir alta susceptibilidade a eles, bem como, por não apresentarem elementos *hobo* em seu genoma e possuírem susceptibilidade moderada a eles.

2- **Harwich-w (Hw)**: linhagem P-E): apresenta cerca de 50 cópias de elementos *P*, completos e incompletos e, aparentemente, apenas cópias incompletas de elementos *hobo* (Boussy *et al.*, 1988). Esta linhagem caracteriza-se por apresentar alto nível de atividade *P* e baixo nível de susceptibilidade a *P*, além de baixos níveis ou ausência total de atividade e susceptibilidade moderada a *hobo*.

As duas linhagens acima descritas foram cedidas pela Dr^a Margaret G. Kidwell (Departament of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, Tucson, AZ, USA).

3- **23,5/CyL (23,5)**: linhagem H-M): contém elementos *hobo* completos e incompletos, com alto nível de atividade *hobo* e baixo nível de susceptibilidade a *hobo*, cedida pelo Dr. Ian Boussy (Departament of Biology, Loyola University of Chicago, Chicago, Illinois, USA). Por cruzamentos especiais (Yannopoulos *et al.*, 1987), foram praticamente eliminados os elementos *P* do genoma desta linhagem e seu citotipo funciona como M, sendo então considerada uma linhagem H-M.

B. Testes fenotípicos

Foram realizados testes fenotípicos a 29°C e a 25°C, que encontram-se esquematizados no Quadro I.

Os testes fenotípicos realizados a 29°C tiveram o objetivo de avaliar a ocorrência de elementos *P* nas linhagens experimentais e o grau de disgenesia híbrida, dependente da capacidade de mobilização destes elementos e de sua capacidade regulatória, para classificá-las quanto ao seu potencial de atividade fator *P* e ao seu citotipo.



Os testes fenotípicos realizados a 25°C tiveram o objetivo de avaliar a ocorrência de elementos *hobo* nas linhagens experimentais e o grau de disgenesia híbrida, dependente da capacidade regulatória do citotipo destas linhagens.

Foram, ainda, realizados cruzamentos-controle dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos, nas duas temperaturas.

Quadro I. Cruzamentos-diagnóstico para indução de disgenesia híbrida pela mobilização do elemento *P* (Experimento 1), pela mobilização do elemento *hobo* (Experimento 3) e cruzamentos-controle (Experimentos 2 e 4) para indução de disgenesia híbrida pela mobilização de elementos *P* e *hobo*, respectivamente.

Tempe_ratura	Experi_mento	Cruzamento A			Cruzamento A*			Intracruzamento	
		Fêmea		Macho	Fêmea		Macho	Fêmea	Macho
29°C	1	CS	vs	RC	RC	vs	Hw	RC	vs RC
	2	CS	vs	Hw	Hw	vs	Hw	CS	vs CS
25°C	3	CS	vs	RC	RC	vs	23,5	RC	vs RC
	4	CS	vs	23,5	23,5	vs	23,5	CS	vs CS

Para a realização dos cruzamentos descritos no Quadro acima, de estoques mantidos a 25°C, foram coletadas fêmeas e machos virgens, que foram mantidos separados até quatro dias de idade. A seguir, os 20 casais de cada tipo de cruzamentos foram colocados em garrafas de 1/4 de litro, com meio de cultura à base de fubá-trigo-araruta. Os indivíduos emergidos, tanto dos cruzamentos mantidos a 29°C, como dos mantidos a 25°C, permaneceram por mais 3 dias a 25°C, até completarem o amadurecimento sexual. Após este período, 60 fêmeas de cada linhagem, de cada tipo de cruzamento, foram transferidas individualmente para tubos com meio de cultura e neles mantidas por 4 dias, a 25°C, para a oviposição. De cada linhagem, e de cada tipo de cruzamento, 30 machos foram mantidos juntos em tubos pelo mesmo período.



Decorridos quatro dias, fêmeas e machos foram dissecados, em solução Demerec, para a observação da morfologia de seus ovários e testículos. No oitavo dia após a colocação das fêmeas parentais nos tubos, cada unidade de oviposição foi observada para a constatação da presença ou ausência de larvas e no décimo-sétimo dia foram contados os descendentes dos tubos que apresentaram larvas. Com este procedimento, foram determinadas as porcentagens de disgenesia gonadal na geração F1 das linhagens estudadas, os percentuais de fertilidade de cada linhagem e a produtividade média na geração F2, em quatro dias de oviposição.

O teste DG, desenvolvido por Kidwell (1986), para cálculo do índice de disgenesia gonadal, foi aplicado segundo a equação:

$$DG = \frac{[ON + 1/2(1N)] \times 100}{T}$$

onde, ON representa o número de fêmeas em que os dois ovários são anormais; 1N representa o número de fêmeas em que um dos ovários é anormal e T indica o número total de fêmeas observadas.

C. Teste molecular

Para a avaliação molecular da existência dos elementos *P* e *hobo*, foi extraído o DNA genômico de indivíduos das linhagens experimentais e das linhagens-referência. Para isto, 10 moscas de cada linhagem foram maceradas em tampão de extração SB (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 10 mM [pH 8,0], NaCl 50 mM e SDS 0,5%), ao qual foram adicionados 2 µl de Proteinase K (de uma solução estoque a 10mg/ml). O macerado foi incubado durante 30 minutos a 50°C e, então, o DNA foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado com 20 µl de acetato de sódio 3 M [pH 5,0] e 500 µl de etanol 100%, e desidratado com etanol 70%. O DNA foi dissolvido em 100 µl de tampão TE (pH 8,0) ao qual foi adicionado 1 µl de RNase A (de uma solução estoque a 100µg/ml) e incubado durante 30 minutos a 37°C. A seguir, o DNA foi novamente extraído com fenol/clorofórmio e



clorofórmio, precipitado com acetato de sódio e etanol 100% e desidratado com etanol 70%, nas mesmas proporções citadas anteriormente. O DNA obtido foi dissolvido em 20 µl de água Mille-Q.

Do DNA extraído, 20 ng foram amplificados por PCR, usando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para seqüências *P* e *hobo*.

Para a identificação de seqüências *P*, foram utilizados os oligonucleotídeos denominados como #829 e #830, que amplificam um fragmento de 764 pb. O oligonucleotídeo #829 é complementar aos nucleotídeos 12 a 31 de um elemento *P* completo e o oligonucleotídeo #830 é complementar aos nucleotídeos 757 a 776. As seqüências de ambos os *primers* encontram-se abaixo discriminadas:

829: 5'-AACATAAGGTGGTCCCGTCG-3'

830: 5'-CGACTGGGCAAAGGAAATCC-3'

Para a identificação de seqüências *hobo*, foram utilizados os oligonucleotídeos *primers* denominados como #651 e #1597, que amplificam um fragmento de 963 pb. O oligonucleotídeo #651 é complementar aos nucleotídeos 651 a 671 de um elemento *hobo* completo e o oligonucleotídeo #1597 é complementar aos nucleotídeos 1597 a 1614. As seqüências de ambos os *primers* são as seguintes:

651: 5'-CACCTCCAATTTATCCCGCC-3'

#1597: 5'-GGATGGCAATACGAAGC-3'

As seqüências *P* e *hobo* foram amplificadas em 12,5 µl de água esterilizada e deionizada, 2,5 µl de glicerol 50%, 2,5 µl de tampão 10X, 2 µl de dNTPs (10mM), 1,25 µl do *primer* #1 (5 pmol/µl) e 1,25 µl do *primer* #2 (5 pmol/µl), 1 µl de cloreto de magnésio 25 mM e 0,1 µl de Taq DNA polimerase. Adicionou-se a esta solução 20 ng de DNA genômico de cada linhagem. A reação de amplificação foi realizada em 29 ciclos, cada um contendo 1 minuto



de desnaturação do DNA, a 95°C, 1 minuto de anelamento dos *primers*, a 50°C e 3 minutos de extensão da fita, a 72°C. O amplificado foi então resfriado a 4°C.

A amplificação das seqüências *P* e *hobo* foi confirmada por eletroforese, usando-se 10 µl do amplificado em gel de agarose a 1%, e posterior identificação em transiluminador.

D. Análise Estatística

Para a avaliação das diferenças entre médias e da homogeneidade das médias foram realizados testes *t* de Student e Análise de Variância, respectivamente, para isto utilizando-se o software Minitab.

As linhagens foram agrupadas por Análise Multivariada quanto aos seus graus de similaridade, para o conjunto das variáveis estudadas (frequências de ovários e testículos disgênicos, frequências de ovários rudimentares, na geração F1 e, números de descendentes e razão de sexo dos indivíduos da geração F2, nos três tipos de cruzamentos através do software Minitab.



III. RESULTADOS

Neste trabalho foram realizados três tipos de cruzamentos entre sete linhagens de *D. melanogaster*, procedentes de sete regiões geográficas do Brasil, com linhagens-referência P forte-E (**Harwich**), H forte-M (**23,5/CyL**) e M-E (**Canton-S**).

Os cruzamentos denominados A, realizados entre fêmeas **Canton-S** com os machos das linhagens experimentais, pretenderam medir o potencial que estas linhagens têm para induzir traços disgênicos na linhagem germinativa de seus descendentes com citotipo M, a 29°C (dependentes da mobilização de elementos *P*) e a 25°C (possivelmente devido à mobilização de elementos *hobo*).

Os cruzamentos denominados A*, realizados entre as fêmeas das linhagens experimentais com machos com atividade *P* (**Harwich**) ou *hobo* (**23,5/CyL**) conhecidas, pretenderam avaliar a habilidade regulatória do citotipo das linhagens experimentais em relação aos elementos *P* ou *hobo* recebidos do genoma paterno. Dos resultados destes cruzamentos foi possível avaliar o grau de disgenesia gonadal e a produtividade de cada linhagem estudada.

O DNA dos indivíduos das linhagens experimentais e das linhagens-referência foi extraído e amplificado para a detecção de seqüências *P* e *hobo* em cada linhagem.

A. Análises fenotípicas em cruzamentos realizados a 29°C

1. Morfologia das gônadas disgênicas

As Figuras 2 a 5 mostram a morfologia de ovários normais (Figura 2) e rudimentares (Figura 3) e ovários com disgenesia unilateral (Figura 4) e bilateral (Figura 5). A Figura 6 mostra testículos normais e a Figura 7 mostra testículos com disgenesia bilateral.



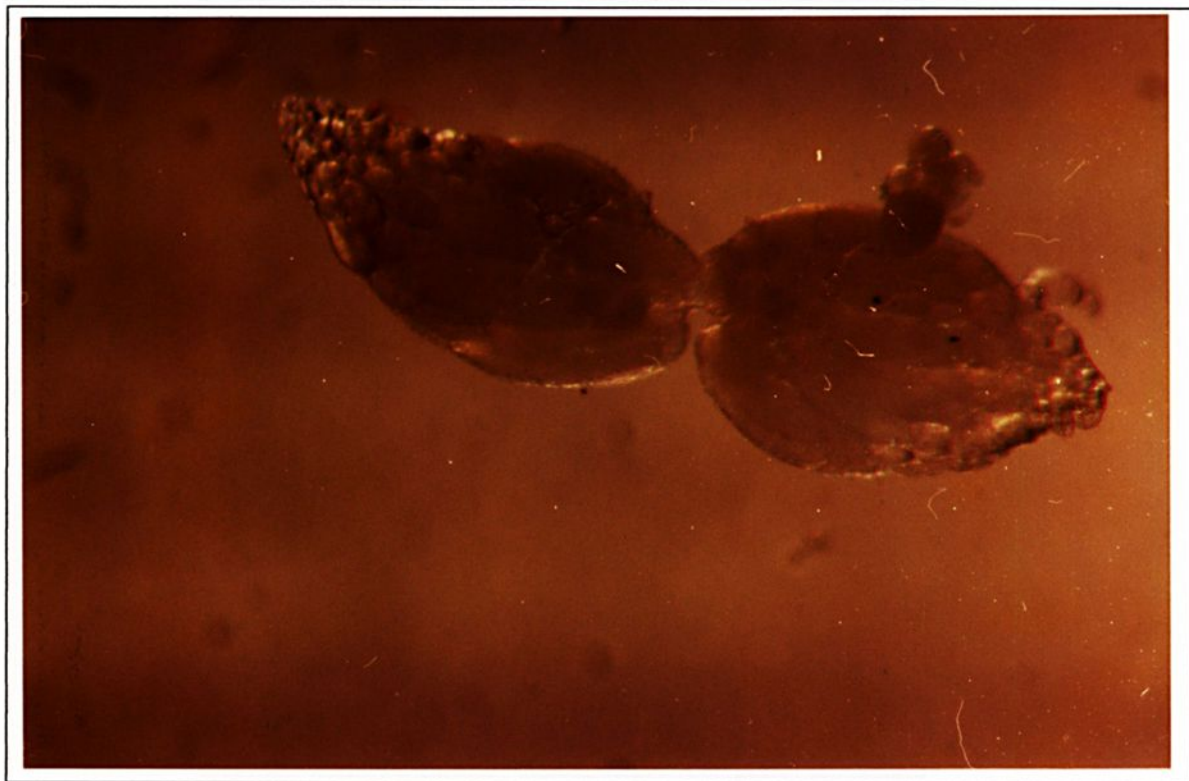


Figura 2. Ovários normais de *D. melanogaster* (aumento: 172x).

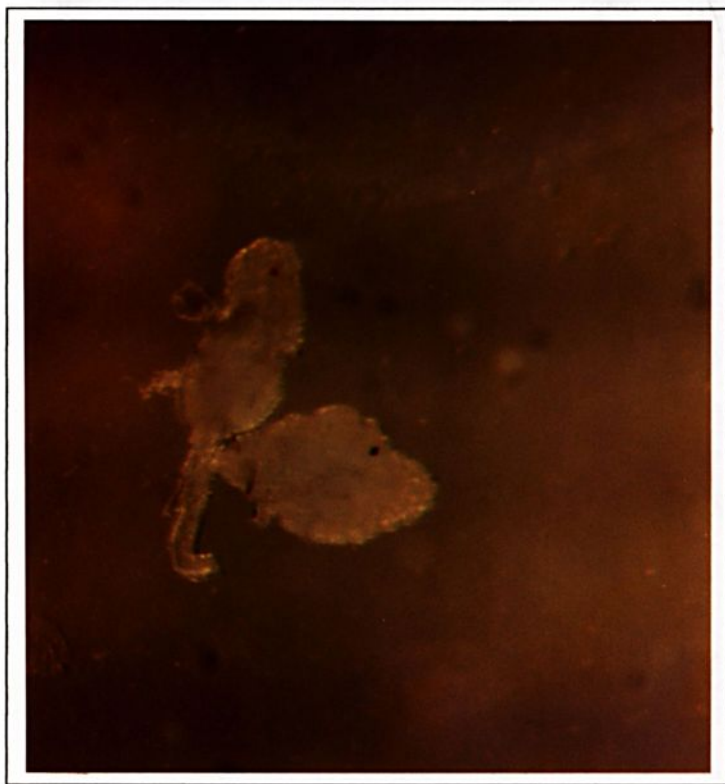


Figura 3. Ovários rudimentares de *D. melanogaster* com número e tamanho reduzido de ovariolos (aumento: 172x).



Figura 4. Ovário disgênico, unilateral, de *D. melanogaster* (aumento: 340x).

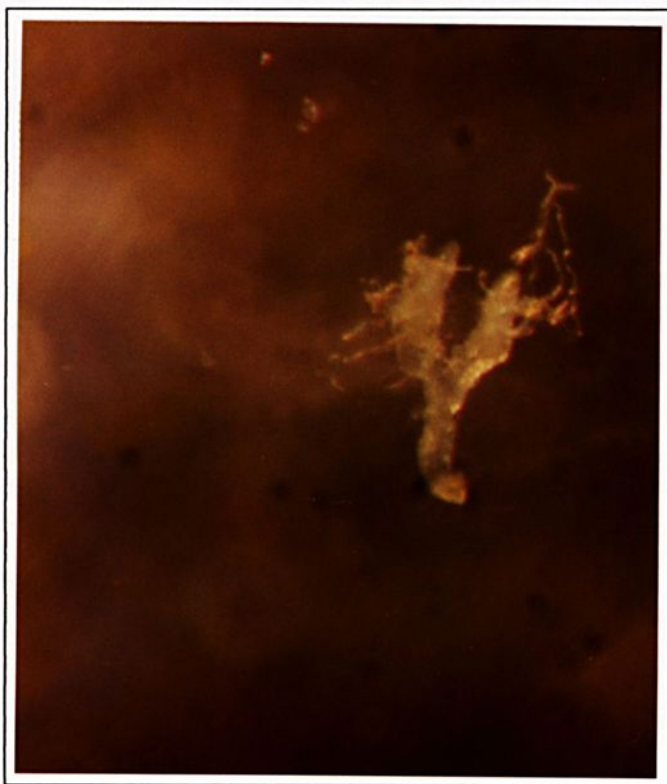


Figura 5. Ovários de *D. melanogaster* , com disgenesia bilateral (aumento: 172x).

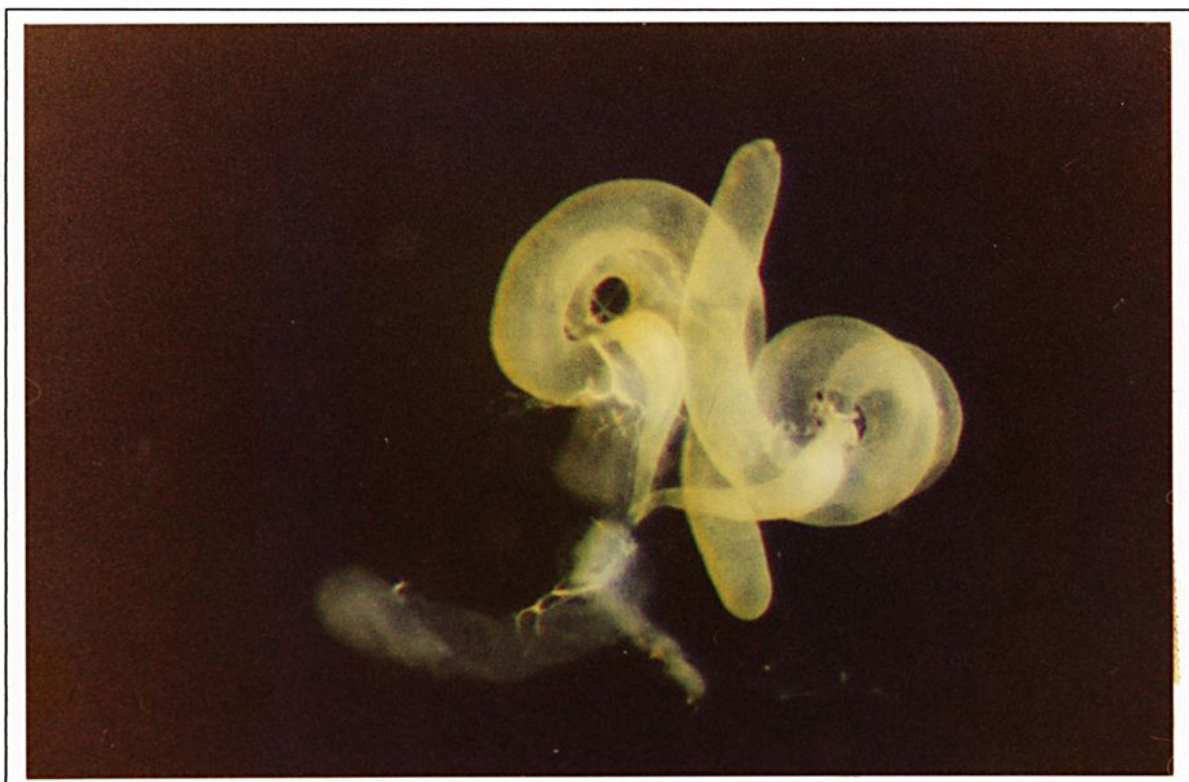


Figura 6. Testículos normais de *D. melanogaster* (aumento: 260x).



Figura 7. Testículos de *D. melanogaster* , com disgenesia bilateral (aumento: 260x).

2. Disgenesia Gonadal

A Tabela 1 apresenta o número de fêmeas e de machos descendentes dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos, com ovários e testículos disgênicos, isto é, ovários com número reduzido de ovários ou ovários ausentes, e testículos reduzidos.

Os números de indivíduos com gônadas uni e bilateralmente disgênicas, observados nos três tipos de cruzamentos, foram variáveis. Estes valores, comparados por χ^2 de homogeneidade, mostraram-se significativamente diferentes quanto a disgenesia ovariana, nas linhagens **PR** ($\chi^2=13,11$; $p<0,01$), **SP** ($\chi^2=20,50$; $p<0,01$), **MG** ($\chi^2=9,93$; $p<0,01$) e **MA** ($\chi^2=16,70$; $p<0,01$). Os índices de disgenesia gonadal variaram de 0,89% (**SC**) a 20,00% (**MA**) nos cruzamentos A, de 0,83% (**SP**) a 11,66% (**SC**) nos cruzamentos A* e de 0,00 (**MA**) a 5,83% (**SP**) nos intracruzamentos. Destas linhagens, destacou-se aquela procedente de São Paulo, que apresentou os maiores valores de ovários disgênicos nos intracruzamentos. A equação comumente utilizada para cálculo de disgenesia gonadal em fêmeas, foi também utilizada para calcular este índice em machos, considerando o número de testículos uni e bilateralmente disgênicos. Os valores encontrados foram baixos e não diferiram entre as linhagens.

Além de ovários disgênicos, algumas linhagens produziram, apenas na descendência dos cruzamentos A (Tabela 2), ovários normais mas com dimensões reduzidas, como as linhagens **RS**, **PR**, **SP**, **MG**, **PI** e **MA**. Dentre estas, destacou-se a linhagem **SP**, com 64,3% de gônadas reduzidas. Os valores de χ^2 de homogeneidade mostraram que a relação entre ovários normais e rudimentares foi significativamente diferente entre os descendentes dos cruzamentos A e A*, exceto para **MA**.

Foram realizados cruzamentos-controle dos três tipos de cruzamentos experimentais. O controle positivo dos cruzamentos A teve por objetivo determinar se os elementos transponíveis eram ativos na linhagem **Canton-S**. Fêmeas **CS**, com citotipo M-E, quando cruzadas com machos **Harwich**, que são P-E, produzem progênie híbrida com alto grau de disgenesia gonadal, quando as primeiras etapas do desenvolvimento ocorrem à temperatura elevada (29°C),



devido ao alto grau de mobilização dos elementos *P*, provenientes do genoma da linhagem **Harwich**.

O controle positivo dos cruzamentos *A** foi realizado com a linhagem **Harwich (Hw vs Hw)** para evidenciar a habilidade regulatória do citotipo desta linhagem, pela baixa frequência de disgenesia gonadal decorrente de seu citotipo P-E. Como controle negativo, foram realizados intracruzamentos da linhagem **Canton-S**.

Para os intracruzamentos, foram utilizados controles considerados como positivos e como negativos. O controle positivo (**Hw vs Hw**), que produz baixa frequência de disgenesia gonadal, é indicativo da habilidade regulatória do citotipo P, dependente da presença destes elementos no genoma destas linhagens. Como controle negativo, em que se espera frequência nula ou efetivamente baixa de disgenesia gonadal, indicativa da inexistência do elemento transponível *P* completo, foram realizados intracruzamentos da linhagem **Canton-S**, a 29°C.

Na Tabela 3 encontram-se os valores da disgenesia gonadal em descendentes dos cruzamentos-controle. Os valores obtidos na descendência dos cruzamentos entre fêmeas da linhagem **Canton-S** (M verdadeira) e machos da linhagem **Harwich** (P forte) foram os esperados 100%. Também esperados foram a ausência de disgenesia gonadal observada em descendentes do cruzamento entre machos e fêmeas da linhagem **CS** ou os valores baixos dos descendentes dos cruzamentos entre machos e fêmeas da linhagem **Harwich**. As diferenças entre os números de indivíduos com ovários ou testículos normais e disgênicos, nos três tipos de cruzamentos-controle, são tão marcantes que dispensam análises estatísticas. As fêmeas descendentes do cruzamento-controle **Hw vs Hw** apresentaram ovários aparentemente normais mas com dimensões reduzidas, com frequência de 10,7%.

A Figura 8 apresenta as frequências percentuais de fêmeas com ovários disgênicos, na descendência dos cruzamentos A, *A** e dos intracruzamentos. As linhagens **SP** e **MA** apresentaram os maiores percentuais de ovários disgênicos na descendência do cruzamento A; para os cruzamentos *A**, as linhagens **PI** e **SC** apresentaram os maiores percentuais. **MG**, **SP** e **PI** foram as linhagens com maior frequência de disgenesia gonadal em intracruzamentos.



Quanto aos testículos (Figura 9), os maiores percentuais de indivíduos disgênicos ocorreram na descendência das linhagens **MG** e **RS**, nos cruzamentos A; nas linhagens **SC**, **PI** e **SP**, no cruzamento A*, e na linhagem **RS**, nos intracruzamentos.

As frequências percentuais de fêmeas com ovários rudimentares, em relação ao total de fêmeas dissecadas, são apresentadas na Figura 10. Os descendentes da linhagem **SP** apresentaram o maior percentual, no cruzamento A; nos cruzamentos A* e nos intracruzamentos não ocorreram ovários rudimentares nos descendentes das linhagens experimentais. Estes ovários anormais também foram observados em descendentes do controle positivo (cruzamento de fêmeas com machos **Hw**).

Foram feitas análises de agrupamentos (clusters) na tentativa de estabelecer relações de similaridade das linhagens quanto às suas potencialidades de mobilização do elemento *P* ou de regulação de seu citotipo, avaliados pela frequência de anormalidades gonadais.

Na Figura 11 observa-se que, para o cruzamento A, a descendência das linhagens **RS**, **SC**, **PR**, **MG**, **PI** e **MA** apresenta similaridade superior a 90% (os percentuais variaram de 91,2% a 93,3%) quanto à frequência de gônadas disgênicas e rudimentares. A linhagem **SP** foi 78,4% similar às demais; o menor grau de similaridade ocorreu com os descendentes do cruzamento-controle **CS** vs **Hw** (8,1%), como o esperado.

A Figura 12 mostra que na descendência do cruzamento A*, as linhagens **RS** e **SP** foram as mais semelhantes (89,8%); as linhagens **PR** e **MG** apresentaram 73,4% de similaridade, seguidas por **MA** (71,2%) e **SC** (64,3%). A linhagem **PI** foi a mais diferenciada em relação à porcentagem de gônadas disgênicas e rudimentares, com 49,4% de semelhança com as demais e o controle **Hw** vs **Hw**, com apenas 31,9%, como o esperado.

Para os intracruzamentos (Figura 13), a similaridade foi maior entre as linhagens **MA**, **PR** e **CS**, com 100% de similaridade; as linhagens **SC** e **PI** apresentaram 85,9% de similaridade em relação as anteriores. As linhagens **RS** e **MG** foram 66,6% similares, enquanto que as linhagens menos semelhantes em relação às demais foram **SP** (58,8%) e **Hw** (4,5%).



Tabela 1. Números de indivíduos portadores de ovários e testículos disgênicos e índices de disgenesia gonadal (DG), em descendentes dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 29°C (número de indivíduos com ovários e testículos normais (No), uni (Uni) e bilateralmente (Bi) disgênicos e Total (T); número de indivíduos dissecados (N); fêmeas (F) e machos (M); χ^2 de homogeneidade; **: $p<0,01$; *: $p<0,05$).

Linhagem		N		Fêmeas				Machos				DG (%)	
		F	M	No	Uni	Bi	T	No	Uni	Bi	T	F	M
RS	A	60	30	56	1	3	4	27	3	0	3	5,83	5,00
	A*	60	30	58	1	1	2	30	0	0	0	2,50	0,00
	I	60	30	58	0	2	2	29	0	1	1	3,33	3,33
	χ^2				3,02				8,18				
SC	A	56	30	55	1	0	1	28	2	0	2	0,89	3,33
	A*	60	30	52	2	6	8	27	3	0	3	11,66	5,00
	I	60	30	58	1	1	2	30	0	0	0	2,50	0,00
	χ^2				8,98				2,90				
PR	A	60	30	52	5	3	8	29	1	0	1	9,16	1,66
	A*	50	30	47	0	3	3	30	0	0	0	6,00	0,00
	I	60	30	60	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	χ^2				13,11**				1,99				
SP	A	57	30	42	8	7	15	30	0	0	0	19,29	0,00
	A*	60	30	59	1	0	1	28	2	0	2	0,83	3,33
	I	60	30	56	1	3	4	30	0	0	0	5,83	0,00
	χ^2				20,50**				4,12				
MG	A	60	30	50	3	7	10	26	4	0	4	14,16	6,66
	A*	60	30	59	0	1	1	30	0	0	0	1,66	0,00
	I	60	30	55	3	2	5	30	0	0	0	5,80	0,00
	χ^2				9,93*				8,38				
PI	A	59	30	51	4	4	8	29	1	0	1	10,17	1,66
	A*	60	30	51	5	4	9	28	2	0	2	10,83	3,33
	I	60	30	59	0	1	1	30	0	0	0	1,66	0,00
	χ^2				7,41				2,06				
MA	A	60	30	46	4	10	14	30	0	0	0	20,00	0,00
	A*	60	30	54	2	4	6	29	0	1	1	8,33	1,66
	I	60	30	60	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	χ^2				16,70**				1,99				

Cruzamentos A: fêmeas **CS** vs machos **RS, SC, PR, SP, MG, PI** e **MA**
A*: fêmeas **RS, SC, PA, SP, MG, PI** e **MA** vs machos **Hw**
I: intracruzamentos

Tabela 2. Porcentagem de fêmeas com ovários rudimentares, descendentes dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 29°C (N: número de fêmeas férteis; χ^2 de homogeneidade para o número de fêmeas com ovários rudimentares nos cruzamentos A e A*, **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagens		Normais	Rudimentares	
		N	N	%
RS	A	56	9	16,1
	A*	58	0	0,0
	χ^2		10,14**	
	I	58	0	0,0
SC	A	55	0	0,0
	A*	52	0	0,0
	χ^2		0	
	I	58	0	0,0
PR	A	52	11	21,2
	A*	47	0	0,0
	χ^2		11,21**	
	I	60	0	0,0
SP	A	42	27	64,3
	A*	59	0	0,0
	χ^2		51,08**	
	I	56	0	0,0
MG	A	50	6	12,0
	A*	59	0	0,0
	χ^2		7,48**	
	I	55	0	0,0
PI	A	51	5	9,8
	A*	51	0	0,0
	χ^2		5,26*	
	I	59	0	0,0
MA	A	46	2	4,3
	A*	54	0	0,0
	χ^2		3,44	
	I	60	0	0,0

Cruzamentos A: fêmeas **CS** vs machos **RS, SC, PR, SP, MG, PI** e **MA**; A*: fêmeas **RS, SC, PR, SP, MG, PI**, e **MA** vs machos **Hw**; I: intracruzamentos

Tabela 3. Número de indivíduos portadores de gônadas disgênicas, de ovários rudimentares e índice de disgenesia gonadal (DG), em descendentes dos cruzamentos-controle realizados a 29°C (Uni e Bi: número de indivíduos com ovários e testículos uni e bilateralmente disgênicos; N: número de indivíduos dissecados; %: frequência de ovários rudimentares; χ^2 de contingência **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Indivíduos		Cruzamentos		
		CS vs Hw	Hw vs Hw	CS vs CS
Fêmeas	N	51	59	58
	Normais	0	56	58
	Uni	0	1	0
	Bi	51	2	0
	DG (%)	100,0	4,2	0
	Rudimentares	0	6	0
	%	0	10,7	0
	χ^2		6,31*	
Machos	N	30	30	30
	Normais	0	30	30
	Uni	0	0	0
	BI	30	0	0
	DG (%)	100,0	0	0

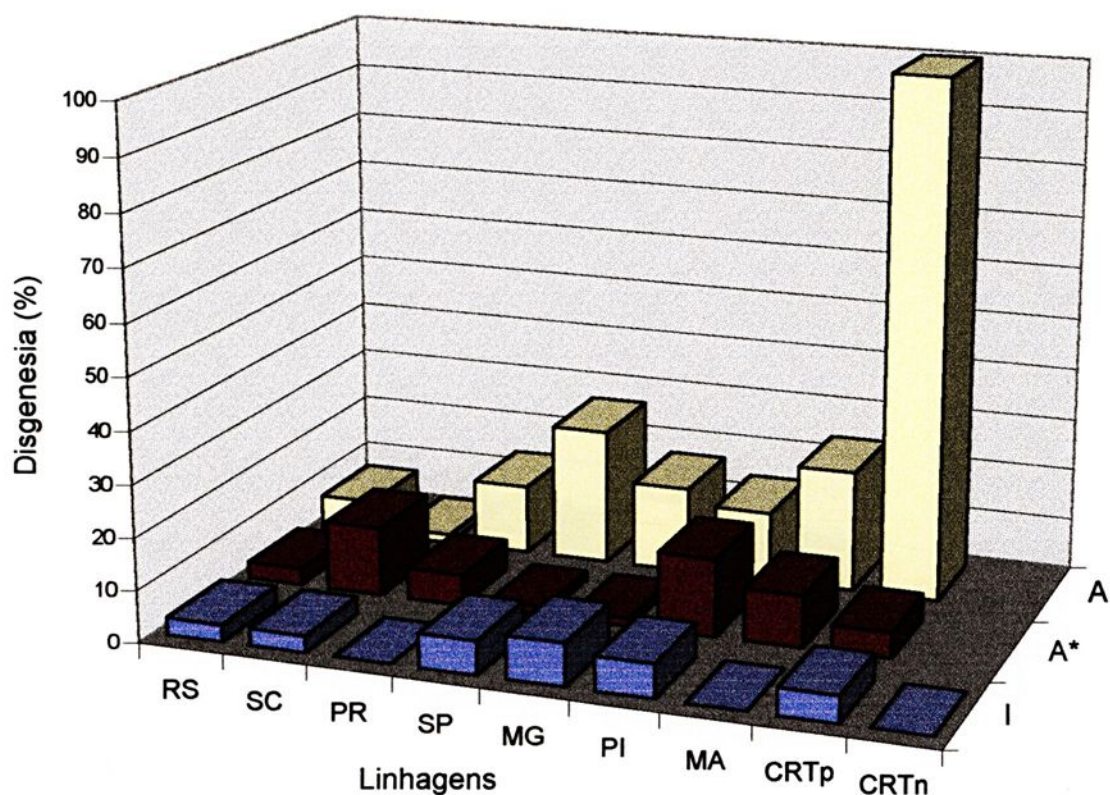


Figura 8. Frequências percentuais de fêmeas com ovários disgênicos, na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos (I) realizados a 29°C (CRTp A: fCS vs mHw; CRTp A*: fHw vs mHw; CRTp I: fHw vs mHw; CRTn I: fCS vs mCS).

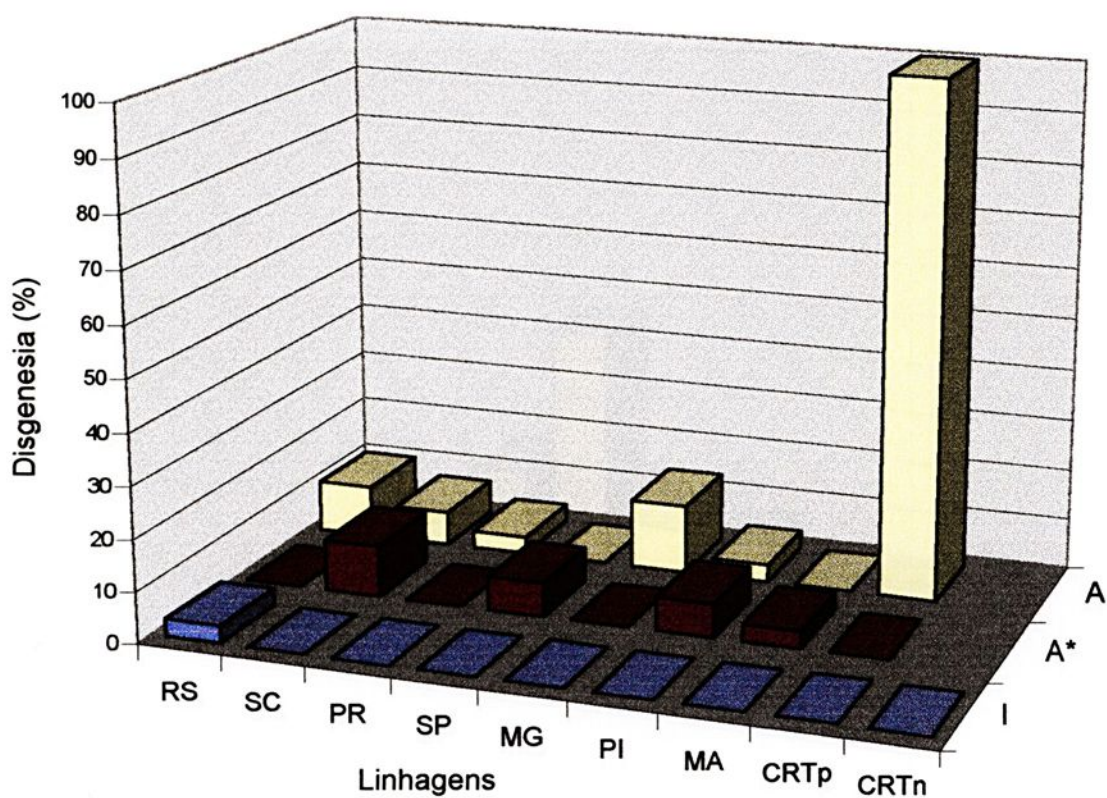


Figura 9. Frequências percentuais de machos com testículos disgênicos, na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos (I) realizados a 29°C (CRTp A: fCS vs mHw; CRTp A*: fHw vs mHw; CRTp I: fHw vs mHw; CRTn I: fCS vs mCS).

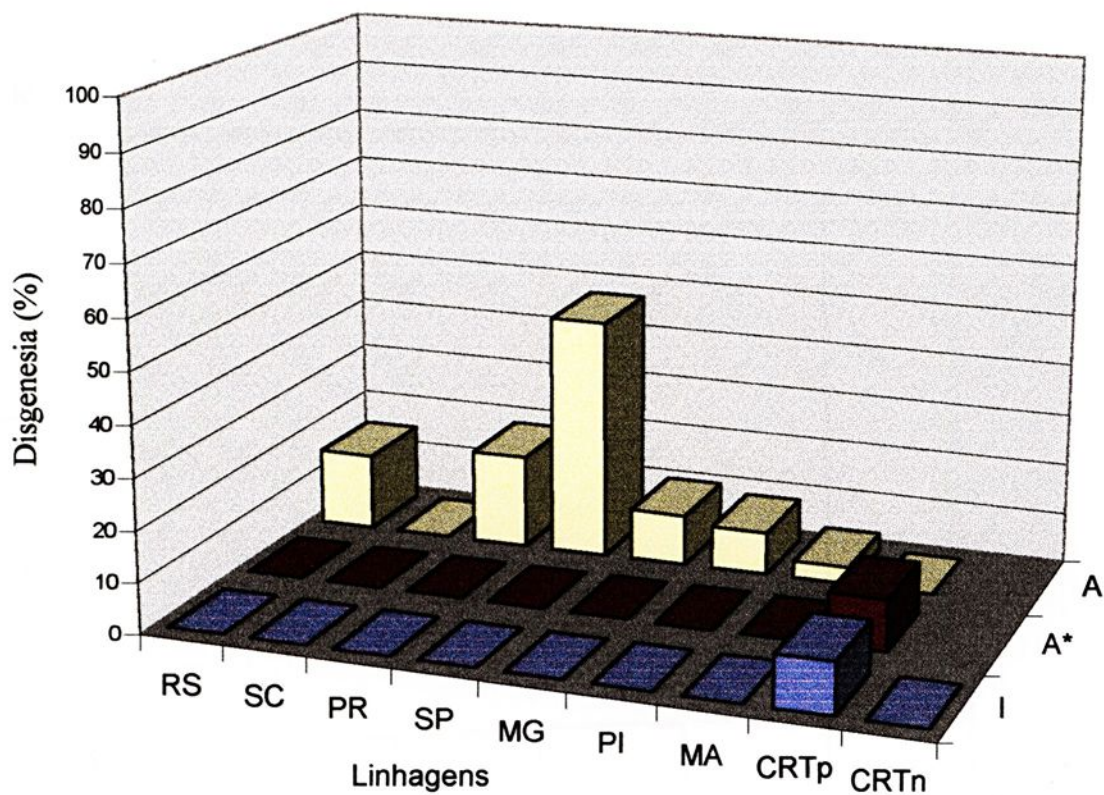


Figura 10. Frequências percentuais de fêmeas com ovários rudimentares, na descendência dos cruzamentos A, A* e intracruzamentos (I) realizados a 29°C (CRTp A: fCS vs mHw; CRTp A*: fHw vs mHw; CRTp I: fHw vs mHw; CRTn I: fCS vs mCS).

Similaridade

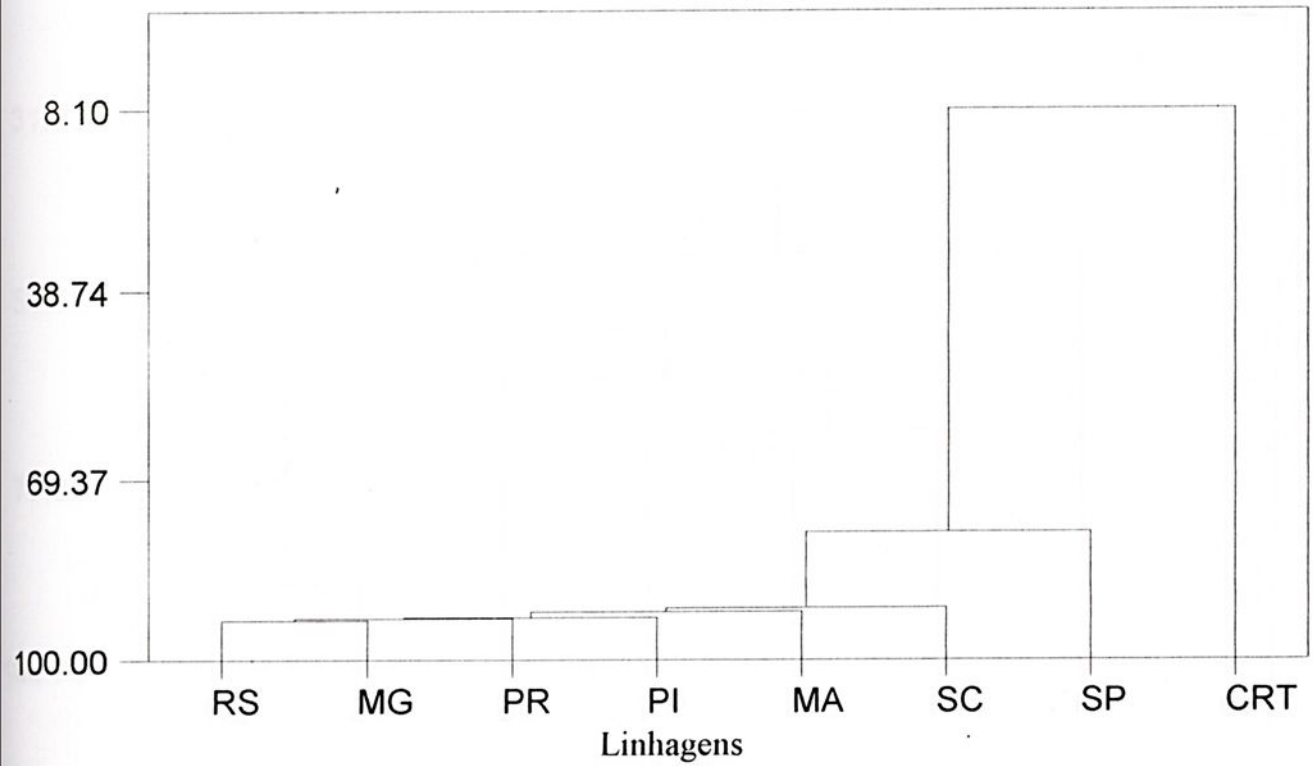


Figura 11. Similaridade das linhagens experimentais quanto às frequências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares, na descendência dos cruzamentos A realizados a 29°C (CRT: fêmeas **CS** vs machos **Hw**).

Similaridade

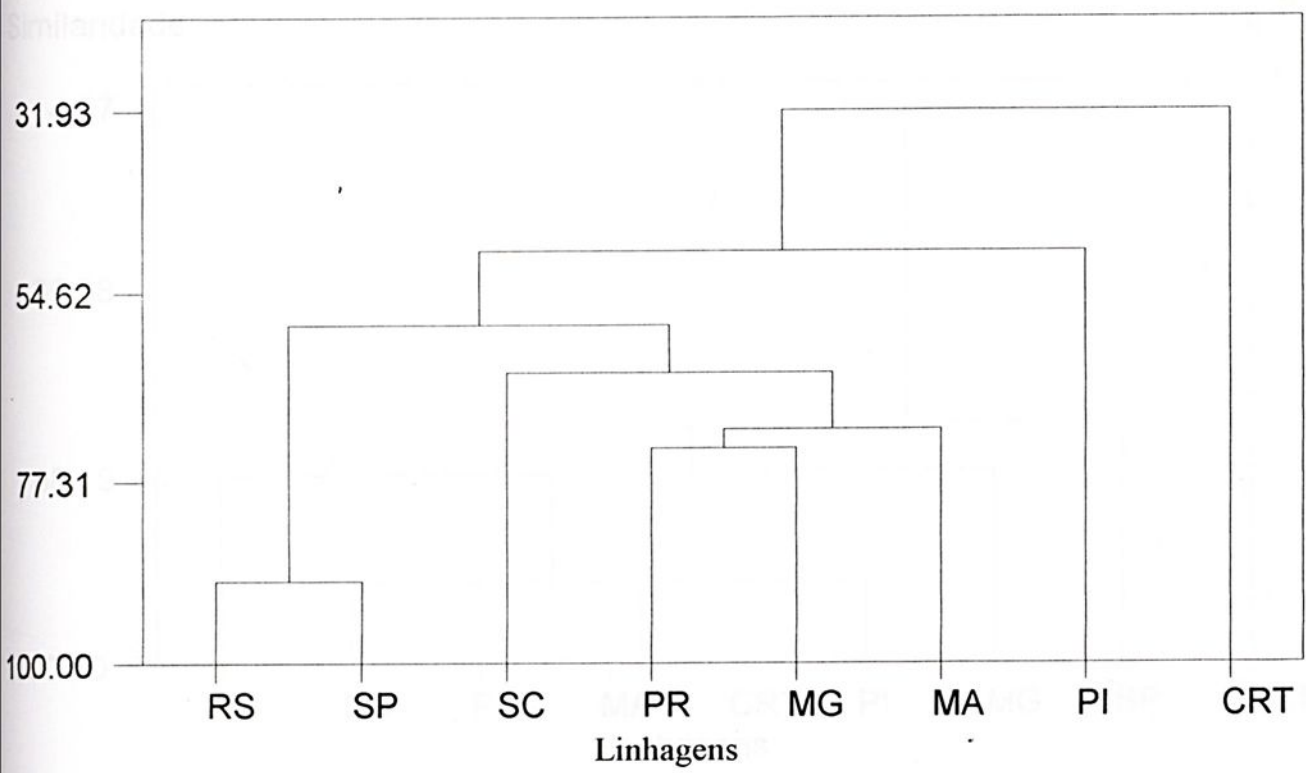


Figura 12. Similaridade das linhagens experimentais quanto às frequências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares, na descendência dos cruzamentos A* realizados a 29°C (CRT: fêmeas vs machos Hw).

Similaridade

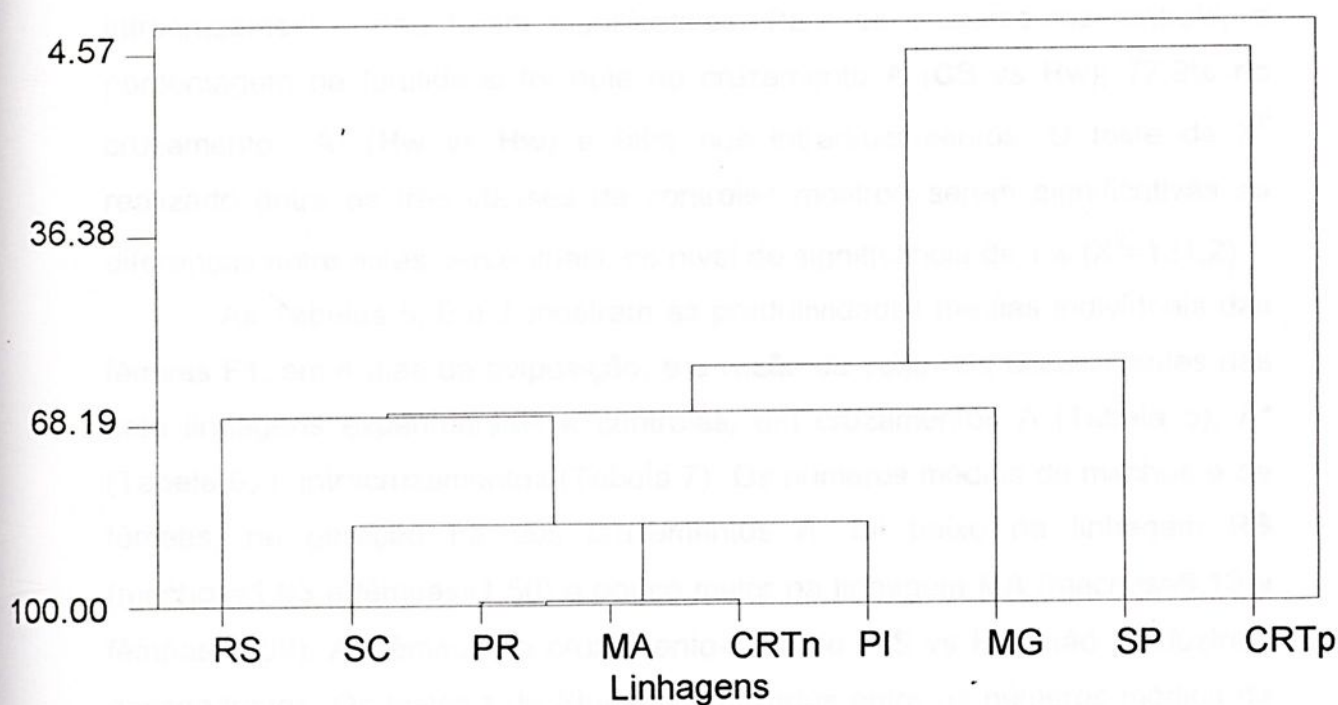


Figura 13. Similaridade das linhagens experimentais quanto às freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares na descendência dos intracruzamentos realizados a 29°C (CRTp: fêmeas vs machos **Hw**; CRTn: fêmeas vs machos **CS**).

3. Fertilidade e produtividade

O número de tubos com larvas e a fertilidade das fêmeas F1, descendentes dos cruzamentos realizados a 29°C, são apresentados na Tabela 4. Na descendência dos cruzamentos A, a linhagem **SC** apresentou a menor fertilidade (51,8%), com apenas 29 tubos com larvas e a linhagem **MA**, a maior (76,7%). Nos cruzamentos A*, a linhagem com menor fertilidade foi **SP** (51,7%) e a linhagem **SC**, com a maior (75%). As linhagens **MA** e **RS** foram as que apresentaram a menor (68,4%) e a maior (81,7%) freqüências percentuais de fertilidade nos intracruzamentos, respectivamente. Os valores de X^2 realizados para comparar os percentuais de fertilidade das sete linhagens experimentais, mostraram que as diferenças observadas entre cruzamentos A, A* e os intracruzamentos não foram significativas. Para os cruzamentos-controle, a porcentagem de fertilidade foi nula no cruzamento A (**CS** vs **Hw**); 77,9% no cruzamento A* (**Hw** vs **Hw**) e 98% nos intracruzamentos. O teste de X^2 realizado entre as três classes de controles mostrou serem significativas as diferenças entre estes percentuais, no nível de significância de 1% ($X^2=121,2$).

As Tabelas 5, 6 e 7 mostram as produtividades médias individuais das fêmeas F1, em 4 dias de oviposição, e a razão de sexo nos descendentes das sete linhagens experimentais e controles, em cruzamentos A (Tabela 5), A* (Tabela 6) e intracruzamentos (Tabela 7). Os números médios de machos e de fêmeas, na geração F2 dos cruzamentos A, foi baixo na linhagem **RS** (machos=1,63 e fêmeas=1,50) e pouco maior na linhagem **MA** (machos=6,13 e fêmeas=6,09). As fêmeas do cruzamento-controle (**CS** vs **Hw**) não produziram descendentes. Os testes *t* de Student, realizados entre os números médios de machos e de fêmeas, em cada linhagem, não apresentaram diferenças significativas. A análise de variância realizada para avaliar a homogeneidade das médias dos números de machos e de fêmeas produzidos pelas linhagens experimentais e pelos controles (Tabela 5), apresentaram diferenças significativas, tanto para machos ($F_{7;462}=20,67$ $p<0,01$), como para fêmeas ($F_{7;462}=17,74$ $p<0,01$). A menor razão de sexo ocorreu na linhagem **SC** (98,1%) e a maior na linhagem **PR** (174,2%). A análise de variância, para a homogeneidade das médias da razão de sexo, não mostrou diferenças significativas.



Os menores números médios de machos e de fêmeas descendentes dos cruzamentos **A*** (Tabela 6) ocorreram na linhagem **MG** (2,55 e 3,06, respectivamente); as maiores médias foram as da linhagem **SC** (8,50 para machos e 9,03 para fêmeas). Os testes *t* de Student não mostraram diferenças significativas entre os números médios de machos e fêmeas em cada linhagem, entretanto, as análises de variância realizadas para a homogeneidade das médias das sete linhagens experimentais e do cruzamento-controle (**Hw vs Hw**) apresentaram diferenças significativas, no nível de significância de 1%, tanto para os números médios de machos ($F_{7;468}=9,37$), quanto para os de fêmeas ($F_{7;468}=7,91$). A menor razão de sexo foi a obtida na linhagem **SC** (105%) e, a maior, na linhagem **MG** (141,2%). As análises de variância revelaram não serem significativas as diferenças da razão de sexo média das linhagens ($F_{7;260}=0,96$).

Para os intracruzamentos (Tabela 7), as médias dos números de machos e de fêmeas variaram entre 4,93, para machos, e 4,81, para fêmeas, na linhagem **RS**, a 13,93 e 13,12 para machos e fêmeas, respectivamente, na linhagem **SC**. Como ocorreu nos cruzamentos **A** e **A***, também para fêmeas descendentes dos intracruzamentos, os testes *t* de Student não apresentaram diferenças significativas entre as médias dos dois sexos. Foram encontradas diferenças significativas, no nível de significância de 1%, entre os números médios de machos ($F_{8;535}=12,64$) e de fêmeas ($F_{8;535}=9,43$), das linhagens experimentais e dos cruzamentos-controle (**Hw vs Hw** e **CS vs CS**). Quanto à razão de sexo, a menor porcentagem obtida foi na linhagem **SC** (100%) e, a maior, na linhagem **CS** (144%). As análises de variância não mostraram diferenças significativas entre as médias da razão de sexo.

O número médio de imagos da geração F2 dos cruzamentos experimentais e controles estão apresentados na Tabela 8. As análises de variância realizadas para avaliar a homogeneidade das médias de imagos produzidos nos três tipos de cruzamentos (**A**, **A*** e **I**) e nos cruzamentos-controle, mostraram diferenças significativas, no nível de significância de 1%, para as linhagens **RS**, **SC**, **PR**, **SP**, **MG** e **PI** e nos três cruzamentos-controle. Apenas a linhagem **MA** apresentou médias significativamente diferentes, no nível de significância de 5%. A comparação das médias das linhagens em cada cruzamento mostrou heterogeneidade para a descendência dos cruzamentos **A**



($F_{7;462}=21,27$ $p<0,01$), $A^*(F_{7;468}=9,04$ $p<0,01$) e nos intracruzamentos ($F_{8;535}=11,52$ $p<0,01$).

Também para a descendência, procurou-se estabelecer relações de similaridade das linhagens. Em descendentes do cruzamento A (Figura 14), as linhagens com maior grau de similaridade foram **PR** e **MG** (91,4%), seguidas por **SP** (90,6), **RS** (89,6%) e **SC** (87,2%). **PI** apresentou 68,0% de similaridade em relação às demais e a linhagem **MA** foi a mais diferenciada (54,2%). Para descendentes dos cruzamentos A^* (Figura 15), **SP** e **MA** foram as mais similares (97,4%), seguidas por **PR** e **RS** (94,8%), **MG** com 91,2% de semelhança em relação às duas anteriores e as linhagens **SC** e **PI**, as mais diferenciadas, com 60,0% de similaridade entre si e 58,4% em relação às demais. Nos intracruzamentos (Figura 16), as linhagens mais similares quanto a produtividade e razão de sexo foram **SP** e **MG** (98,0%), seguidas pelas linhagens **PR** e **MA** (97,5%) e **RS** (95,5%). A linhagem **PI** apresentou 79,8% de similaridade em relação às anteriores e, a linhagem **SC**, apenas 41,55%.



Tabela 4. Número de tubos com larvas (L) e frequência percentual de fertilidade (%), em fêmeas descendentes dos cruzamentos A, A*, intracruzamentos (I) e dos cruzamentos-controle realizados a 29°C (N: número total de tubos; χ^2 de contingência; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagem	A			A*			I		
	N	L	%	N	L	%	N	L	%
RS	60	33	55,0	60	30	50,0	60	49	81,7
SC	55	29	51,8	60	45	75,0	60	46	76,7
PR	60	43	71,7	50	26	52,0	60	45	75,0
SP	57	38	66,7	60	31	51,7	60	44	73,4
MG	60	34	56,7	60	37	61,7	60	46	76,7
PI	59	36	61,0	60	38	63,4	60	50	83,4
MA	60	46	76,7	60	36	60,0	60	41	68,4
χ^2		12,76			12,61			5,13	
CS vs Hw	51	0	0	-	-	-	-	-	-
Hw vs Hw	-	-	-	59	46	77,9	-	-	-
CS vs CS	-	-	-	-	-	-	58	57	98,0
χ^2					121,20**				



Tabela 5. Produtividade média individual de fêmeas e de machos produzidos na geração F2 dos cruzamentos A, das sete linhagens e dos cruzamentos-controle realizados a 29°C, em quatro dias de oviposição (t para a diferenças entre médias; F para a homogeneidade das médias; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagem	Machos		Fêmeas		t	Razão de Sexo	
	x	Sx	x	Sx		x	Sx
RS	1,63	± 0,27	1,50	± 0,25	0,36	143,5	± 21,60
SC	2,92	± 0,49	2,62	± 0,50	0,43	98,1	± 10,00
PR	2,25	± 0,31	2,85	± 0,36	1,26	174,2	± 20,80
SP	2,05	± 0,30	2,16	± 0,31	0,24	118,1	± 16,00
MG	1,78	± 0,28	2,42	± 0,37	1,37	167,8	± 23,30
PI	4,24	± 0,63	4,10	± 0,64	0,15	119,4	± 17,60
MA	6,13	± 0,55	6,09	± 0,54	0,07	106,5	± 6,12
CS vs Hw	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	-	-	-
F	20,67**		17,74**			3,13	



Tabela 6. Produtividade média individual de fêmeas e de machos produzidos na geração F2 dos cruzamentos A*, das sete linhagens e dos cruzamentos-controle realizados a 29°C, em quatro dias de oviposição (t para a diferenças entre médias; F para a homogeneidade das médias; **:p<0,01; *: p<0,05).

Linhagem	Machos		Fêmeas		t	Razão de Sexo	
	x	Sx	x	Sx		x	Sx
RS	3,40	± 0,65	3,43	± 0,64	0,04	118,5	± 14,70
SC	8,50	± 0,94	9,03	± 0,96	0,06	105,1	± 6,70
PR	3,82	± 0,69	4,14	± 0,84	0,29	111,9	± 13,00
SP	3,98	± 0,68	3,95	± 0,64	0,04	113,5	± 11,00
MG	2,55	± 0,44	3,06	± 0,54	0,74	141,2	± 18,70
PI	6,50	± 0,62	7,00	± 0,82	0,24	109,3	± 5,28
MA	3,80	± 0,57	3,90	± 0,64	0,12	129,2	± 17,60
Hw vs Hw	5,53	± 0,67	5,68	± 0,66	0,16	118,4	± 9,41
F	9,37**		7,91**			0,96	

Tabela 7. Produtividade média individual de fêmeas e de machos produzidos na geração F2 dos intracruzamentos e dos cruzamentos-controle realizados a 29°C, em quatro dias de oviposição (t para a diferença entre médias; F para a homogeneidade das médias; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagem	Machos		Fêmeas		t	Razão de Sexo	
	x	Sx	x	Sx		x	Sx
RS	4,93 ± 0,72		4,81 ± 0,81		0,11	103,3 ± 11,10	
SC	13,93 ± 1,25		13,12 ± 1,19		0,47	100,0 ± 5,62	
PR	4,98 ± 0,58		5,46 ± 0,63		0,56	135,3 ± 17,00	
SP	6,43 ± 0,84		7,06 ± 0,96		0,50	113,7 ± 7,79	
MG	6,61 ± 0,96		6,83 ± 0,96		0,16	118,5 ± 12,90	
PI	8,00 ± 0,76		9,00 ± 0,78		0,03	102,7 ± 4,45	
MA	5,30 ± 0,65		5,30 ± 0,69		0,00	117,1 ± 14,50	
Hw vs Hw	5,53 ± 0,67		5,68 ± 0,66		0,16	118,4 ± 9,41	
CS vs CS	5,79 ± 0,54		6,42 ± 0,57		0,42	144,1 ± 15,90	
F	12,64**		9,43**			1,83	

Tabela 8. Produtividade média individual de imagos, na geração F2 dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos (I), das sete linhagens e dos cruzamentos-controle realizados a 29°C (F para a homogeneidade das médias; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagem	A		A*		I		F
	x	Sx	x	Sx	x	Sx	
RS	3,13	± 0,50	6,83	± 1,28	9,75	± 1,51	7,93**
SC	5,55	± 0,95	18,15	± 1,87	27,05	± 2,39	32,99**
PR	5,10	± 0,61	7,96	± 1,49	10,45	± 1,17	6,17**
SP	4,21	± 0,55	7,93	± 1,30	13,50	± 1,77	12,33**
MG	4,20	± 0,61	5,61	± 0,95	13,45	± 1,89	15,33**
PI	8,34	± 1,20	13,50	± 1,62	18,00	± 1,52	8,74**
MA	12,22	± 1,05	7,70	± 1,17	10,62	± 1,28	3,83*
Controles	0,00	± 0,00	11,20	± 1,27	12,21	± 1,02	45,20**
F	21,27**		9,04**		11,52**		

Controles: (A: CS versus Hw; A*: Hw versus Hw; I: CS versus CS e Hw versus Hw)

Similaridade

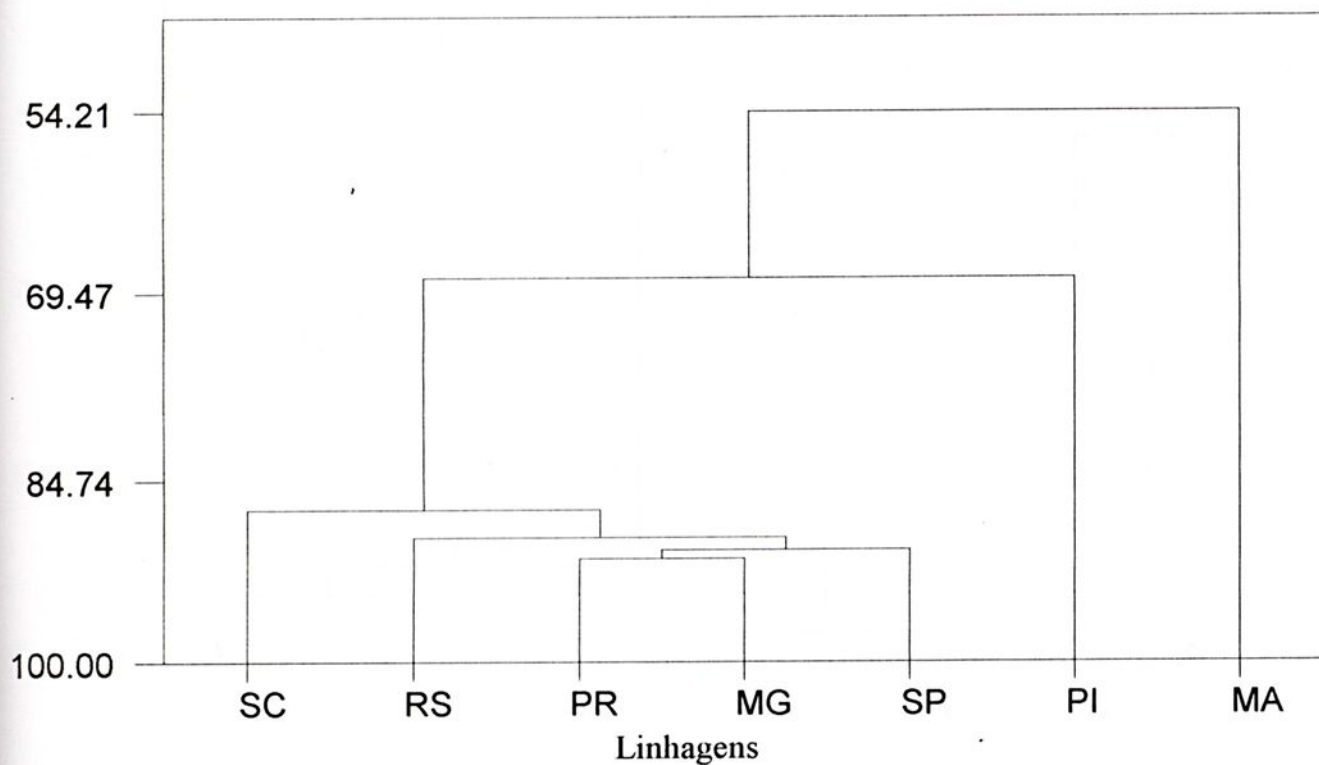


Figura 14. Similaridade das linhagens experimentais quanto à produtividade e à razão de sexo na geração F₂ dos cruzamentos A realizados a 29°C.

Similaridade

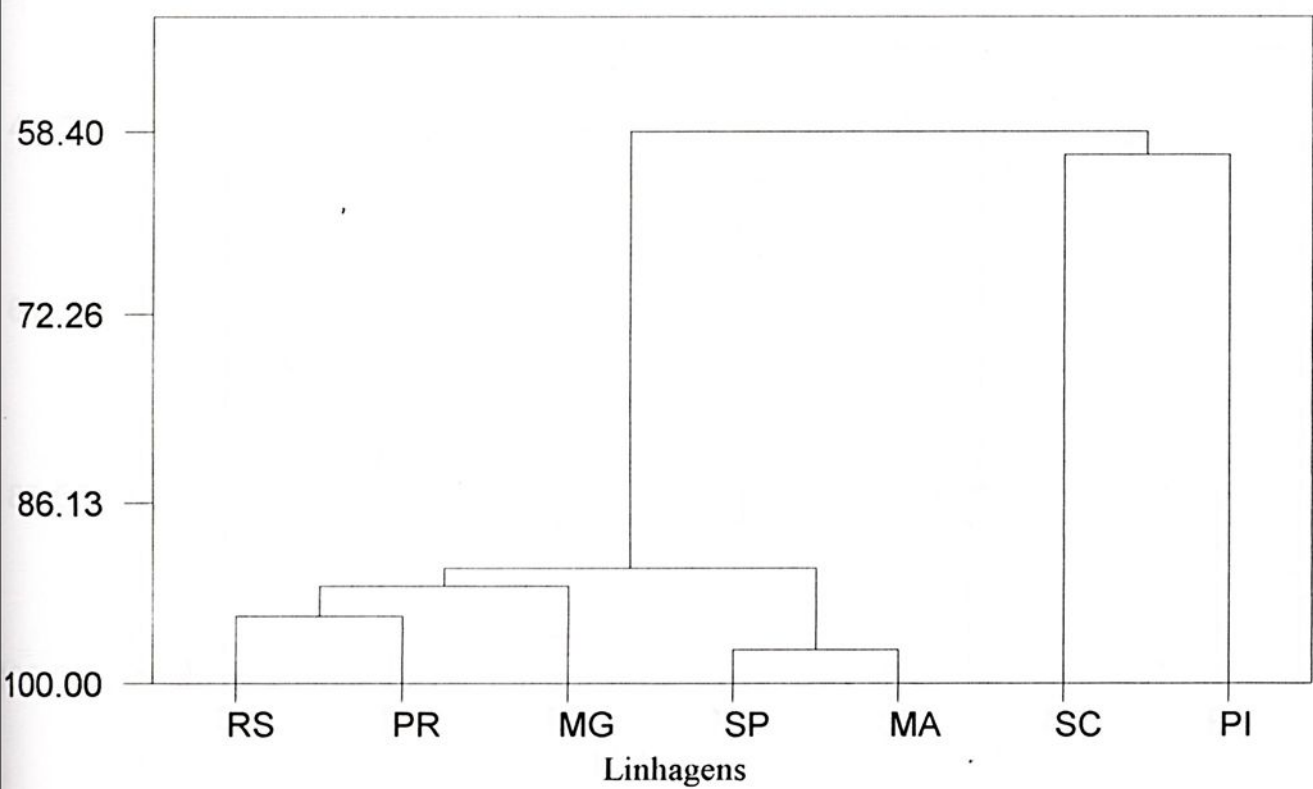


Figura 15. Similaridade das linhagens experimentais quanto à produtividade e à razão de sexo na geração F₂ dos cruzamentos A* realizados a 29°C.



similaridade

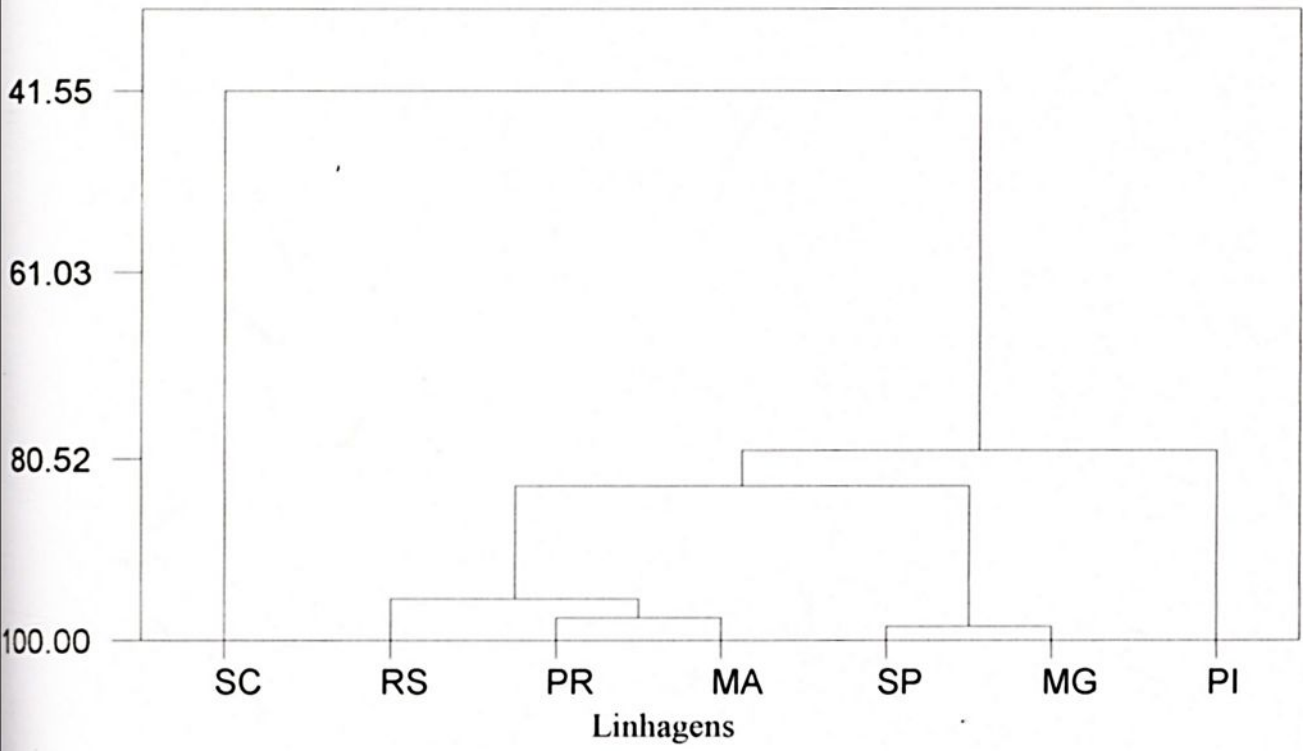


Figura 16. Similaridade das linhagens experimentais quanto à produtividade e à razão de sexo na geração F₂ dos intracruzamentos, realizados a 29°C.

4. Similaridade das linhagens para o conjunto de variáveis estudadas a

29°C

Considerando-se todas as variáveis analisadas, isto é, a frequência de indivíduos com gônadas disgênicas e rudimentares e o número de descendentes e a razão de sexo dos três tipos de cruzamentos, os graus de similaridades obtidos classificaram as linhagens **RS** e **PR** como as mais similares (89,1%), seguidas por **SP** e **MG** com 87,7% de semelhanças entre si e com 83,9% em relação às anteriores. A linhagem **MA** apresentou 65,4% de similaridade, **PI** apresentou 63,2% e **SC** mostrou apenas 44,86% de similaridade em relação às demais (Figura 17).

Similaridade

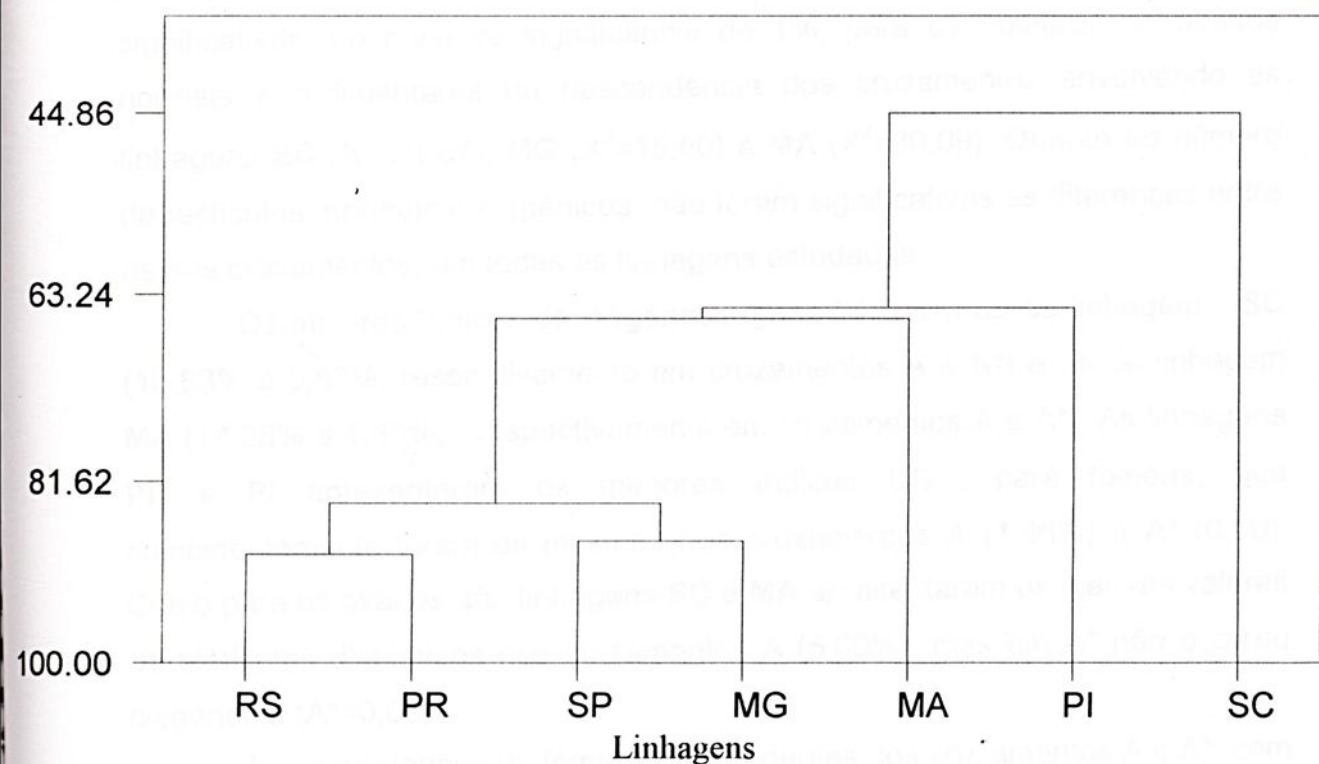


Figura 17. Similaridade das linhagens experimentais quanto às freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas, ovários rudimentares, produtividade e razão de sexo na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 29°C.

B. Análises fenotípicas em cruzamentos realizados a 25°C

1. Disgenesia gonadal

A Tabela 9 mostra os números de fêmeas e de machos com ovários e testículos disgênicos descendentes dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos. As linhagens que apresentaram os maiores números de ovários e de testículos disgênicos foram **MA** e **SC**. A análise de X^2 mostrou diferenças não-significativas para as três classes de ovários (normais, uni e bilateralmente disgênicos), na descendência dos três tipos de cruzamentos (A, A* e I), para as linhagens **RS**, **PR**, **SP** e **PI**. Entretanto, as diferenças foram significativas, no nível de significância de 1%, para os números de ovários normais e rudimentares na descendência dos cruzamentos envolvendo as linhagens **SC** ($X^2=21,67$), **MG** ($X^2=15,50$) e **MA** ($X^2=30,09$). Quanto ao número de testículos, normais e disgênicos, não foram significativas as diferenças entre os três cruzamentos, em todas as linhagens estudadas.

Os maiores índices de disgenesia gonadal foram os da linhagem **SC** (15,83% e 0,83%, respectivamente em cruzamentos A e A*) e os da linhagem **MA** (14,28% e 1,66%, respectivamente em cruzamentos A e A*). As linhagens **PR** e **PI** apresentaram os menores índices DG para fêmeas, que coincidentemente foram os mesmos nos cruzamentos A (1,66%) e A* (0,00). Como para os ovários, as linhagens **SC** e **MA** apresentaram os maiores valores de testículos disgênicos nos cruzamentos A (5,00%), mas em A* não ocorreu disgenesia (A*=0,00).

As porcentagens de fêmeas descendentes dos cruzamentos A e A* com ovários rudimentares encontram-se na Tabela 10. A linhagem que apresentou o maior valor foi **SC** (48,9%). Ovários rudimentares também foram observados em fêmeas dos cruzamentos A* das linhagens **SC**, **PR**, **SP** e **PI**, ao contrário do observado nos cruzamentos realizados a 29°C. Os valores do X^2 de homogeneidade, realizados para a comparação do número de fêmeas com ovários reduzidos em descendentes dos cruzamentos A e A* diferiram significativamente para as linhagens **RS** ($X^2=10,94$; $p<0,01$), **SC** ($X^2=15,82$;

$p < 0,01$), **SP** ($X^2=9,46$; $p < 0,01$) e **MG** ($X^2=9,09$; $p < 0,01$) e, no nível de significância de 5%, para a linhagem **MA** ($X^2=4,37$).

Como para os cruzamentos a 29°C, foram realizados cruzamentos-controle dos três tipos de cruzamentos experimentais, também a 25°C.

O controle positivo dos cruzamentos A teve por objetivo determinar se os elementos transponíveis *hobo* eram ativos na linhagem **Canton-S**. Quando fêmeas **Canton-S** são cruzadas com machos da linhagem **23,5/CyL**, que são H-M, ocorre disgenesia gonadal moderada, quando a progênie híbrida desenvolve-se a 25°C, devido à mobilização dos elementos presentes nos cromossomos dos machos destas linhagens, no citotipo E-M, da linhagem **Canton-S**.

O controle positivo do cruzamento A* foi realizado com a linhagem **23,5/CyL** (**23,5/CyL** vs **23,5/CyL**), para evidenciar a habilidade regulatória do citotipo desta linhagem, pela baixa frequência de disgenesia gonadal decorrente de seu citotipo H-M. Como controle negativo, nos dois tipos de cruzamentos, foram realizados intracruzamentos da linhagem **Canton-S**.

Para os intracruzamentos, foram utilizados controles considerados como positivos e como negativos. O controle positivo (**23,5/CyL** vs **23,5/CyL**), que produz baixa frequência de disgenesia gonadal, é indicativo da habilidade regulatória do citotipo H, dependente da presença destes elementos no genoma destas linhagens. Como controle negativo, em que se espera frequência nula ou efetivamente baixa de disgenesia gonadal, indicativa da inexistência do elemento transponível *hobo* completo, foram realizados intracruzamentos da linhagem **Canton-S**, a 25°C.

O número de indivíduos com ovários e testículos disgênicos descendentes dos cruzamentos-controle são apresentados na Tabela 11. Os cruzamentos entre fêmeas **CS** e machos **23,5/CyL** produziram indivíduos com grau de disgenesia moderado, com índices DG iguais a 25,0% para fêmeas e 10,0% para machos. Em intracruzamentos de casais **23,5CyL** ou de casais **CS**, o grau de disgenesia observado foi baixo para os ovários (0,83% e 1,7%, respectivamente). Não foi observada disgenesia em testículos dos indivíduos descendentes de ambos cruzamentos. O teste de X^2 realizado entre os percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas destes três cruzamentos-controle mostrou serem as diferenças significativas no nível de significância de



1% ($X^2=46,7$) para o número de fêmeas com ovários normais e disgênicos e para o número de machos com testículos normais e disgênicos ($X^2=10,9$). O cruzamento-controle **CS** vs **23,5 CyL** apresentou dentre os ovários normais, muitos com redução de tamanho (31,4%).

Na Figura 18 são apresentadas as freqüências percentuais de fêmeas com ovários disgênicos, na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos. As fêmeas descendentes das linhagens **MA** e **SC** apresentaram os maiores índices de ovários disgênicos. Para o cruzamento-controle de A, os percentuais foram próximos a 40%.

Nos cruzamentos A*, os descendentes das linhagens **MG**, **RS** e **SP** destacaram-se pela freqüência de ovários disgênicos. Nos descendentes dos intracruzamentos, apenas a linhagem experimental **SC** apresentou ovários disgênicos, embora em freqüência inferior a 2%. Os cruzamentos-controle positivo e negativo também apresentaram ovários disgênicos.

A Figura 19 mostra as freqüências de machos com testículos disgênicos na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos. No cruzamento A, os machos que apresentaram os maiores percentuais foram os descendentes das linhagens **MA** e **SC** e do cruzamento-controle **CS** vs **23,5/CyL**. Na geração F1, dos cruzamentos A*, foram observados testículos disgênicos em descendentes das linhagens **RS**, **SP** e **MG**; nos intracruzamentos estes não ocorreram.

As porcentagens de fêmeas com ovários rudimentares, em relação ao total de fêmeas dissecadas, são apresentadas na Figura 20. As fêmeas da geração F1 das linhagens experimentais **SC** e **SP** apresentaram os maiores percentuais em cruzamentos A. Também em cruzamentos A*, a maior freqüência de ovários rudimentares ocorreu na linhagem **SC**.

Para os cruzamentos realizados a 25°C, as análises de agrupamento das linhagens, considerando os percentuais de fêmeas com gônadas disgênicas e rudimentares, na descendência dos cruzamentos A (Figura 21), mostraram maior similaridade entre as linhagens **RS** e **PI** (83,0%), seguidas por **PR**, com 81,6% de semelhança em relação às anteriores. **MG** e **MA** apresentaram 72,1% de similaridade entre si e a linhagem **SP** apresentou 65,5% de similaridade em relação às linhagens **RS**, **PI** e **PR**. A linhagem **SC** foi a mais diferenciada das



linhagens experimentais, com apenas 59,1% de similaridade. O controle **CS** vs **23,5/CyL** apresentou apenas 49,2% de semelhança em relação às linhagens experimentais.

No cruzamento **A*** (Figura 22), **PR** e **PI** apresentaram 88,0% de similaridade entre si, enquanto que a linhagem **SC** apresentou uma similaridade de 75,0% em relação a estas duas. **MA** e o controle **23,5Cy/L** vs **23,5Cy/L** apresentaram 83,9% de semelhanças entre si, seguidos por **RS** (73,6%), **MG** (66,4%) e **SP** (62,6%). Estas cinco últimas linhagens foram 58,8% semelhantes em relação às três primeiras.

Nos intracruzamentos (Figura 23), as linhagens **RS, PR, SP, MG, PI, SP** e **MA** e o controle **Hw** vs **Hw** apresentaram 99,0% de similaridade. O controle negativo (**CS** vs **CS**) diferiu acentuadamente em relação às demais linhagens, com apenas 47,3% de similaridade.

PR	A	59	30	58	2	0	2	39	0	0	1,96	0,00
	A*	59	30	58	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	I	59	30	58	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	X ²				3,96							
SP	A	59	30	53	3	2	8	29	1	1	6,03	1,66
	A*	59	30	58	2	0	2	29	1	1	1,66	1,66
	I	59	30	58	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	X ²				7,30						4,05	
MG	A	58	30	47	11	0	11	29	1	1	0,48	1,66
	A*	58	30	57	0	0	3	29	1	0	2,50	1,66
	I	58	30	58	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	X ²				15,30*						1,01	
PI	A	59	30	57	3	0	3	28	2	0	1,66	3,33
	A*	59	30	53	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	I	59	30	58	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	X ²				6,60						4,13	
MA	A	56	30	42	12	2	14	27	3	0	14,28	5,00
	A*	56	30	59	0	1	1	30	0	0	1,66	0,00
	I	59	30	58	0	0	0	30	0	0	0,00	0,00
	X ²				30,09*						6,20	
Cruzamentos: A: fêmeas CS vs machos RS, SC, PR, SP, MG, PI e MA												
A*: fêmeas RS, SC, PA, SP, MG, PI e MA vs machos 23,5CyL												
I: intracruzamentos												

Tabela 9. Números de indivíduos portadores de ovários e testículos disgênicos e índices de disgenesia gonadal (DG), em descendentes dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 25°C (número de indivíduos com ovários e testículos normais (No), uni (Uni) e bilateralmente (Bi) disgênicos e Total (T); número de indivíduos dissecados (N), fêmeas (F) e machos (M); X^2 de homogeneidade; **: $p<0,01$; *: $p<0,05$).

Linhagem		N		Fêmeas				Machos				DG(%)	
		F	M	No	Uni	Bi	T	No	Uni	Bi	T	F	M
RS	A	60	30	58	1	1	2	30	0	0	0	2,50	0,00
	A*	60	30	58	2	0	2	29	0	1	1	1,66	3,33
	I	59	30	59	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	X^2				4,13				2,03				
SC	A	60	30	47	7	6	13	27	3	0	3	15,83	5,00
	A*	60	30	59	1	0	1	30	0	0	0	0,83	0,00
	I	60	30	59	1	0	1	30	0	0	0	0,83	0,00
	X^2				21,67**				6,20				
PR	A	60	30	58	2	0	2	30	0	0	0	1,66	0,00
	A*	59	30	59	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	I	60	30	60	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	X^2				3,96				0,00				
SP	A	58	30	53	3	2	5	29	1	0	1	6,03	1,66
	A*	60	30	58	2	0	2	29	1	0	1	1,66	1,66
	I	60	30	60	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	X^2				7,30				4,05				
MG	A	58	30	47	11	0	11	29	1	0	1	9,48	1,66
	A*	60	30	57	3	0	3	29	1	0	1	2,50	1,66
	I	59	30	59	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	X^2				15,50**				1,01				
PI	A	60	30	57	3	0	3	28	2	0	2	1,66	3,33
	A*	59	30	59	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	I	59	30	60	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	X^2				6,00				4,13				
MA	A	56	30	42	12	2	14	27	3	0	3	14,28	5,00
	A*	60	30	59	0	1	1	30	0	0	0	1,66	0,00
	I	59	30	59	0	0	0	30	0	0	0	0,00	0,00
	X^2				30,09**				6,20				

Cruzamentos A: fêmeas CS vs machos RS, SC, PR, SP, MG, PI e MA
A*: fêmeas RS, SC, PA, SP, MG, PI e MA vs machos 23,5/CyL
I: intracruzamentos

Tabela 10. Porcentagem de fêmeas com ovários rudimentares, descendentes dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 25°C (N: número de fêmeas férteis; X^2 de contingência para o número de ovários reduzidos entre os cruzamentos A e A*; X^2 de homogeneidade**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagem		Normais	Rudimentares	
		N	N	%
RS	A	58	10	17,2
	A*	58	0	0,0
	X^2		10,94**	
	I	59	0	0,0
SC	A	47	23	48,9
	A*	59	8	13,5
	X^2		15,82**	
	I	59	0	0,0
PR	A	58	3	5,1
	A*	59	6	10,1
	X^2		1,02	
	I	60	0	0,0
SP	A	58	15	28,3
	A*	58	3	5,1
	X^2		9,46**	
	I	60	0	0,0
MG	A	47	7	14,8
	A*	57	0	0,0
	X^2		9,09**	
	I	59	0	0,0
PI	A	57	7	12,8
	A*	59	5	8,5
	X^2		0,45	
	I	60	0	0,0
MA	A	42	3	7,2
	A*	59	0	0,0
	X^2		4,37*	
	I	50	0	0,0

Cruzamentos A: fêmeas CS vs machos RS, SC, PR, SP, MG, PI e MA; A*: fêmeas RS, SC, PA, SP, MG, PI e MA vs machos 23,5/CyL; I: intracruzamentos

Tabela 11. Número de indivíduos portadores de gônadas disgênicas, de ovários rudimentares e índice de disgenesia gonadal (DG), em descendentes dos cruzamentos-controle realizados a 25°C (Uni e Bi: número de indivíduos com ovários e testículos uni e bilateralmente disgênicos; N: número de indivíduos dissecados; %: frequência de ovários rudimentares; χ^2 de contingência; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Indivíduos		Cruzamentos		
		CS vs 23,5	23,5 vs 23,5	CS vs CS
Fêmeas	N	60	60	59
	Normais	35	59	57
	Uni	20	1	2
	Bi	5	0	0
	DG(%)	25,0	0,8	1,7
	χ^2		46,7**	
	Rudimentares	11	0	0
	%	31,4	0,0	0,0
	χ^2		40,00**	
Machos	N	30	30	30
	Normais	25	30	30
	Uni	4	0	0
	Bi	1	0	0
	DG(%)	10,0	0	0
	χ^2		10,9**	

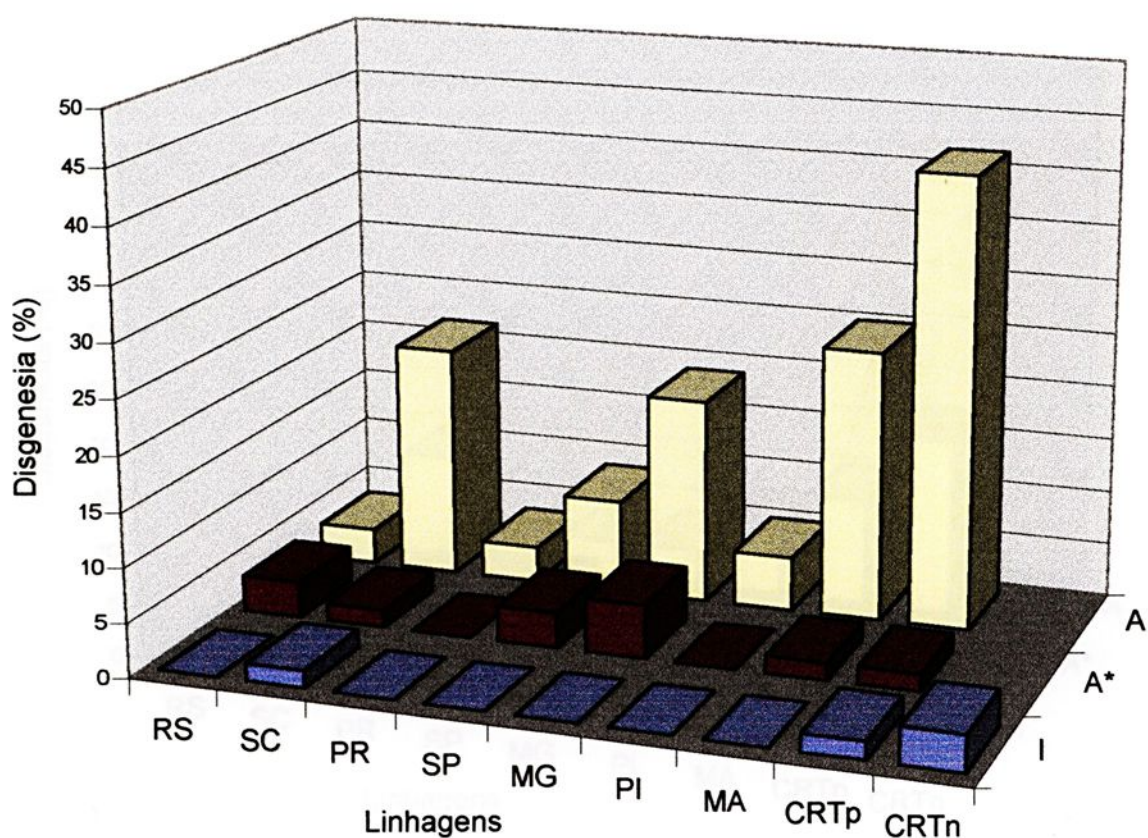


Figura 18. Frequências percentuais de fêmeas com ovários disgênicos, na descendência dos cruzamentos A, A* e intracruzamentos (I) realizados a 25°C (CRTp A: fCS vs m 23,5; CRTp A*: f23,5 vs m23,5; CRTp I: f23,5 vs m23,5; CRTn I: fCS vs mCS).

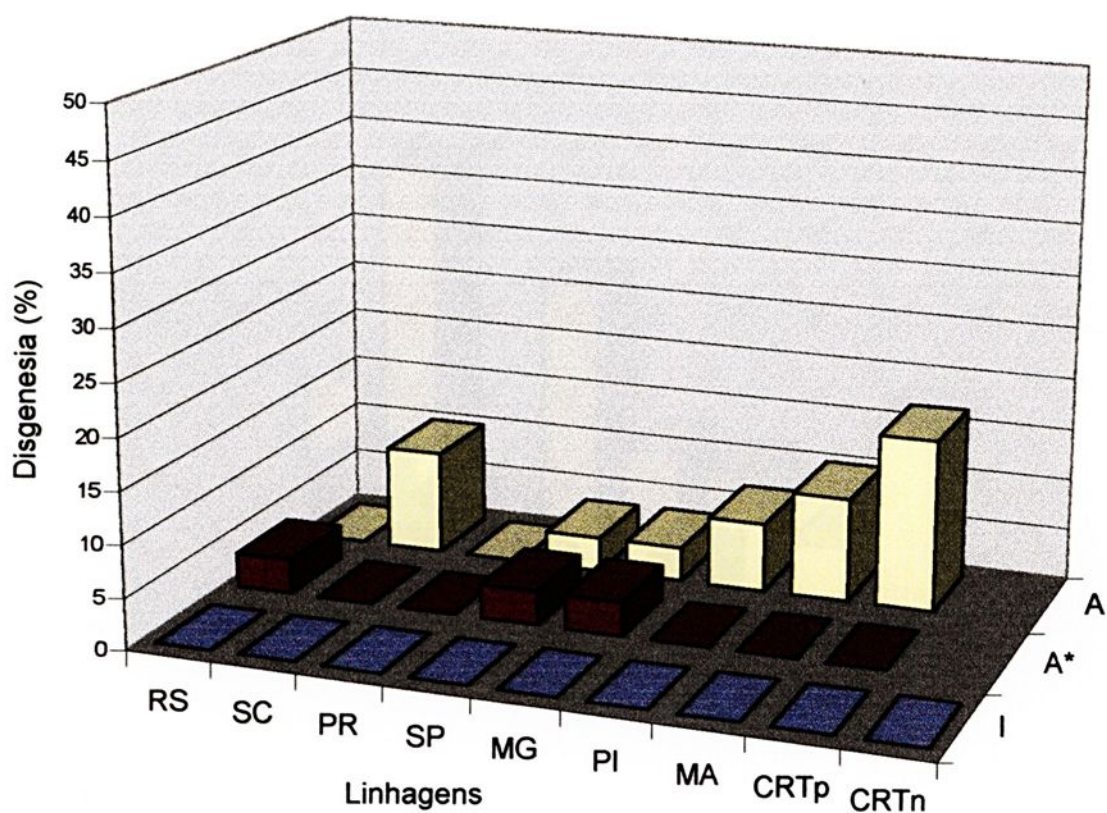


Figura 19. Frequências percentuais de machos com testículos disgênicos, na descendência dos cruzamentos A, A* e intracruzamentos (I) realizados a 25°C (CRTp A: fCS vs m23,5; CRTp A*: f23,5 vs m23,5; CRTp I: f23,5 vs m23,5; CRTn I: fCS vs mCS).

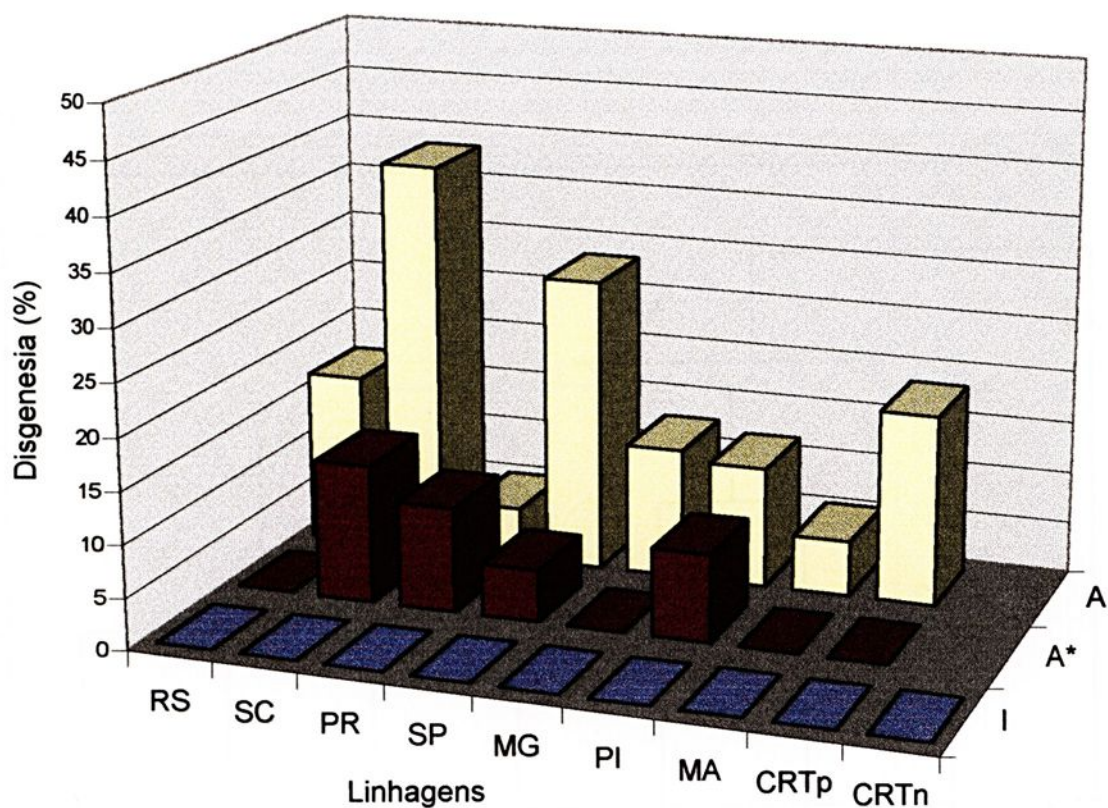


Figura 20. Frequências percentuais de fêmeas com ovários rudimentares, na descendência dos cruzamentos A, A* e intracruzamentos (I) realizados a 25°C (CRTp A: fCS vs m23,5; CRTp A*: f23,5 vs m23,5; CRTp I: f23,5vs m23,5; CRTn I: fCS vs mCS).

Similaridade

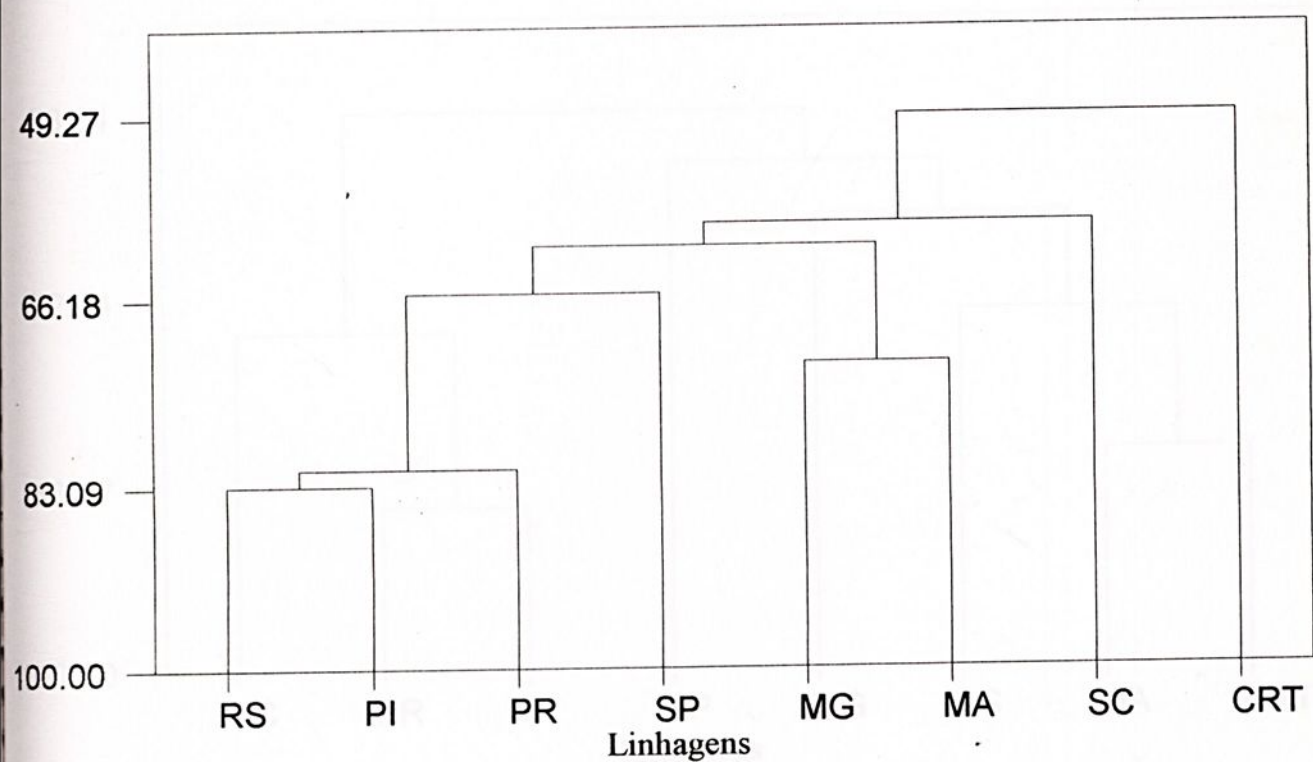


Figura 21. Similaridade das linhagens experimentais quanto às frequências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares, na descendência dos cruzamentos A realizados a 25°C (CRT: fêmeas **CS** vs machos **23,5**).

Similaridade

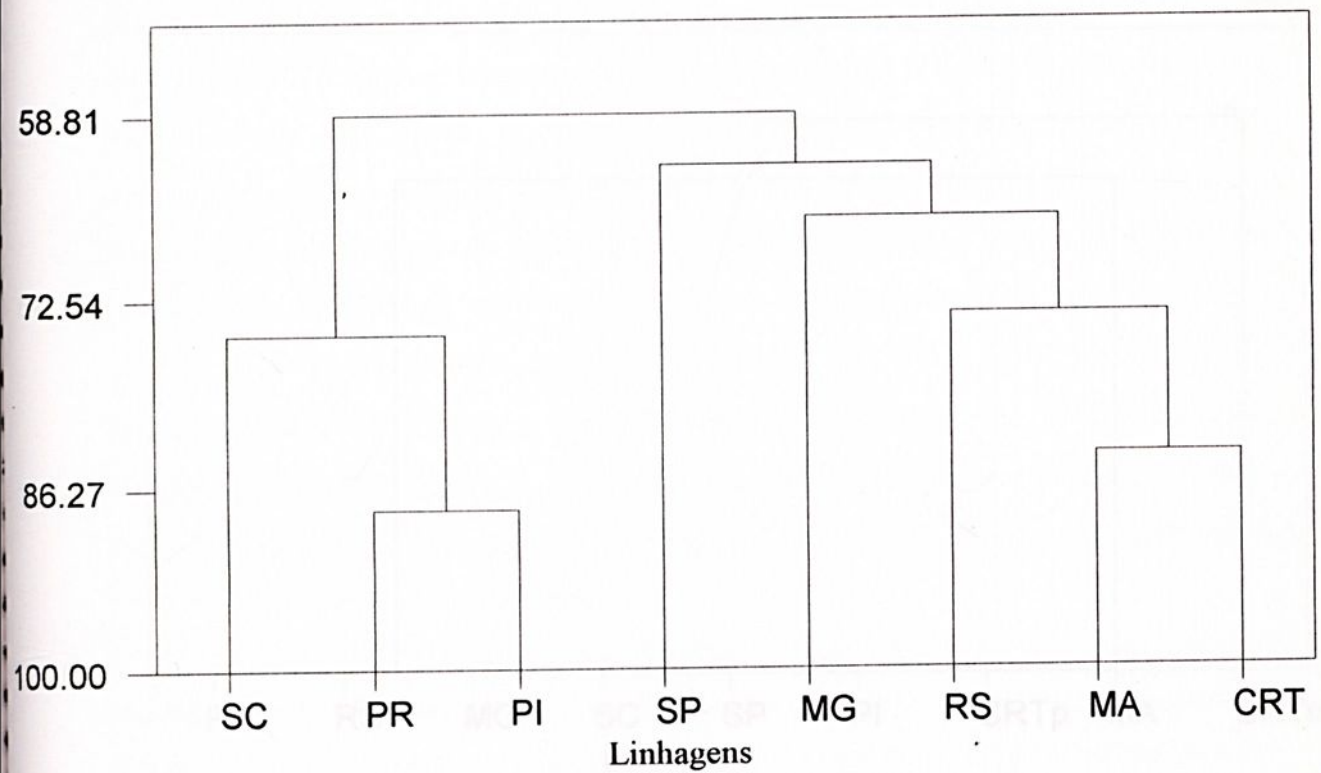


Figura 22. Similaridade das linhagens experimentais quanto às freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares na descendência dos cruzamentos A* realizados a 25°C (CRT: fêmeas vs machos **23,5**).



2. Fertilidade e produtividade

As porcentagens de tubos com larvas e de fertilidade das fêmeas F1 estão apresentadas na Tabela 12. Os valores obtidos variaram de 58,3% (**RS**) a 85,7% (**MA**) em fêmeas descendentes de cruzamentos A; de 52,5% (**PI**) a 85,0% (**SC**) em descendentes de cruzamentos A* e de 79,6% (**MA**) a 89,8% (**MG**) nos intracruzamentos. As fêmeas descendentes da linhagem **MA** apresentaram maior fertilidade na geração F1 dos cruzamentos A que as descendentes dos cruzamentos A* ou dos intracruzamentos; já as fêmeas descendentes das linhagens **SC** e **MG** apresentaram fertilidade superior nos cruzamentos A* e nos intracruzamentos, respectivamente. Entre os controles, descendentes do intracruzamento da linhagem **23,5CyL** apresentaram a maior fertilidade (86,7%), sendo superior à da linhagem **SC** que apresentou o maior valor entre as linhagens experimentais. Os χ^2 de contingência, realizados para comparar os números de fêmeas férteis e não-férteis, para cada tipo de cruzamento, mostraram serem as diferenças significativas para as frequências obtidas em descendentes dos cruzamentos A ($\chi^2=22,7$; $p<0,01$) e dos cruzamentos A* ($\chi^2=28,5$; $p<0,01$). Os percentuais de fertilidade dos intracruzamentos não foram significativamente diferentes ($\chi^2=4,0$; $p>0,05$). Entre os controles, o χ^2 de contingência não apresentou diferença significativa para os percentuais de fertilidade.

A produtividade média das fêmeas F1, descendentes dos cruzamentos realizados a 25°C, considerada como o número de machos e fêmeas produzidos em quatro dias de oviposição e sete dias de emergência, nos descendentes de cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos, são apresentadas nas Tabelas 13 a 16, respectivamente. Na geração F2 do cruzamento A, a linhagem procedente de Maringá (**PR**) apresentou a menor produtividade média individual de machos e fêmeas (2,88 e 3,12, respectivamente); as demais linhagens apresentaram produtividades médias semelhantes entre si, incluindo a do cruzamento-controle (**CS** versus **23,5/CyL**). Os testes *t* de Student, realizados entre as médias dos números de machos e de fêmeas, não mostraram diferenças significativas. As análises de variância, para a homogeneidade das médias do número de descendentes, das sete linhagens e do cruzamento-controle, mostraram



diferenças não-significativas para os machos e para as fêmeas. A razão de sexo variou de 94% a 138,7%. A análise de variância mostrou serem não significativas as diferenças da razão de sexo (Tabela 13).

A menor produtividade média de machos e fêmeas descendentes dos cruzamentos A* ocorreu com a linhagem **PI** (2,45 machos e 2,33 fêmeas); enquanto que a maior foi observada na linhagem **SP** (11,48 machos e 14,08 fêmeas). Os testes *t* de Student mostraram diferenças não significativas entre as médias de número de machos e de fêmeas produzidos em cada cruzamento. As análises de variância mostraram diferenças significativas, no nível de significância de 1%, para a média dos números de machos ($F_{7;478}=13,34$) e de fêmeas ($F_{7;478}=17,52$) produzidos pelas linhagens estudadas e controles. A razão de sexo variou de 102,9% (**SC**) a 135,6% (**SP**), não sendo significativas as diferenças observadas entre as linhagens (Tabela 14).

Nos intracruzamentos (Tabela 15), destacou-se a produtividade média da linhagem **RS**, com um valor médio de cerca de 12 machos e 12 fêmeas. Os testes *t* de Student não mostraram diferenças significativas entre as médias, em todas as linhagens. As análises de variância realizadas para avaliar a heterogeneidade das médias das sete linhagens experimentais e dos controles, positivo e negativo, apresentaram diferenças no nível de significância de 1%, para machos ($F_{8;534}=10,58$) e para fêmeas ($F_{8;534}=9,92$). A razão de sexo variou de 102,6% (**PI**) a 119,8% (**MG**), sendo as médias das sete linhagens homogêneas.

Na Tabela 16 são apresentados os números médios de imagos descendentes dos três tipos de cruzamentos, das sete linhagens. A análise de variância mostrou heterogeneidade das médias dos três tipos de cruzamentos, no nível de significância de 1%, para os descendentes das linhagens **RS**, **SC**, **PR**, **SP**, **MG**, **PI** e controles dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos. Apenas a linhagem **MA** apresentou diferença não-significativa para o número médio de imagos produzidos na geração F2 dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos ($F_{6;405}=2,06$). Para cada tipo de cruzamento, as diferenças também foram significativas, no nível de significância de 1%, para as médias de imagos dos descendentes das sete linhagens nos cruzamentos A* ($F_{7;478}=16,84$) e intra-linhagem ($F_{8;534}=11,52$), mas não para os cruzamentos A.



As análises de agrupamentos para as variáveis relativas à produtividade realizada a 25°C (Figura 24), indicaram maior similaridade entre os pares de linhagens **MG** e **PI** (94,9%) e **SC** e **SP** (90,9%). A linhagem **RS** apresentou 89,2% de similaridade em relação às linhagens **MG** e **PI** e a linhagem **MA** 81,7% em relação a **SC** e **SP**, enquanto que, entre esses dois grupos, ocorreram 78,7% de semelhanças. A linhagem **PR** apresentou apenas 54,5% de similaridade em relação às demais. Para o cruzamento A* (Figura 25), **RS** e **SC** foram as linhagens mais semelhantes em relação ao número de descendentes e a razão de sexo (93,7%), seguidas por **MA** (92,8%) e **MG** (92,1%). As linhagens **PR** e **PI** apresentaram 77,2% de semelhanças entre si, enquanto que a linhagem **SP** apresentou 72,6% de semelhanças em relação ao primeiro grupo e, entre o primeiro e o segundo grupo, 67,4% de similaridade.

Os pares de linhagens **SC** e **SP**, e **MG** e **MA**, foram os que apresentaram as maiores similaridades quanto à produtividade e à razão de sexo nos intracruzamentos (99,2%), sendo que a linhagem **RS** apresentou apenas 28,3% de similaridade em relação as demais (Figura 26).



Tabela 12. Número de tubos com larvas (L) e frequência percentual de fertilidade (%) em fêmeas descendentes dos cruzamentos A, A*, dos intracruzamentos (I) e e dos cruzamentos-controle realizados a 25°C (N: número total de tubos; X^2 de contingência; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Linhagem	A			A*			I		
	N	L	%	N	L	%	N	L	%
RS	60	35	58,3	60	38	63,3	59	51	86,4
SC	60	44	73,3	60	51	85,0	60	49	81,7
PR	60	37	61,7	59	45	76,3	60	51	85,0
SP	58	48	82,7	60	49	81,7	60	53	88,3
MG	58	48	82,7	60	47	78,3	59	53	89,8
PI	60	38	63,3	59	31	52,5	59	48	81,3
MA	56	48	85,7	60	34	56,7	59	47	79,6
X^2		22,70**			28,50**			4,00	
CS vs 23,5	60	43	71,7	-	-	-	-	-	-
23,5 vs 23,5	-	-	-	60	52	86,7	-	-	-
CS vs CS	-	-	-	-	-	-	59	48	81,3
X^2					3,50				

Tabela 13. Produtividade média individual de fêmeas e de machos produzidos na geração F2 e razão de sexo dos cruzamentos A, das sete linhagens e dos cruzamentos-controle realizados a 25°C, em quatro dias de oviposição (t para a diferenças entre médias; F para a homogeneidade das médias; **:p<0,01; *: p<0,05).

Linhagem	Machos			Fêmeas			Razão de Sexo		
	x		Sx	x		Sx	t	x	Sx
RS	4,06	±	0,56	4,05	±	0,88	0,02	107,8	± 10,20
SC	5,22	±	0,60	4,67	±	0,57	0,67	113,3	± 15,40
PR	2,88	±	0,40	3,12	±	0,44	0,39	138,7	± 25,10
SP	4,97	±	0,51	5,02	±	0,52	0,07	109,6	± 9,57
MG	4,64	±	0,49	4,16	±	0,53	0,66	94,6	± 7,20
PI	4,60	±	0,55	4,12	±	0,49	0,65	101,3	± 9,37
MA	5,75	±	0,52	5,70	±	0,59	0,07	113,2	± 8,74
CS vs 23,5	5,11	±	0,53	5,83	±	0,57	0,57	138,4	± 13,40
F	2,27			2,85				1,48	

Tabela 14. Produtividade média individual de fêmeas e de machos produzidos na geração F2 dos cruzamentos A*, das sete linhagens e dos cruzamentos-controle realizados a 25°C, em quatro dias de oviposição (t para a diferenças entre médias; F para a homogeneidade das médias, **:p<0,01; *: p<0,05).

Linhagem	Machos		Fêmeas		t	Razão de Sexo	
	x	Sx	x	Sx		x	Sx
RS	8,37 ± 1,03		9,33 ± 1,21		0,61	118,9 ± 10,20	
SC	9,63 ± 0,71		8,92 ± 0,61		0,76	102,9 ± 6,50	
PR	5,05 ± 0,55		4,63 ± 0,51		0,56	120,9 ± 19,10	
SP	11,48 ± 0,92		14,08 ± 1,08		1,83	135,6 ± 7,40	
MG	9,70 ± 0,85		10,30 ± 0,99		0,46	106,9 ± 5,90	
PI	2,45 ± 0,52		2,33 ± 0,47		0,17	118,8 ± 18,10	
MA	8,10 ± 1,12		8,20 ± 1,18		0,06	117,0 ± 12,90	
23,3vs 23,5	5,47 ± 0,56		5,42 ± 0,55		0,06	128,1 ± 14,70	
F	13,34**		17,52**			0,87	

Tabela 15. Produtividade média individual de fêmeas e de machos produzidos na geração F2 dos intracruzamentos e dos cruzamentos-controle realizados a 25°C, em quatro dias de oviposição (t para a diferença entre médias; F para a homogeneidade das médias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Linhagem	Machos		Fêmeas		t	Razão de Sexo	
	x	Sx	x	Sx		x	Sx
RS	11,98	± 0,83	12,14	± 0,81	0,13	106,4	± 4,70
SC	7,45	± 0,68	7,45	± 0,71	0,0	110,4	± 6,70
PR	5,60	± 0,44	5,83	± 0,49	0,35	119,0	± 10,20
SP	7,48	± 0,50	7,37	± 0,51	0,16	113,3	± 8,50
MG	6,44	± 0,54	7,14	± 0,57	0,88	119,8	± 7,20
PI	6,78	± 0,70	6,51	± 0,67	0,28	102,6	± 6,30
MA	6,46	± 0,62	7,05	± 0,75	0,60	116,8	± 7,80
23,5vs23,5	5,47	± 0,56	5,42	± 0,55	0,06	128,1	± 14,70
CS vs CS	9,85	± 0,86	9,83	± 0,81	0,01	109,6	± 7,30
F	10,58**		9,92**			0,65	

Tabela 16. Produtividade média individual de imagos, na geração F2 dos cruzamentos A, A*, intracruzamentos (I) das sete linhagens e dos cruzamentos-controle realizados a 25°C (F para a homogeneidade das médias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Linhagem	A		A*		I		F
	x	Sx	x	Sx	x	Sx	
RS	8,12	± 1,11	17,70	± 2,16	24,12	± 1,60	22,96**
SC	9,88	± 1,11	18,55	± 1,21	14,90	± 1,32	12,79**
PR	6,01	± 0,80	9,67	± 0,96	11,43	± 0,83	10,22**
SP	9,98	± 0,99	25,57	± 1,89	14,85	± 0,91	34,95**
MG	8,79	± 0,98	20,00	± 1,76	13,58	± 1,06	17,99**
PI	8,80	± 0,99	4,78	± 0,95	13,29	± 1,33	14,86**
MA	11,45	± 1,04	16,13	± 2,23	13,51	± 1,32	2,06
Controles	10,95	± 1,02	10,92	± 1,04	19,85	± 1,56	17,52**
F	2,92		16,84**		11,52**		

Controles (A: CS versus 23,5; A*: 23,5 versus 23,5 e I: CS versus CS e 23,5 versus 23,5).

Similaridade

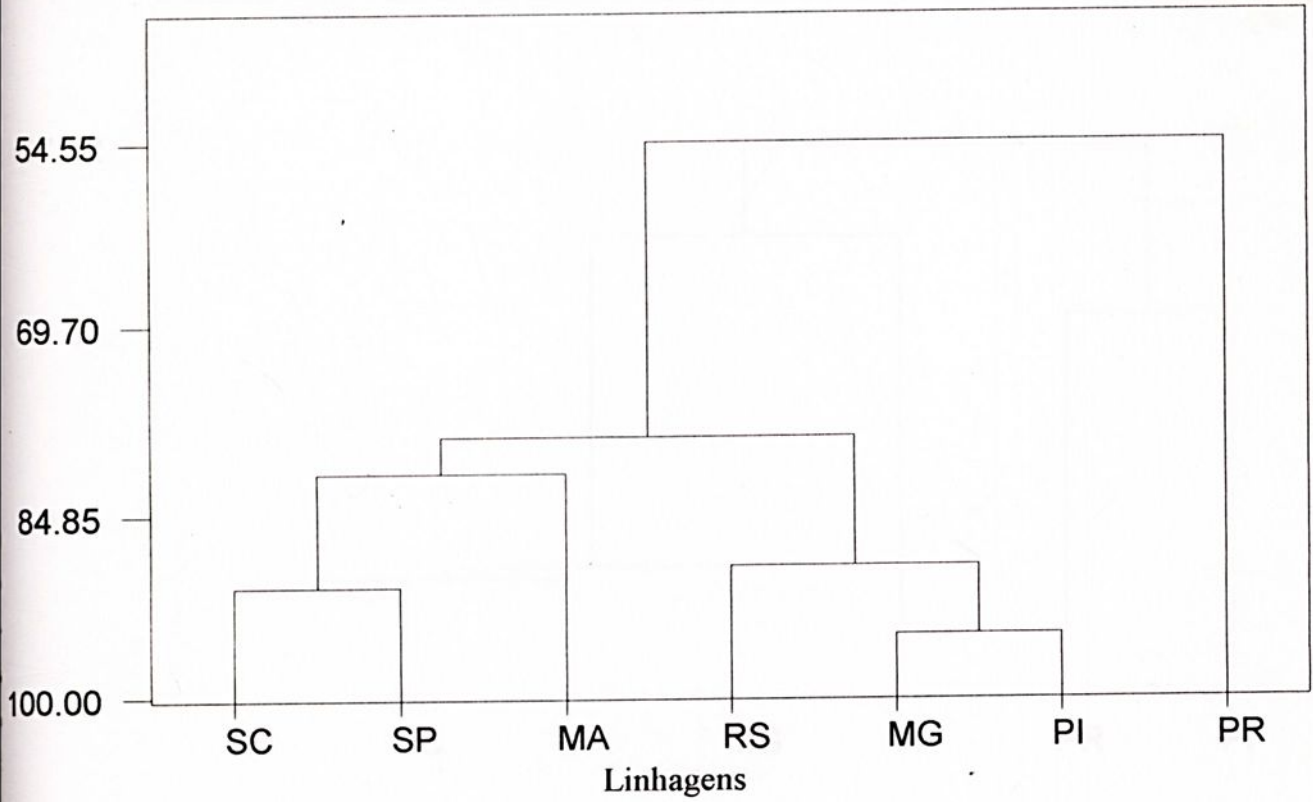


Figura 24. Similaridade das linhagens experimentais quanto à produtividade e à razão de sexo na geração F_2 dos cruzamentos A realizados a 25°C .

Similaridade

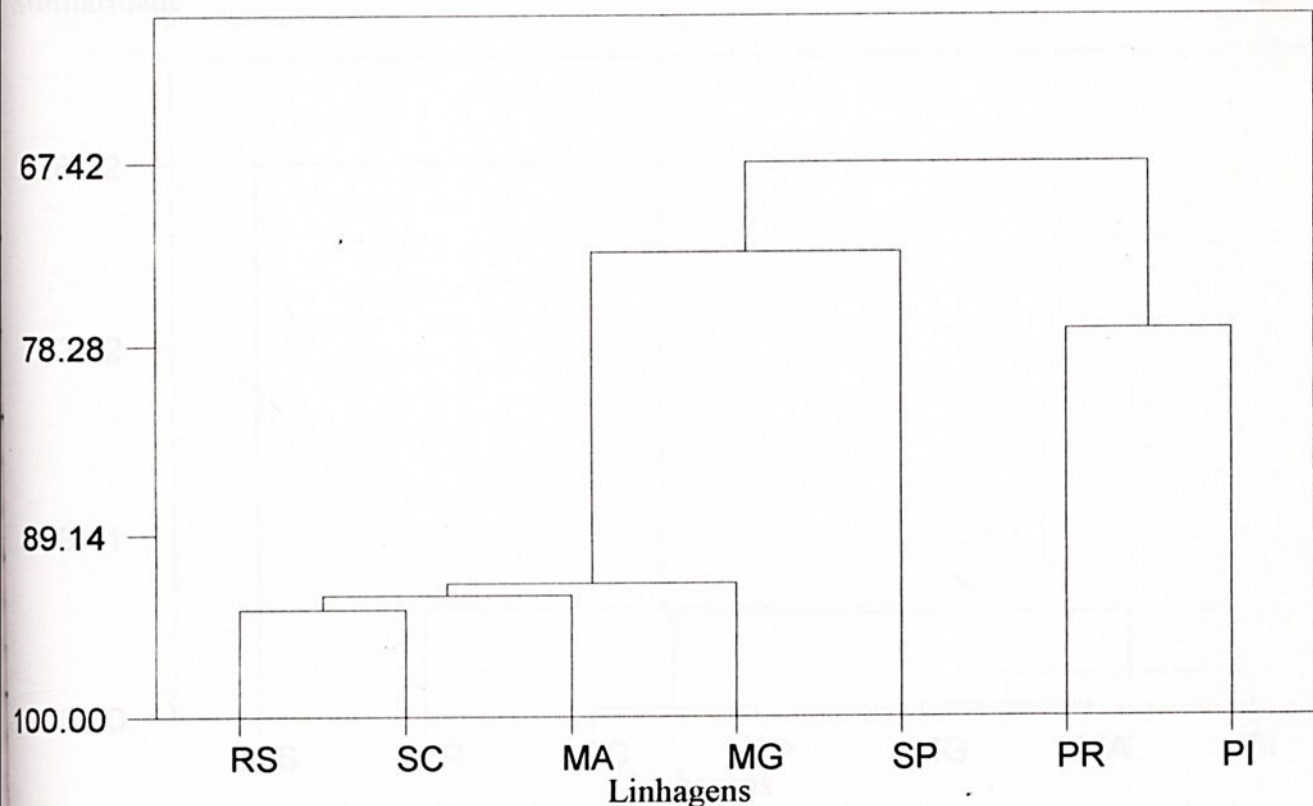


Figura 25. Similaridade das linhagens experimentais quanto à produtividade e à razão de sexo na geração F_2 dos cruzamentos A^* realizados a 25°C .

2876

Considerando todas as variáveis estudadas, as linhagens RS e PR apresentaram a maior similaridade (28,32%) e a menor (100,00%) respectivamente. As linhagens SC, SP, MG, MA e PI apresentaram similaridades de 52,22%, 76,11%, 76,11%, 76,11% e 76,11% respectivamente. A similaridade entre as linhagens RS e PR foi de 28,32%.

Similaridade

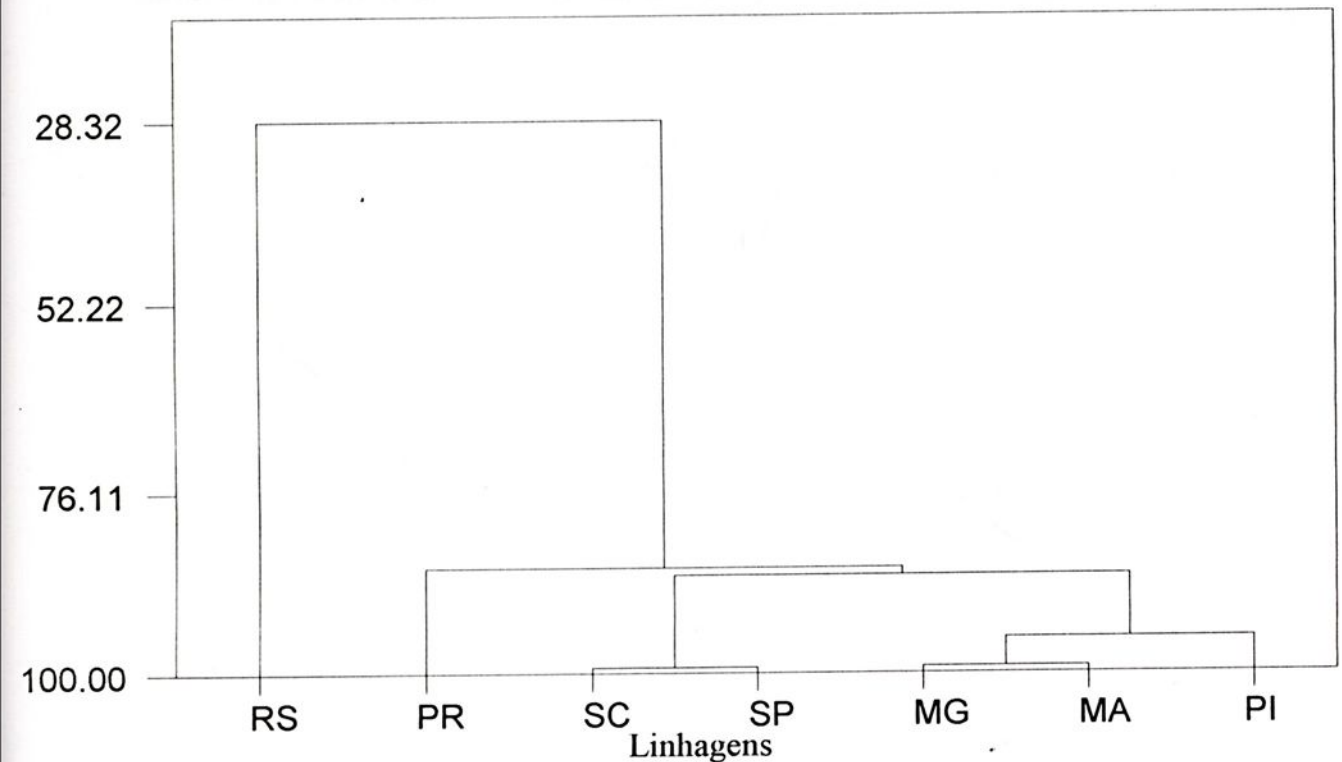


Figura 26. Similaridade das linhagens experimentais quanto à produtividade e à razão de sexo na geração F_2 dos intracruzamentos realizados a 25°C.

3. Similaridade das linhagens para o conjunto de variáveis estudadas a 25°C

Considerando todas as variáveis estudadas, as freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares e os números de descendentes e razão de sexo nos cruzamentos A, A* e nos intracruzamentos realizados a 25°C (Figura 27), as linhagens com os maiores graus de similaridade foram **SC** e **MG** (86,9%) e **MA** (85,6%), a elas assemelha-se a linhagem **SP** com 71,1% de similaridade. As linhagens **PR** e **PI** apresentaram 72,6% de semelhança entre si e 59,6% com o grupo anterior, enquanto que **RS** apresentou 56,5% de similaridade em relação às demais linhagens.

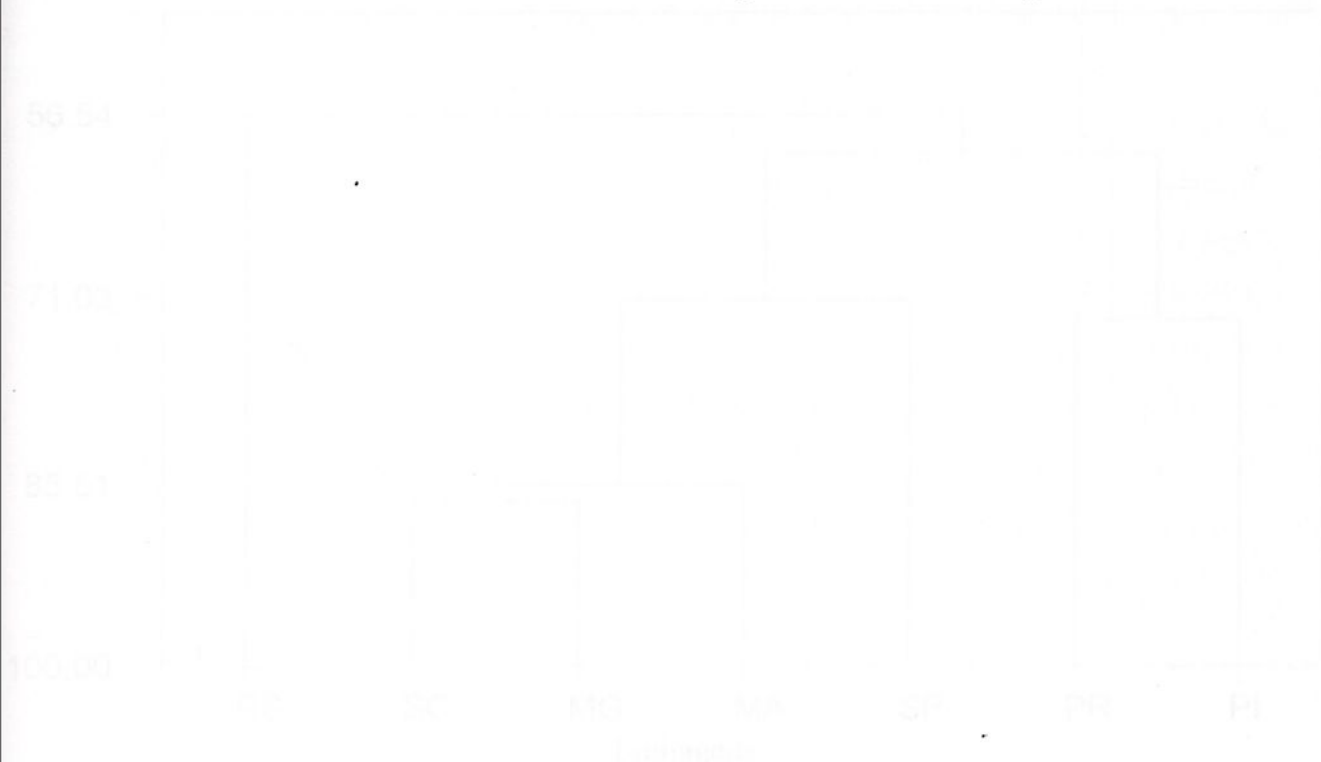


Figura 27. Similaridade das linhagens experimentais quanto às freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas e ovários rudimentares e aos números de descendentes e razão de sexo nos cruzamentos A, A* e nos intracruzamentos realizados a 25°C.

Similaridade

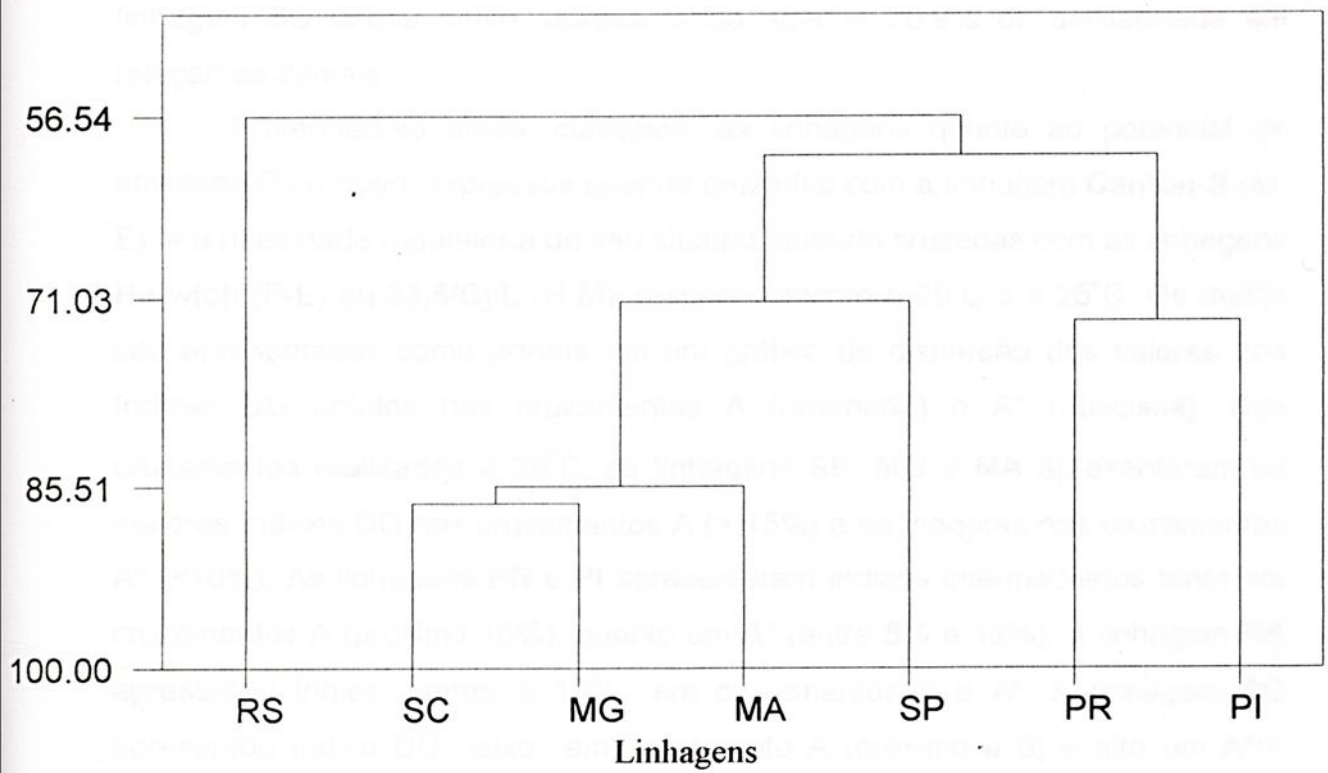


Figura 27. Similaridade das linhagens experimentais quanto às freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas, ovários rudimentares, produtividade e razão de sexo, na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 25°C.



C. Grau de similaridade das linhagens experimentais em cruzamentos realizados a 29°C e a 25°C e classificação quanto aos potenciais de atividade *P* e *hobo* e habilidade regulatória do citotipo.

Pretendeu-se compor todas as características expressas pelas linhagens experimentais e compará-las quanto ao grau de similaridade. Para isto, foram consideradas as freqüências de indivíduos com gônadas disgênicas e rudimentares e o número de descendentes e razão de sexo dos três cruzamentos (A, A* e Intracruzamentos), realizados a 29°C e 25°C, em uma análise de similaridade (Figura 28). As linhagens **SP** e **MG** apresentaram 71,4% de semelhança, seguidas por **MA** (57,7%), **PR** (51,4%), **RS** e **PI** (50,5%). A linhagem **SC** diferiu muito, apresentando apenas 20,9% de similaridade em relação às demais.

Pretendeu-se ainda, classificar as linhagens quanto ao potencial de atividade *P* ou *hobo*, expressos quando cruzadas com a linhagem **Canton-S** (M-E), e a habilidade regulatória de seu citotipo, quando cruzadas com as linhagens **Harwich** (P-E) ou **23,5/CyL** (H-M), respectivamente a 29°C e a 25°C. Os dados são apresentados como pontos em um gráfico de dispersão dos valores dos índices DG obtidos nos cruzamentos A (ordenada) e A* (abscissa). Nos cruzamentos realizados a 29°C, as linhagens **SP**, **MG** e **MA** apresentaram os maiores índices DG nos cruzamentos A (> 15%) e os menores nos cruzamentos A* (<10%). As linhagens **PR** e **PI** apresentaram índices intermediários tanto em cruzamentos A (próximo 10%), quanto em A* (entre 5% e 12%), a linhagem **RS** apresentou índice inferior a 10% em cruzamentos A e A*. A linhagem **SC** apresentou índice DG baixo em cruzamento A (próximo a 0) e alto em A*(> 10%). Para os cruzamentos realizados a 25°C, as linhagens **SC** e **MA** apresentaram índices DG superiores a 10% em cruzamentos A e inferiores a 5% em A*; **MG** e **SP** apresentaram índices intermediários em cruzamentos A e baixos em A* e as linhagens **RS**, **PR** e **PI** apresentaram índices baixos tanto em cruzamentos A quanto em A* (Figura 29).



Similaridade

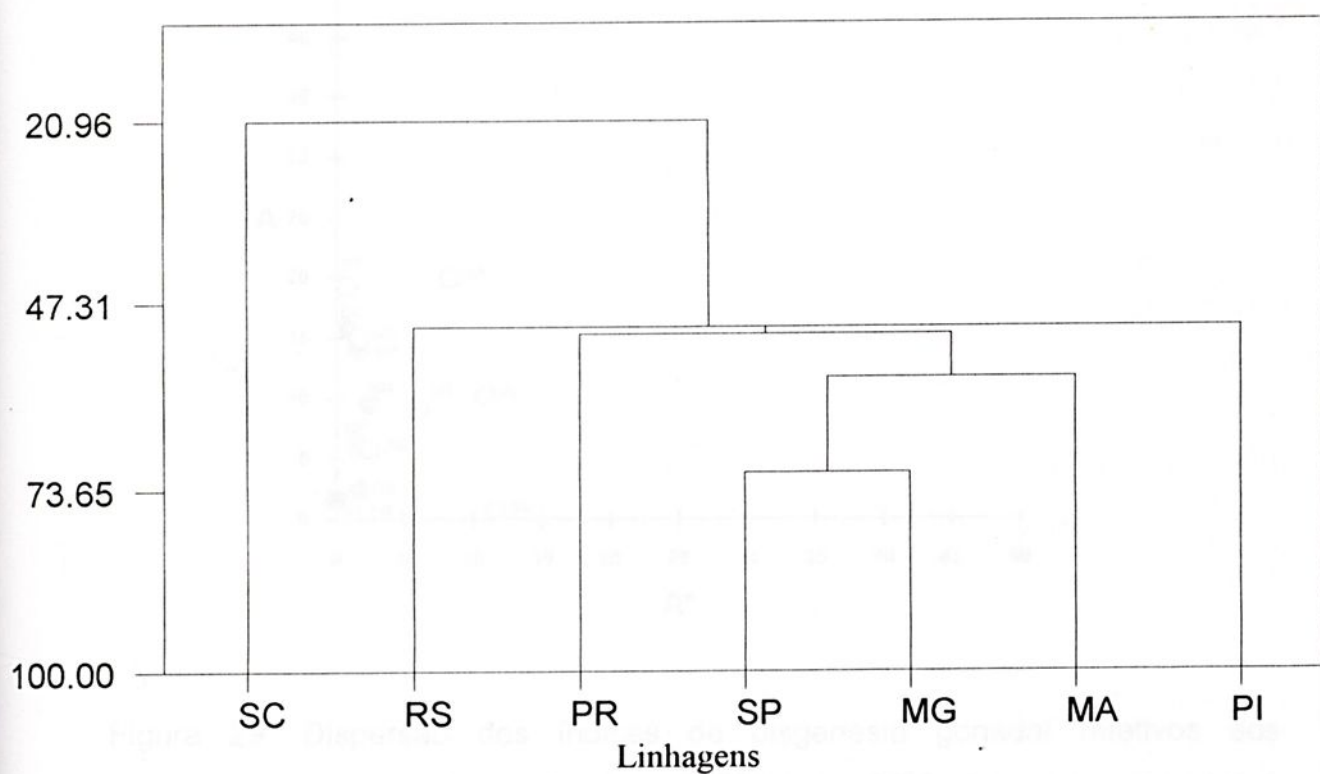


Figura 28. Similaridade das linhagens experimentais quanto às freqüências percentuais de indivíduos com gônadas disgênicas, ovários rudimentares, produtividade e razão de sexo, na descendência dos cruzamentos A, A* e dos intracruzamentos realizados a 29°C e a 25°C.

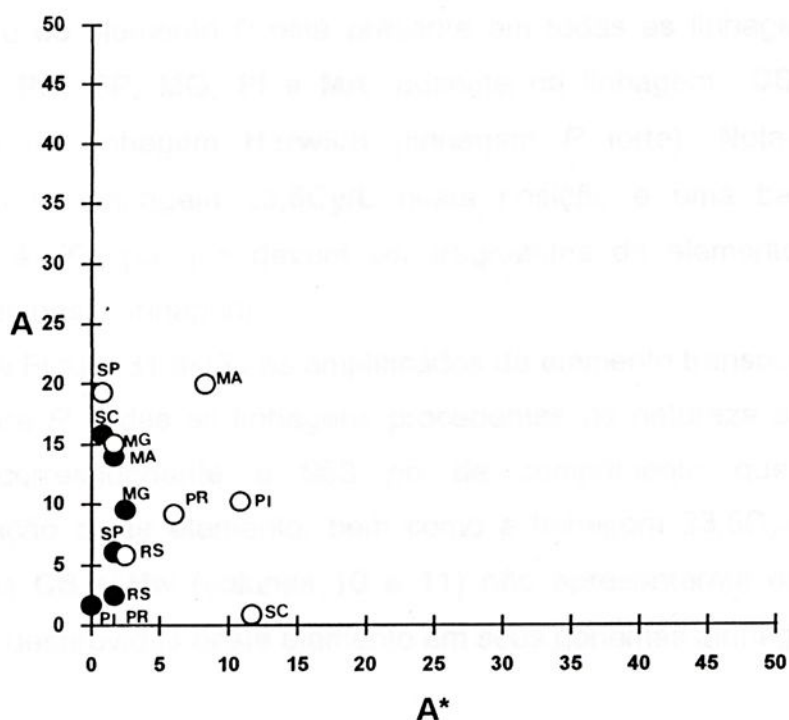


Figura 29. Dispersão dos índices de disgenesia gonadal relativos aos cruzamentos realizados a 29°C(o) e a 25°C (●) nos cruzamentos A (ordenada) e A* (abscissa) das linhagens RS, SC, PR, SP, MG, PI e MA.

D. Análise molecular

Para a avaliação da ocorrência dos elementos transponíveis *P* e *hobo* nas linhagens procedentes da natureza e nas linhagens-referência, o DNA de indivíduos de cada população, foi amplificado com oligonucleotídeos *primers* específicos para seqüências *P* e *hobo*. A Figura 30 é a fotografia de um gel de agarose, corado com brometo de etídeo, com amplificado do elemento transponível *P*. As bandas principais encontram-se na posição 764 pb, intermediária às bandas de 1018 e 506 do DNA ladder (primeira coluna). Este fragmento do elemento *P* está presente em todas as linhagens experimentais **RS, SC, PR, SP, MG, PI e MA**, ausente na linhagem **CS** (linhagem M) e presente na linhagem **Harwich** (linhagem *P* forte). Nota-se também sua presença na linhagem **23,5Cy/L** nesta posição e uma banda em posição superior à 764 pb que devem ser fragmentos de elementos *P* incompletos existentes nesta linhagem.

Na Figura 31 estão os amplificados do elemento transponível *hobo*. Assim como para *P*, todas as linhagens procedentes da natureza apresentaram uma banda correspondente a 963 pb de comprimento que corresponde a amplificação deste elemento, bem como a linhagem 23,5CyL (coluna 12). As linhagens **CS** e **Hw** (colunas 10 e 11) não apresentaram esta banda, sendo portanto desprovidas deste elemento em seus genomas (linhagens E).

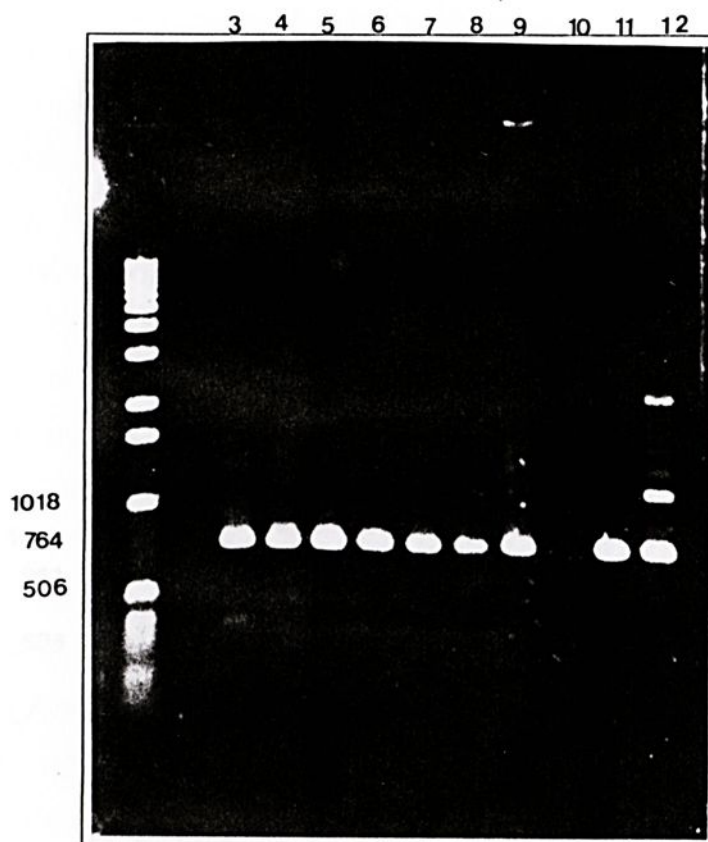


Figura 30. Amplificado de 764 pb da sequência *P*, através dos oligonucleotídeos primers # 829 e # 830, das sete linhagens experimentais (**RS**: coluna 3, **SC**: coluna 4, **PR**: coluna 5, **SP**: coluna 6, **MG**: coluna 7, **PI**: coluna 8, **MA**: coluna 9) e das linhagens-referência (**CS**: coluna 10, **Hw**: coluna 11 e **23,5/CyL**: coluna 12).

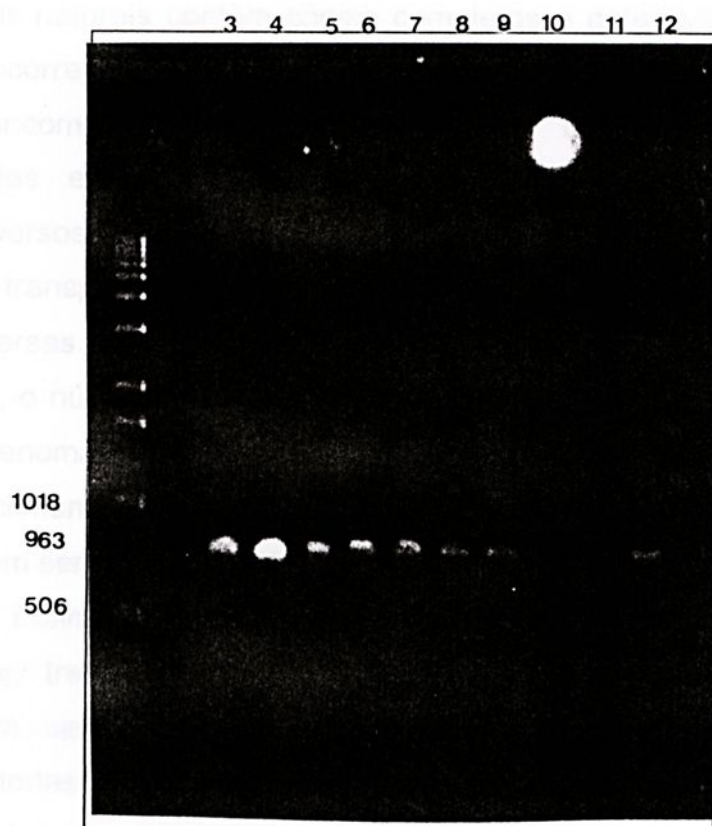


Figura 31. Amplificado de 963 pb da sequência *hobo*, através dos oligonucleotídeos primers # 651 e # 1597, das sete linhagens experimentais (**RS**: coluna 3, **SC**: coluna 4, **PR**: coluna 5, **SP**: coluna 6, **MG**: coluna 7, **PI**: coluna 8, **MA**: coluna 9) e das linhagens-referência (**CS**: coluna 10, **Hw**: coluna 11 e **23,5/CyL**: coluna 12).

IV. DISCUSSÃO

Elementos genéticos móveis são componentes estruturais do genoma de *Drosophila* que parecem ser responsáveis pela maioria das mutações espontâneas. Diversos TEs são encontrados no genoma de *Drosophila melanogaster*; Pimpinelli *et al.* (1995) relacionaram 11 diferentes tipos nesta espécie.

Linhagens naturais contêm cópias completas e defectivas de elementos transponíveis, ocorrendo os defectivos em quantidade comparativamente maior. Estas cópias incompletas parecem desempenhar um papel importante na regulação destes elementos, servindo como repressores, embora, como sugerido por diversos autores, outros fatores, além do próprio elemento, possam influenciar sua transposição. Cerca de 60 cópias do elemento *P* ocorrem no genoma de diversas linhagens de *D. melanogaster*, sendo dois terços destas incompletas. Já, o número de cópias completas do elemento *hobo* é baixo, de duas a 10 por genoma. O número de cópias incompletas, entretanto, pode variar de 35 a 70 (Blackman & Gelbart, 1989).

TEs podem ser detectados por métodos moleculares, entre eles a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); por este método, o DNA das linhagens utilizadas neste trabalho foi amplificado com oligonucleotídeos *primers* específicos para seqüências *P* e *hobo*, confirmando a presença destes elementos em todas as linhagens experimentais estudadas (Figuras 30 e 31). Também das linhagens-referência, o DNA foi amplificado. Como o esperado, confirmou-se a ausência de seqüências dos dois tipos de elementos na linhagem **Canton-S**, que é M-E. Na linhagem **Harwich**, que é P forte-E, verificou-se apenas a presença de seqüências *P*. Esta linhagem, segundo Boussy *et al.* (1988), aparentemente contém cópias incompletas de elementos *hobo*; se elas existem no genoma da linhagem utilizada neste trabalho devem conter seqüências diferentes daquelas amplificadas pelos *primers* #829 e #830. Também como o esperado, a linhagem **23,5/CyL** que é H forte-M, apresentou seqüências *hobo* e *P*, entretanto, como referido em Yannopoulos *et al.* (1987), estes elementos são defectivos e o seu citotipo P foi expurgado.

Em *D. melanogaster*, quando são realizados cruzamentos a 29°C, ocorre mobilização dos elementos *P* presentes no genoma de algumas linhagens.



Quando machos desta espécie, portadores destes elementos, são cruzados com fêmeas que não os possuem, a síndrome disgenesia híbrida ocorre, produzindo descendentes com uma ou ambas as gônadas atrofiadas. Neste caso a descendência é estéril. Síndrome semelhante ocorre quando machos que possuem cópias do elemento *hobo* no genoma são cruzados, à temperatura superior a 23°C, com fêmeas desprovidas destes elementos.

Embora com fenótipos semelhantes, os sistemas de disgenesia híbrida *P-M* e *hobo* são independentes (Stamatis *et al.*, 1989); a transposase *P* não promove o movimento de outras famílias de elementos transponíveis, incluindo a família *hobo* (Woodruff *et al.*, 1987; Eggleston *et al.*, 1988).

Neste trabalho, foram realizados cruzamentos-diagnóstico do tipo a 29°C, entre fêmeas da linhagem **Canton-S** e os machos das linhagens coletadas na natureza, com o propósito de avaliar o grau de atividade fator *P* destas linhagens, através da frequência de disgenesia gonadal observada nos descendentes. Para a avaliação do grau de repressão ao elemento *P* que é introduzido nas linhagens, as fêmeas da natureza foram cruzadas com machos da linhagem **Harwich**, nos cruzamentos-diagnóstico do tipo *A**.

Os maiores índices de disgenesia ovariana (Tabela 1), em cruzamentos *A*, foram os das fêmeas híbridas das linhagens **MA** (20,0%), **SP** (19,3%) e **MG** (14,2%) e, o menor, o da linhagem **SC** (0,9%). Este resultado indica que as linhagens do Maranhão, de Minas Gerais e de São Paulo têm maior potencial de atividade fator *P*, dentre as linhagens estudadas. Nos cruzamentos *A**, os maiores índices ocorreram nas linhagens **SC** (11,6%) e **PI** (10,2%) e os menores em **RS** (2,5%), **MG** (1,7%) e **SP** (0,9%). Como ovários disgênicos em cruzamentos *A** refletem o grau de inabilidade de repressão da linhagem à atividade de transposição dos elementos provenientes da linhagem **Harwich**, sugere-se que os citotipos das linhagens de Minas Gerais, de São Paulo e do Rio Grande do Sul possuem maior atividade repressora.

Engels & Preston (1979) sugeriram que a esterilidade gonadal resulta da morte celular durante estágios precoces do desenvolvimento da linhagem germinativa pelos efeitos deletérios da transposição; como os machos apresentam número significativamente maior de células germinativas durante o desenvolvimento que as fêmeas, têm probabilidade maior de que ao menos



algumas dessas células sobrevivam, para produzir gônadas adultas. Desta forma, os machos seriam menos sensíveis à esterilidade gonadal que as fêmeas. Os resultados deste trabalho estão de acordo com esta observação, os índices DG das fêmeas (Tabela 1, Figura 8) foram significativamente maiores que os dos machos (Tabela 1, Figura 9).

Além da disgenesia, muitas fêmeas apresentaram ovários com ovários de tamanho reduzido, sendo denominados de ovários rudimentares (Tabela 2, Figura 10). A linhagem que apresentou o maior índice foi **SP**, seguida de **PR**, **RS**, **MG**, **PI** e **MA**. Em híbridos dos cruzamentos **A***, e na descendência dos intracruzamentos, esta anormalidade não ocorreu. A ocorrência de ovários rudimentares apenas na descendência dos cruzamentos **A** deve ser dependente do citotipo **M** da linhagem **Canton-S** que contribui com os ovócitos. Neste caso, os efeitos da transposição devem ser mais marcantes, quando o potencial de atividade fator **P** é maior.

O fenótipo ovários rudimentares referido na literatura como decorrente da mobilização do elemento *hobo*, em descendentes de cruzamentos com a linhagem 23,5/ CyL (Blackman & Gelbart, 1989), pode estar sendo relatado pela primeira vez para o sistema **P-M**. Na revisão bibliográfica realizada, não foram encontradas referências sobre a ocorrência de ovários deste tipo em cruzamentos-diagnóstico do tipo **A**, no sistema **P-M**.

No sistema **P-M**, as linhagens podem ser classificadas em quatro fenótipos diferentes, dependendo dos índices de **DG** obtidos nos cruzamentos **A** e **A*** (Quadro II). Uma linhagem que apresenta alta proporção de descendentes fêmeas disgênicas no cruzamento **A** e baixa proporção no cruzamento **A***, é classificada como **P**. Linhagens com baixa proporção de descendentes fêmeas disgênicas nos dois tipos de cruzamentos são classificadas como **Q** e linhagens com baixa proporção de fêmeas disgênicas em cruzamentos do tipo **A** e alta em cruzamentos **A***, são fenotipicamente **M'**.

Um dos objetivos deste trabalho foi o de classificar as linhagens recém-coletadas quanto ao potencial de atividade fator **P** e a sua habilidade regulatória em relação aos elementos provenientes de outras linhagens e, desta forma, classificá-las em uma das quatro classes fenotípicas. O procedimento para esta



classificação, baseado nos índices DG obtidos em cruzamentos-diagnóstico, é apresentado no quadro abaixo:

Quadro II. Classes fenotípicas no sistema P-M, de acordo com índices percentuais de disgenesia obtidos em cruzamentos-diagnósticos A e A* (Kidwell, 1986).

Linhagens	Cruzamento A	Cruzamento A *
M (verdadeiras)	0	100
M' (pseudo M)	0 ?	0 - 100
Q (P fracas)	0 - 10	0 - 10
P (P moderadas)	11 - 80	0 - 10
P (fortes)	81 - 100	0 - 10

Linhagens procedentes da natureza podem variar em sua maneira de regular a atividade do elemento autônomo presente no genoma, propriedade esta conhecida como susceptibilidade a P. Indivíduos com citotipo P, isto é, com fatores P no genoma podem regular a transposição e a excisão de P. O elemento P sofre deficiências internas em altas frequências quando introduzido no citotipo M (O'Hare & Rubin, 1983), fazendo com que a população apresente poucos elementos autônomos no genoma, resultando em baixo potencial de atividade P. Anxolabèhére *et al.* (1988) explicaram que a mistura de elementos completos e incompletos leva à mudança de populações P fracas para Q. Durante este processo, novos elementos defectivos surgem, fazendo com que os elementos completos tornem-se mais raros ainda, formando as populações M'.

Populações com tendência à P (Q e P moderadas), apresentam baixa susceptibilidade à atividade P, isto é, forte habilidade regulatória nos cruzamento A*, uma vez que apresentam em seus genomas fatores P que reprimem a ação do elemento recebido por cruzamento, e alto potencial de atividade fator P nos cruzamentos A. No presente trabalho as linhagens procedentes de São Luís (MA), Serra do Cipó (MG) e São José do Rio Preto (SP) podem ser classificadas como P moderadas, pois apresentaram índices de



DG maiores que 10,0%, no cruzamento-diagnóstico A e menores que 10,0%, em A* (Quadro 4, Tabela 1, Figuras 8, 29).

As linhagens **PI**, **PR** e **RS** apresentaram índices DG menores ou próximos a 10,0% tanto nos cruzamentos A, como nos A*, sendo fenotipicamente classificadas como Q (Quadro 4, Tabela 1, Figuras 8 e 29). Populações Q têm baixa atividade e baixa susceptibilidade ao elemento *P*.

Populações M têm baixo potencial de atividade fator P e podem ter diferentes níveis de susceptibilidade à atividade P. M' apresenta cerca de 50 cópias de elementos *P* por genoma haplóide, mas a maior parte é defectiva. A linhagem **SC**, com índice DG em A menor que 10,0% e, em A*, maior que 10,0%, pode ser classificada como M' (Quadro 4, Tabela 1, Figuras 8 e 29). Os fenótipos extremos desta classificação estão representados pelos resultados dos cruzamentos-controle: cruzamentos entre fêmeas **Canton-S** (M) e machos **Harwich** (P) produziram o índice esperado, 100% de esterilidade gonadal (Tabela 3).

Boussy & Kidwell (1987), estudando populações australianas de *D. melanogaster*, observaram grandes diferenças fenotípicas entre as populações. Da latitude norte (16,9S) para a região de Coff's Harbour (30,3S), as populações eram tipicamente P (cruzamento A, DG: 34,7% e A*, DG: 2,7%). Populações da região de Bateman's Bay (35,7S) eram Q (cruzamento A, DG: 6,4% e A*, DG: 9,3%) e uma população de Victoria, em Genoa (37,5S) era M' (cruzamento A, DG: 48,2% e A*, DG: 3,5%). Em outro estudo, realizado com populações de *D. melanogaster* da China, Anxolabéhère *et al.* (1990) encontraram populações fenotipicamente M na China Oriental e populações P ou Q na China Ocidental.

Amostras de indivíduos procedentes das populações da América do Norte, América do Sul e da África apresentam fenótipos P e Q. Populações da França são predominantemente Q e no restante da África e Ásia são M. No Japão, foram descritas populações tipicamente P e Q, e algumas M (Boussy & Kidwell, 1987). Estes resultados estão de acordo com a hipótese de invasão das populações da Europa e da Ásia pelo elemento *P* por linhagens P, provenientes dos Estados Unidos da América, região em que porpõe terem se originado por transferência horizontal do elemento *P* de *D. willistoni* no sul do país, onde *D.*



melanogaster é simpátrica com esta espécie (Anxolabehère *et al.*, 1988). Esta proposição se baseia no gradiente fenotípico observado nas linhagens de *D. melanogaster* da Europa e Ásia.

Periquet *et al.* (1989) relataram que populações naturais coletadas na França e na Ásia Central, entre 1982 e 1987, eram P e Q e, do leste da Europa para a Ásia Central, eram predominantemente M'. Populações da Europa Ocidental, examinadas entre 1982 e 1983, apresentaram baixa susceptibilidade (DG: 0-5%), intermediária na Europa Central (DG: 30-60%) e alta susceptibilidade nas áreas do leste (DG: 80-100%). Anxolabèhère *et al.* (1988), estudando populações naturais de *D. melanogaster*, coletadas entre 1983 e 1986, na França, relataram que as populações ao norte eram P fracas, na área central eram Q e ao sul eram M'.

No presente trabalho, de maneira geral, as populações de regiões com clima mais ameno e estações climáticas mais definidas, como as procedentes de Porto Alegre (RS), com temperatura média anual de 20°C, e de Joinville (SC), com temperatura média anual de 27°C, apresentaram, nos cruzamentos-diagnóstico A, menor grau de esterilidade gonadal do que a população procedente de São Luís (MA), cuja temperatura média anual é de 36°C. Populações de regiões intermediárias, procedentes de Maringá (PR), São José do Rio Preto (SP), Serra do Cipó (MG) e Teresina (PI), com temperaturas médias anuais de 25°C, 32°C, 22°C e 35°C, respectivamente, apresentaram DGs intermediários para este tipo de cruzamento.

Boussy (1987) encontrou nas populações australianas de *D. melanogaster* acima descritas, uma barreira latitudinal nas características P-M, com fenótipos P freqüentes na região norte, Q na região de Bateman's Bay e M ao sul. O autor propôs várias hipóteses para explicar esse modelo de latitude clinal.

A primeira hipótese, refere-se ao gradiente latitudinal de temperatura, que se baseia no modelo de dinâmica populacional dos elementos transponíveis. Este modelo tem mostrado que a seleção contra indivíduos portadores de grande número de elementos por genoma pode regular a proporção de indivíduos portadores destes elementos (Uyenoyama, 1985) ou o número médio de elementos por genoma (Charlesworth & Charlesworth, 1983). Uma vez que a



disgenesia gonadal ocorre em temperaturas superiores a 25°C (Engels & Preston, 1979), altas temperaturas deveriam selecionar indivíduos com baixa atividade fator P. Contudo, o padrão clinal obtido por Boussy (1987), com populações P no norte tropical e M, em temperaturas frias do sul, está na direção contrária a esta explicação. A mesma direção clinal contrária é constatada nos resultados obtidos neste trabalho.

A segunda hipótese proposta pelo autor, baseia-se na concordância entre a clina P-M e clinas de frequências de alelos ADH, e outras isozimas, e de inversões cosmopolitas. Estas concordâncias sugerem que a história da introdução destas populações poderiam explicar os três tipos de clinas. Entretanto, outras observações sugerem que clinas diferentes não têm causa comum porque, em primeiro lugar, existe desequilíbrio de ligação entre certas alozimas e inversões (Mukay & Voelker, 1977) e, em segundo, porque inversões endêmicas não mostram padrão de latitude clinal na Austrália.

Dadas as dificuldades de se explicar o padrão clinal observado na distribuição dos fenótipos no sistema P-M, sugere-se que o modelo clinal possa ser explicado pela dinâmica genômica do elemento P, incluindo inserção, excisão, supressão da transposição e degeneração do elemento P autônomo, para formar um elemento não-autônomo.

Kaplan *et al.* (1985) propõem um modelo degenerativo, que descreve a evolução de uma única população finita, a partir da introdução de elementos P, onde os elementos completos e ativos aumentam rapidamente em frequência até seu número auto-regulado. Concomitantemente, inicia-se o processo degenerativo, convertendo os elementos completos em defectivos, atingindo um estado de quase-equilíbrio. Eventualmente, o processo degenerativo leva à perda dos elementos completos da população. Este modelo pode ser tomado como uma descrição razoável da dinâmica da invasão de populações por elementos P; segundo ele, ocorre a progressão do estado M para P, P para Q e Q para M', em populações que estão evoluindo quanto ao sistema P-M.

Como as clinas verificadas nas populações australianas, as aparentes relações entre temperatura e fenótipos P observados neste trabalho podem ser apenas o reflexo do estado evolutivo destas populações ou, ainda, como Engels (1983) e Kidwell (1983) sugeriram, as diferenças entre linhagens P e M devem



estar relacionadas com uma drástica mudança demográfica de *D. melanogaster* devido às atividades humanas no último século. A extensão geográfica, o número efetivo da população e a taxa de migração têm sido muito aumentados nos últimos anos, explicando assim a propagação do elemento *P* dentro e entre espécies.

Neste trabalho, propõe-se o uso de análises de similaridade, que utilizam o agrupamento de variáveis, como as freqüências de gônadas masculinas disgênicas e ovários rudimentares, associadas às freqüências de ovários disgênicos, para o estabelecimento do grau de semelhança entre as linhagens. Os dendogramas decorrentes de variáveis relativas à mobilização do elemento *P* no citotipo *M* do híbrido, agrupam as linhagens **RS, SC, PR, MG, PI e MA** e diferenciam destas a linhagem **SP** (Figura 11). Para os cruzamentos *A**, cujas freqüências de gônadas disgênicas refletem a capacidade de repressão da linhagem ao elemento *P*, formaram-se três *clusters*, um agrupando as linhagens **RS e SP**, outro agrupando **SC, PR, MG e MA** e um terceiro ramo diferenciando **PI** das demais linhagens (Figura 12).

Comparando-se os dendogramas, verificamos que a linhagem **SP**, classificada como *P*, e que diferiu das demais quanto aos componentes relacionados ao fator capacidade de mobilização *P* foi muito similar a **RS**, linhagem *Q*, quanto à habilidade regulatória. Ao contrário, a linhagem **PI**, fenotipicamente *Q*, que diferiu das demais quanto à sua habilidade regulatória, agrupou-se com **SP, MA e MG**, linhagens *P*, quanto ao potencial de atividade *P*.

As incongruências observadas nestes resultados podem ser explicadas pela proposição de Anxolabéhère *et al.* (1990), segundo a qual, diferenças quantitativas e qualitativas na distribuição de elementos *P* entre regiões geográficas podem ser observadas como o resultado da deriva genética, efeito do fundador, migração, seleção natural e o desenvolvimento de mecanismos que regulam a transposição do elemento. Uma vez que o sistema de disgenesia híbrida *P-M* é uma manifestação da recente introdução do elemento *P* em populações de *D. melanogaster*, é improvável que qualquer modelo visto na natureza seja estável.

Muitas das características dos organismos são adaptações a seus ambientes, consequência fundamental do processo evolutivo. Todo ambiente



exerce uma pressão seletiva contínua sobre os organismos, modelando a adaptabilidade das populações. A adaptação não é algo dado ao organismo de maneira definitiva; no processo da evolução a harmonia entre o organismo e seu ambiente é constantemente perdida e recuperada e a aquisição dessa harmonia requer um esforço contínuo por parte do organismo (Dobzhansky, 1942). Em consequência formas diferentes sobrevivem e reproduzem-se em ritmos diferentes por apresentarem traços morfológicos, fisiológicos e etológicos adequados aos diversos ambientes nos quais vivem (Carareto, 1990).

Em um determinado ambiente, uma espécie interage com fatores físicos e químicos, tais como o clima, a salinidade, a disponibilidade de alimentos e com outros membros da mesma espécie. Assim, as propriedades da população como a densidade, a proporção sexual ou a composição genética podem se impor de modo decisivo sobre as perspectivas de cada indivíduo sobreviver e de se reproduzir. Muitos traços disgênicos, como a esterilidade, estão associados com a redução da viabilidade e da fecundidade (Kidwell *et al.* 1977), levando à redução do valor adaptativo do seu portador. Assim, a baixa produtividade dos indivíduos recém-coletados cruzados com as linhagens-referência **Canton-S** e **Harwich**, verificada no presente trabalho, pode estar relacionada ao fenômeno de disgenesia gonadal.

Kidwell & Novy (1979) relataram a ocorrência de fertilidade normal quando cruzamentos A são realizados à temperatura inferiores a 23°C. A existência de níveis significantes de esterilidade em algumas linhagens sugere que, a partir desta temperatura, possa aumentar a sensibilidade, dependendo do elemento P em questão ou, ainda, a expressão da variabilidade de funções do hospedeiro possa modificar a fertilidade no nível de moscas individuais. Segundo Robertson *et al.* (1988), a temperatura é um fator importante pelo fato de aumentar a produção de transposase.

A linhagem experimental procedente de São Luís (MA), classificada como P, com o maior índice de disgenesia gonadal (Tabela 1) no cruzamento A, apresentou 76,7% de fertilidade e a maior produtividade neste tipo de cruzamento (Tabela 5). Portanto, todas as fêmeas não-disgênicas conseguiram produzir um número médio de descendentes maior que as das demais linhagens, sendo esta uma importante estratégia para a manutenção da



população. Em contraste, a linhagem **SC**, com o menor índice de disgenesia híbrida para o cruzamento A (Tabela 1), apresentou a menor fertilidade (Tabela 4) e foi uma das linhagens com menor produção de descendentes (Tabela 5); assim, os efeitos deletérios da mobilização do elemento *P* refletiram-se também na produtividade desta linhagem. No cruzamento A*, a linhagem procedente de Joinville (**SC**), com o maior índice de disgenesia gonadal, apresentou 75% de fertilidade (Tabela 4), o que portanto, refletiu em maior produtividade média (Tabela 6).

De acordo com Kidwell *et al.* (1977), a esterilidade em fêmeas pode ser o resultado da falta de oviposição ou de uma falha na eclosão dos ovos. Segundo estes autores, fêmeas em certos cruzamentos falham completamente em colocar ovos, em outros cruzamentos ocorre defeito na eclosão e, em um terceiro grupo pode ocorrer uma combinação destes dois fenômenos. Ovos colocados sob condições apropriadas de temperatura não mostram redução na habilidade de eclosão, já os colocados sob altas temperaturas apresentam certa redução. Os autores explicam que a fase de sensibilidade à temperatura ocorre em estágio precoce do desenvolvimento de F1 e, para prevenir a esterilidade, há a necessidade do repressor da transposição. Esta hipótese é consistente com os resultados de Engels & Preston (1979), que mostram que a sensibilidade à temperatura é máxima antes e durante o primeiro estágio larval, decresce fortemente durante o segundo e é imperceptível durante e após o terceiro.

Em cruzamentos do tipo A*, o gameta paterno *P* carrega não apenas elementos *P* capazes de induzir disgenesia gonadal, mas também elementos *P* com capacidade repressora. O repressor no embrião inibe os transcritos zigóticos, podendo assim regular a atividade do elemento, mantendo-o no estado reprimido durante a vida do organismo, prevenindo a esterilidade gonadal (Ronsseray *et al.* 1993).

Além da esterilidade gonadal, um traço característico da disgenesia híbrida P-M é a letalidade embriônica dos ovos F2 (Bregliano & Kidwell, 1983). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com esta proposição, uma vez que observou-se uma produtividade média menor nos cruzamentos A, (Tabela 5), que nos cruzamentos A* (Tabela 6) e intracruzamentos (Tabela 7).



O efeito da temperatura também foi estudado por Lints & Lints (1971). Em *D. melanogaster*, a postura máxima ocorre a 25°C; temperaturas mais elevadas induzem a uma redução gradativa de fecundidade. A produtividade média a 29°C foi menor do que aquela realizada a 25°C (Tabela 16).

As análises do grau de similaridade das linhagens, considerando a produtividade e a razão de sexo dos híbridos dos cruzamentos A (Figura 14), evidenciam uma variação clinal marcante, segundo a qual as populações procedentes das regiões sul do Brasil (**RS**, **SC** e **PR**) e da região sudeste (**SP** e **MG**) formam clusters mais próximos, apresentando produtividade média menor (Tabela 8) que as linhagens da região norte (**PI** e **MA**). Na Figura 15, os clusters relativos à produtividade dos híbridos dos cruzamentos A*, agrupam as linhagens procedentes de Joinville (**SC**) e de Teresina (**PI**), que apresentaram maior produtividade. Essa maior produtividade também pode ser observada nos intracruzamentos (Figura 16), nos quais, as linhagens **SC** e **PI** diferiram acentuadamente das demais.

Compondo todos os resultados de disgenesia híbrida a 29°C, ovários rudimentares na geração F1 e da produtividade e razão de sexo na geração F2, obtidos nos três tipos de cruzamentos (Figura 17), o gradiente clinal, agrupa as linhagens da região sul do país (**RS** e **PR**) em um *cluster*, as linhagens da região sudeste (**SP** e **MG**) em um segundo *cluster* e, aquelas procedentes da região norte (**MA** e **PI**) em um terceiro. A linhagem procedente de Joinville (**SC**) foi a mais diferenciada, diferença esta reflexo de sua maior produtividade em cruzamentos A* e intracruzamentos. Esta diferença pode ser devida à deriva genética, ou ao efeito do fundador, uma vez que esta população foi formada a partir de duas fêmeas apenas.

Foram realizados também cruzamentos-diagnóstico a 25°C, com o objetivo de caracterizar as linhagens quanto à presença de elementos *hobo*. Sabe-se que a mobilização deste elemento ocorre em temperaturas superiores a 23°C e que, em cruzamentos entre machos H e fêmeas E, ocorre hipermutabilidade na linhagem germinal da progênie. Entretanto, atividade *hobo* parece não ser restrita à progênie dos cruzamentos entre fêmeas E e machos H. Em contraste a *P*, que são praticamente imóveis em células somáticas, observações demonstram que *hobo* é somaticamente ativo.



Para estes cruzamentos, utilizou-se a linhagem-referência **23,5/CyL**, linhagem H, que contém elementos *hobo* completos e incompletos, com alto nível de atividade *hobo* e baixo nível de susceptibilidade a *hobo* e com citotipo M, para revelar a habilidade repressora do citotipo das linhagens experimentais. Quanto ao potencial de atividade, não podemos assegurar se os resultados obtidos são devidos à mobilização de elementos *hobo*, ou de elementos *P* que se mobilizam pouco, entretanto, têm alguma atividade transposicional a 25°C, ou outro elemento. Desta forma, dos resultados obtidos a 25°C, interessa-nos particularmente aqueles decorrentes dos cruzamentos A*.

Os índices DG observados nos cruzamentos A* (Tabela 9, Figuras 18 e 19) foram todos baixos, variando de 2,5%, na linhagem procedente da Serra do Cipó (**MG**) a zero, nas linhagens procedentes de Maringá (**PR**) e Teresina (**PI**). Portanto, as sete linhagens manifestaram alta habilidade regulatória.

Nos cruzamentos A, alguns resultados foram concordantes e outros discordantes dos obtidos para o sistema P-M. As linhagens **MA**, **MG** e **SP** também produziram os maiores índices DG, portanto, estes valores podem estar refletindo mobilização de elementos *P*, associados à mobilização dos elementos *hobo*. Entretanto, a linhagem de Joinville (**SC**) apresentou a 25°C o maior índice de disgenesia gonadal (15,8%) em cruzamento A e valor baixo em A*, resultado este bastante diferenciado daquele obtido a 29°C. Também a linhagem **PI** mostrou um resultado diferente do observado no sistema P-M; índices DG significativamente baixos nos cruzamentos A e A* (Tabela 9).

Galindo *et al.* (1995) explicaram que cruzamentos de linhagens H com linhagens E, resultam na propagação do elemento *hobo* no genoma das linhagens E provocando a aquisição da atividade *hobo* ou um certo nível de repressão nos testes de disgenesia gonadal. Em muitos casos a porcentagem de disgenesia no cruzamento A* é tão alta quanto no cruzamento A.

Classificação semelhante à utilizada para o sistema P-M não existe para o sistema H-E, entretanto, tentando classificar linhagens quanto ao grau de atividade *hobo*, Galindo *et al.* (1995) propuseram que algumas populações naturais são H°, isto é, apresentam potencial de repressão, mas não apresentam potencial de atividade *hobo* e são similares ao citotipo Q do sistema P-M. Outras são H+, isto é, apresentam potencial de repressão e potencial de atividade *hobo*.



Enquanto que linhagens H^- apresentam altos percentuais de disgenesia gonadal na progênie de cruzamentos A^* , linhagens H^+ , com muitos elementos *hobo* ativos, apresentam altos percentuais de disgenesia gonadal nos cruzamentos A (Pascual & Periquet, 1991). Todas as linhagens de *D. melanogaster* coletadas a partir de 1970 na Europa Central, na Ásia, na China, na América do Norte e do Sul foram classificadas como H (Periquet *et al.*, 1989a,b; Boussy & Daniels, 1991), a maioria delas contendo muitas classes de elementos deficientes internamente.

Se compararmos os resultados obtidos no presente trabalho com esta classificação e com a metodologia proposta e classificação para o sistema P-M e, ainda, assumirmos que os resultados obtidos nos cruzamentos A , a 25°C , são representativos do potencial de atividade *hobo*, podemos estabelecer que as linhagens **SC** e **MA** são H^+ , pois apresentam índices DG em A^* baixos, indicando alto grau de repressão e índices DG em A relativamente altos, indicando potencial de atividade *hobo* moderado. Comparadas à classificação para o sistema P-M, estas linhagens seriam correspondentes à linhagens P moderadas, classe à que foi destinada a linhagem **MA**, no sistema P-M. As linhagens **SP** e **MG**, que apresentaram no cruzamento A valores em torno de 6,03% e 9,48%, e baixos em A^* , parecem ser intermediárias entre as linhagens H^+ e H^0 . As linhagens **RS**, **PR** e **PI**, que apresentaram baixos índices de disgenesia gonadal nos cruzamentos A e A^* , podem ser classificadas como H^0 . Traçando um paralelo com a classificação P-M, seriam correspondentes à classe Q quanto ao grau de atividade-repressão. Desta forma, as linhagens que já haviam sido classificadas para o sistema P-M, passam agora, numa primeira aproximação, a serem classificadas quanto aos dois sistemas: P- H^+ (**MA**), P- H^0 (**MG** e **SP**), Q- H^0 (**PI**, **PR** e **RS**) e M'- H^+ (**SC**).

Desta maneira, algumas das linhagens aparentam ser correspondentes quanto aos potenciais de atividade e de repressão devidos aos dois elementos (**RS**, **MA**, **PI** e **PR**), enquanto outras mostram comportamentos distintos (**SC**). Entretanto, como os cruzamentos-controle mostraram o resultado esperado; o controle positivo da transposição de *hobo* (fêmeas **CS** versus machos **23,5/CyL**) apresentou alto grau de disgenesia gonadal (Tabela 11) podemos ter maior confiança em nossa classificação das linhagens quanto ao sistema H-E.



De acordo com Blackman & Gelbart (1989), relataram que ocorre atrofia do tecido gonadal nos descendentes de cruzamentos realizados com a linhagem **23,5/CyL**. No presente estudo este fenômeno foi observado (Tabela 10); muitas das fêmeas que não apresentaram ovários disgênicos tinham o ovário reduzido, tanto em descendentes dos cruzamentos A quanto dos cruzamentos A*, em contraste ao observado nos cruzamentos realizados a 29°C, com ovários rudimentares apenas em descendentes dos cruzamentos A. A redução foi maior nas linhagens **SC** (48,93% no cruzamento A e 13,50% no cruzamento A*) e **SP** (28,30% em A e 5,17% em A*).

Em um estudo dos sistemas P-M e H-E, com populações de *D. melanogaster* procedentes de Maldova, Vereshchagina *et al* (1994) relataram que populações de mata e de pomar não apresentaram atividade P, mas quanto ao sistema H-E, a população de mata apresentou atividade H. Neste trabalho, os autores também observaram a ocorrência de diferença significativa quanto às médias do valor adaptativo destas populações, sendo que a população de mata apresentou um valor adaptativo maior que a de pomar. Nesta última, também ocorreu diminuição na fecundidade e aumento de resistência à eterização. Segundo os autores, pode haver uma relação entre a seleção para a resistência ao stresse, tais como o decorrente da ação de pesticidas e o modelo de adaptação das populações de pomar. O efeito do stresse no genoma resulta da ação de vários agentes agressivos com consequência na evolução das populações e espécies. A introdução de um DNA estranho, como ocorre durante a transposição, em um organismo ou célula, pode corresponder a um stresse genômico.

Assim como para os cruzamentos realizados a 29°C, **MA** foi a linhagem que a 25°C apresentou maior percentual de fertilidade nos cruzamentos A (Tabela 12), sendo juntamente com **SC**, a linhagem que apresentou maior produtividade média na geração F2 (Tabela 13). Já no cruzamento A*, **SC** foi a linhagem com maior fertilidade, mas isto não resultou em maior produtividade de imagos (Tabela 14). Fêmeas da linhagem **PI**, no entanto, tiveram o menor índice de fertilidade, resultando em baixa produção de imagos no cruzamento A*. Nos intracruzamentos, nem **MG**, que foi a linhagem mais fértil, e nem **MA**, que foi a menos fértil, tiveram a maior e a menor produtividade média (Tabela 15).



As análises de similaridade mostraram que a 25°C a linhagem **PR** foi a que apresentou menor semelhança em relação às demais (Figura 24), sendo a menos produtiva em cruzamentos A. Assim como **SC**, que no cruzamento A, realizado a 29°C, apresentou baixo grau de esterilidade gonadal (Tabela 1), mas produziu poucos descendentes (Tabela 8), a linhagem **PR** também apresentou grau de disgenesia baixo (Tabela 9), bem como baixa produtividade (Tabela 16). No cruzamento A*, **SP** foi a linhagem mais diferenciada (Figura 25) quanto à produtividade, e as linhagens procedentes de Maringá (**PR**) e de Teresina (**PI**), apresentaram grandes semelhanças entre si, mostrando nesta temperatura de desenvolvimento a inexistência do um gradiente clinal observado a 29°C.

A combinação das quatro variáveis analisadas nos cruzamentos a 25°C mostrou que para o sistema H-E não ocorre organização de *clusters* por regiões como para o sistema P-M. Neste caso, a linhagem mais diferenciada foi **RS**, fato provavelmente devido a produtividade elevada nos intracruzamentos (Figura 27).

Os elementos transponíveis agem como agentes mutacionais, gerando a variabilidade genética, fonte básica para a atuação da seleção natural. Segundo, Doolittle & Sapienza (1980) e Orgel & Crick (1980), estes elementos genéticos podem ser não mais que parasitas moleculares ou DNA egoísta, multiplicando-se no genoma, mas não contribuindo para o valor adaptativo do hospedeiro. Para Hickey (1992), a seleção natural age sobre os TEs em dois níveis: no nível do organismo hospedeiro e no nível molecular, do próprio elemento transponível. O equilíbrio entre esses dois níveis pode variar significativamente, dependendo do comportamento reprodutivo do organismo hospedeiro.

Em síntese, a estrutura dos elementos *P* e *hobo*, completos e deficientes, presentes nas linhagens procedentes da natureza são de importância fundamental para a evolução futura dessas linhagens. Os processos de transposição e de formação de elementos defectivos, produzindo a diversidade genética formam a base para que a seleção natural possa agir. Os TEs podem ainda constituir um importante fator na indução e estabelecimento de isolamento reprodutivo pós-zigótico (Bingham *et al.*, 1982). Se uma população dividir-se em duas subpopulações devido a uma barreira geográfica, e durante esse período de isolamento ocorrerem divergências entre elas através da aquisição ou perda



de diferentes famílias de elementos móveis, e se estas duas populações tornarem-se simpátricas novamente, seus híbridos poderão ser disgênicos para muito sistemas, levando à esterilidade e ao reforço do isolamento.

Os resultados deste trabalho constituem a primeira contribuição para o entendimento do padrão de distribuição geográfica dos fenótipos P-M e H-E, em populações de *Drosophila melanogaster* de regiões brasileiras. Dos resultados obtidos, algumas generalizações puderam ser feitas: (1) As sete populações naturais amostradas em regiões extremas do Brasil apresentam elementos *P* e *hobo* em seus genomas, evidenciados por análise molecular e fenotípica; (2) estas linhagens diferem fenotipicamente tanto para o sistema P-M, quanto para o sistema H-E; 3) quanto ao sistema P-M, as linhagens podem ser classificadas em P moderadas (**MA**, **MG** e **SP**), Q (**PI**, **PR** e **RS**) e M'(**SC**); 4) no sistema P-M evidencia-se uma variação clinal dependente de temperatura marcante para a produtividade em F2, e menos definida para a disgenesia gonadal; (5) quanto ao sistema H-E, as linhagens podem ser classificadas em H⁺ (**MA** e **SC**) e H⁰ (**PI**, **MG**, **SP**, **PR** e **RS**); 6) para o sistema H-E, não ficou evidenciada a variação clinal observada no sistema P-M e 7) quanto aos dois sistemas, as linhagens podem ser classificadas como P-H⁺ (**MA**), P-H⁰ (**MG** e **SP**), Q-H⁰ (**PI**, **PR** e **RS**) e M'-H⁺ (**SC**).



V. RESUMO E CONCLUSÕES

O cruzamento entre linhagens diferentes de *Drosophila melanogaster* pode resultar em graus variáveis de esterilidade híbrida não-recíproca. A disgenesia gonadal P-M ocorre quando machos de uma linhagem P, que possuem elementos *P* em seus genomas, são cruzados com fêmeas de uma linhagem M, sem estes elementos. Do mesmo modo, no sistema H-E, ocorre disgenesia gonadal quando machos de uma linhagem H, contendo elementos *hobo*, são cruzados com fêmeas E, sem estes elementos.

Neste trabalho foram estudadas sete populações naturais de *Drosophila melanogaster*, coletadas entre setembro de 1995 a abril de 1996, procedentes de Porto Alegre (RS), Joinville (SC), Maringá (PR), São José do Rio Preto (SP), Serra do Cipó (MG), Teresina (PI) e São Luís (MA). Foram realizados testes fenotípicos com o propósito de detectar os elementos *P* e *hobo* nestas linhagens e o grau de disgenesia híbrida, decorrente da mobilização destes elementos. Estes testes são apropriados também para evidenciar a habilidade regulatória do citotipo das linhagens. Foram feitos cruzamentos-diagnóstico com as linhagens-referência **Harwich** (P-E), **23,5/CyL** (H-M) e **Canton-S** (M-E). A ocorrência de seqüências *P* e *hobo* foi avaliada por PCR, usando-se os oligonucleotídeos *primers* específicos. Os amplificados produziram fragmentos de comprimento esperado em todas as linhagens da natureza, evidenciando assim, a ocorrência molecular destes elementos nas linhagens recém-coletadas.

Os cruzamentos-diagnóstico denominados A, realizados entre fêmeas **Canton-S** e machos das linhagens experimentais, pretenderam medir o potencial que as linhagens têm para induzir traços disgênicos nos tecidos germinativos de seus descendentes com citotipo M, a 29°C (dependentes da mobilização de elementos *P*), e com citotipo E, a 25°C (possivelmente devido à mobilização de elementos *hobo*). Os cruzamentos A*, realizados entre as fêmeas das linhagens experimentais e machos com atividade *P* (**Harwich**) ou *hobo* (**23,5/CyL**) conhecidas, pretenderam avaliar a habilidade regulatória do citotipo das linhagens experimentais em relação aos elementos *P* ou *hobo* recebidos do genoma paterno. Foram ainda realizados intracruzamentos das linhagens recém-coletadas, e cruzamentos-controle positivos e negativos dos cruzamentos A e A*.



Da descendência destes cruzamentos, nas duas temperaturas, 60 fêmeas fecundadas e 30 machos foram dissecados, para investigar anormalidades em seus ovários e testículos. Destas fêmeas, foi contada a descendência. Foram calculados índices de disgenesia gonadal na geração F1, percentuais de fertilidade e a produtividade média na geração F2, em quatro dias de oviposição.

Para os cruzamentos realizados a 29°C, os resultados foram os seguintes: para os cruzamentos A, que mostram o potencial de transposição do elemento, os maiores valores foram observados nos híbridos da linhagem **MA** (DG=20,0%), seguidas por **SP** (DG=19,2%), **MG** (DG=14,1%), **PI** (DG=10,1%) e os menores nas linhagens **PR** (DG=9,1%), **RS** (DG=5,8%) e **SC** (DG=0,9%). Nos cruzamentos A*, indicativos da susceptibilidade da linhagem aos elementos P, os maiores índices foram os das linhagens **SC** (DG=11,6%) e **PI** (DG=10,8%) e os menores os das linhagens **RS** (DG=2,5%), **MG** (DG=1,7%) e **SP** (DG=0,9%). O cruzamento-controle, entre as linhagens **Canton-S** e **Harwich**, apresentou 100% de disgenesia. A porcentagem de testículos disgênicos foi significativamente menor que a obtida para os ovários. Para o cruzamento A, os maiores índices foram os das linhagem **MG** (DG=6,6%) e **RS** (DG=5,0%); para os cruzamentos A*, foi o da linhagem **SC** (DG=5,0%).

Foram realizadas análises de similaridade considerando-se as variáveis estudadas na geração F1 (relativas a disgenesia gonadal) e F2 (relativas a produtividade). Os dendogramas evidenciaram variação clinal norte-sul marcante para a produtividade em F2 e, embora menos definida, para a disgenesia gonadal, com os maiores índices DG e produtividade ao norte.

As linhagens foram classificadas quanto ao fenótipo apresentado no sistema P-M. Três populações foram classificadas como P moderadas (**MA**, **MG** e **SP**, três como Q (**PI**, **PR** e **RS**) e uma como M' (**SC**). As populações do sul do país, com temperatura média anual variando de 20°C a 27°C e estações climáticas definidas, apresentaram, no cruzamento A, menor grau de esterilidade gonadal do que a população procedente do norte (**MA**), cuja temperatura média anual é de 36°C. Populações das regiões intermediárias como Maringá (**PR**), São José do Rio Preto (**SP**), Serra do Cipó (**MG**) e Teresina (**PI**), com temperaturas médias anuais variando entre 22°C e 35°C, apresentaram DGs intermediários para o cruzamento A.



Os cruzamentos realizados a 25°C, objetivando a mobilização do elemento *hobo*, mostraram índices DGs inferiores àqueles obtidos a 29°C. Nos cruzamentos A, os maiores índices foram os das linhagens **SC** (15,8%) e **MA** (14,2%), seguidas por **MG** (9,5%), **SP** (6,0%), **RS** (2,5%) **PR** e **PI** (1,6%). Nos cruzamentos A*, os índices foram todos baixos, sugerindo alta habilidade regulatória das linhagens. O cruzamento-controle, **Canton-S** vs **23,5/CyL**, apresentou um índice de disgenesia menor que para *P*, com apenas 25% de ovários disgênicos.

Tentou-se classificar as linhagens em fenótipos H-E. As linhagens **SC** e **MA** foram consideradas H⁺, pois apresentaram potencial moderado de atividade e de repressão dependente do elemento *hobo*. As linhagens **RS**, **PR**, **SP**, **MG** e **PI** comportaram-se como H⁰, apresentando moderado potencial de repressão, mas baixo potencial de atividade *hobo*.

Os resultados deste trabalho constituem a primeira contribuição para o entendimento do padrão de distribuição geográfica dos fenótipos P-M e H-E, em populações de *Drosophila melanogaster* de regiões brasileiras. Dos resultados obtidos, algumas generalizações puderam ser feitas: (1) As sete populações naturais amostradas em regiões extremas do Brasil apresentam elementos *P* e *hobo* em seus genomas, evidenciados por análise molecular e fenotípica; (2) estas linhagens diferem fenotipicamente tanto para o sistema P-M, quanto para o sistema H-E; 3) quanto ao sistema P-M, as linhagens podem ser classificadas em *P* moderadas (**MA**, **MG** e **SP**), *Q* (**PI**, **PR** e **RS**) e *M'* (**SC**); 4) no sistema P-M evidencia-se uma variação clinal dependente de temperatura marcante para a produtividade em F₂, e menos definida para a disgenesia gonadal; (5) quanto ao sistema H-E, as linhagens podem ser classificadas em H⁺ (**MA** e **SC**) e H⁰ (**PI**, **MG**, **SP**, **PR** e **RS**); 6) para o sistema H-E, não ficou evidenciada a variação clinal observada no sistema P-M e 7) quanto aos dois sistemas, as linhagens podem ser classificadas como P-H⁺ (**MA**), P-H⁰ (**MG** e **SP**), Q-H⁰ (**PI**, **PR** e **RS**) e *M'*-H⁺ (**SC**).



VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The crossing of two different types of strains of *Drosophila melanogaster*, results in varying degrees of nonreciprocal hybrid sterility. The P-M gonadal dysgenesis occurs when males from an *P* strain, which have *P* elements in its genome, are crossed with females from an M strain, without these elements. In the H-E system, gonadal dysgenesis occurs when H males, which have *hobo* elements, are crossed with E females, without these elements.

In this work, seven natural populations of *D. melanogaster*, sampled between September, 1995 and April, 1996, from Porto Alegre (**RS**), Joinville (**SC**), Maringá (**PR**), São José do Rio Preto (**SP**), Serra do Cipó (**MG**), Teresina (**PI**) and São Luís (**MA**), were studied. Phenotypic tests were done with the purpose of detecting the *P* e *hobo* elements occurrence in these strains and the degree of hybrid dysgenesis due to mobilization of these elements in the hybrid genome. These tests are also appropriated to show the regulatory capacity of the strain's citotypes. Diagnostic crosses were done with the test-strains, **Harwich** (P-E strain), **23,5/CyL** (H-M strain) and **Canton-S** (M-E strain). The *P* and *hobo* elements occurrence was also evaluated by PCR, using the *P* and *hobo* element-specific primer sequences. The sizes of the expected PCR products were the expected in all experimental strains.

Diagnostic crosses called A were done by crossing **Canton-S** females with males from the experimental strains. These crosses have the purpose of measure the strain potential to induce dysgenic traits into the germinal tissue of its M or E citotype descendants, when respectively realized at 29°C (due to *P* element mobilization) or at 25°C (possibly due to *hobo* element mobilization). The A* crosses, between females of the experimental strains and males from the Harwich or 23,5/CyL strains have the purpose of evaluating the regulatory ability of the strain cytotype to repress the *P* or *hobo* elements coming from the father's genome. Crosses between males and females of the experimental strains, and control crosses for the A and A* diagnostic crosses were also done.

At both temperatures, 60 F1 mated females (that were individually kept in vials for oviposition, at 25°C) and 30 F1 males were dissected for investigating ovaries and testis abnormalities. From these F1 females the F2 progeny was recorded. These data were used to calculate gonadal dysgenesis



indexes (Kidwell, 1986) for the F1 hybrids, and fertility and productivity, from four days of oviposition, for F2 generation of each cross.

For the crosses set up at 29°C, the results are as follows: A crosses, that indicate the *P* potential to transposition, showed the higher values in the hybrids of **MA** (DG=20,0%), followed by **SP** (DG=19,2%), **MG** (DG=14,1%) and **PI** (DG=10,1%) strains, and, the smaller values in the **PR** (DG=9,1%), **RS** (DG=5,8%) and **SC** (DG=0,9%) strains. A* crosses, that indicate the strain susceptibility to *P* elements, showed the higher indexes in **SC** (DG=11,6) and **PI** (DG=10,8) strains and, the smaller, in **RS** (DG=2,5%), **MG** (DG=1,7%) and **SP** (DG=0,9%) strains. The control cross (females **Canton-S** vs males **Harwich**) presented 100% of gonadal dysgenesis, as expected. The testis dysgenesis percentage were significantly smaller than that from ovaries.

An analysis of similarity was performed using the data from the F1 (related to dysgenesis) and F2 (related to productivity) generations. The dendograms showed a strong north-south clinal variation for productivity, and a not so clear clinal variation for gonadal dysgenesis, with the higher productivity and DG indexes distinguishing the strains coming from the north.

The strains were classified according to its P-M phenotypes. Three of them were classified as moderated P strains (**MA**, **MG** and **SP**), three as Q (**PI**, **PR** and **RS**) and one as M' strain (**SC**). Those strains come from the south, that is characterized by mean annual temperatures varying between 20°C and 27°C and well defined seasons, presented in crosses A, smaller degrees of gonadal sterility than that coming from the north (**MA** strain, for example) where mean annual temperature is of about 36°C. Strains coming from the intermediate regions, as those from Maringá (**PR**), São José do Rio Preto (**SP**), Serra do Cipó (**MG**) and Teresina (**PI**), with mean annual temperatures varying between 22°C and 35°C, presented intermediate DGs.

The crosses set up at 25°C, with the purpose of mobilizing *hobo* elements, showed smaller DGs values compared to those at 29°C. The A crosses showed the higher values for the **SC** (DG=15,8%) and **MA** (DG=14,28%) strains, followed by **MG** (DG=9,48%), **SP** (DG=6,03%), **RS** (DG=2,50%) and **PR** and **PI** (DGs=1,66%) strains. The A* crosses produced smaller DGs values, suggesting a high regulatory ability of the strains. The control cross, females **Canton-S** vs



males **23,5/CyL**, presented DG smaller than that from *P* mobilization, with only 25% of dysgenic ovaries.

We tried to classify the strains according to the H-E phenotypes. The **SC** and **MA** were classified as H^+ strains, due to both their moderated activity and repression potential for *hobo*. The **RS**, **PR**, **SP**, **MG** and **PI** are proposed to be H^0 strains, due to their moderated repression ability and low potential activity for *hobo* mobilization.

The results of this work are the first contribution to the understanding of the pattern of geographic distribution for the P-M and H-E phenotypes in *Drosophila melanogaster* populations from Brazilian regions. From these data work some generalizations could be done: (1) the seven natural populations sampled from extreme Brazilian regions present *P* e *hobo* elements in their genomes, shown by molecular and phenotypic analysis; (2) the seven strains are phenotypically different for both P-M and H-E systems; 3) for the P-M system, the strains could be classified as moderate P (**MA**, **MG** and **SP**), Q (**PI**, **PR** e **RS**) and M'(**SC**); 4) the P-M system shows an clinal variation dependent from temperature for productivity in F2 generation and for gonadal dysgenesis, the last not so well defined as the former; 5) for the H-E system, the strains could be classified as H^0 (**MA** e **SC**) and H^+ (**PI**, **MG**, **SP**, **PR** and **RS**); 6) the H-E system do not show the clinal variation observed for the P-M system; 7) according to both P-M and H-E systems, the strains are classified as P- H^+ (**MA**), P- H^0 (**MG** and **SP**), Q- H^0 (**PI**, **PR** and **RS**) and M'- H^+ (**SC**).

The results of this work are the first contribution to the understanding of the pattern of geographic distribution for the P-M and H-E phenotypes in *Drosophila melanogaster* populations from extreme Brazilian regions.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIOKA, J.W., HARTL, D.L. Population dynamics of transposable elements. In: BERG, D. E., HOWE, M.M. (Ed.). *Mobile DNA*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1989. p. 939-958.
- ANXOLABÈHÈRE, D., KIDWELL, M.G., PERIQUET, G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements. *Molecular Biology Evolution*, v. 5, p. 252-269, 1987a.
- ANXOLABÈHÈRE, D., NOUAUD, D., PERIQUET, G. Evolutionary genetics of the *P* transposable elements in *Drosophila melanogaster* and in *Drosophilidae* family. *Genetics*, v.7, p.1-8, 1988.
- ANXOLABÈHÈRE, D., BENES, H., NOUAUD, D., PERIQUET, G. Evolutionary steps and transposable elements in *Drosophila melanogaster*: the missing RP type obtained by genetic transformation. *Evolution*, v.41, n.4, p.846-853, 1987b.
- ANXOLABÈHÈRE, D., KAI, H., NOUAUD, D., PERIQUET, G. P-M system: a survey of *Drosophila melanogaster* strains from the People's Republic of China. *Génét. Sél. Evol.*, v. 22, p. 175-188, 1990.
- BAZIN, C., LEMEUNIER, F., PERIQUET, G., SILBIER, J. Genetic analysis of *vg^{al}*: a spontaneous and unstable mutation at the vestigial locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research (Cambridge)*, v. 57, p.235-243, 1991.
- BINGHAM, P.M., ZACHAR, Z. Retrotransposons and the FB transposon from *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed.). *Mobile DNA*, Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1989. p. 485-502.
- BINGHAM, P.M., KIDWELL, M.G., RUBIN, G.M. The molecular basis of the P-M hybrid dysgenesis: the role of the *P* element, a *P* strain transposon family. *Cell*, v. 29, p. 995-1004, 1982.
- BLACK, D.M., JACKSON, M.S., KIDWELL, M.G., DOVER, G.A. KP elements repress *P* induced dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal*, v.6, p.4125-4135, 1987.
- BLACKMAN, R., GELBART, W. *Hobo* elements in *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed.) *Mobile DNA*. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1989. p. 523-529.



- BLACKMAN, R., GRIMAILA, M., KOEHLER, M., GELBERT, W. Mobilization of *hobo* elements residing within the decapentaplegic gene complex: suggestion of a new hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, v. 49, p. 497-505, 1987.
- BOUSSY, I.A. A latitudinal cline in P-M gonadal dysgenesis potential in Australian *Drosophila melanogaster* populations. *Genetic Research* (Cambridge), v. 49, p.11-18, 1987.
- BOUSSY, I.A., KIDWELL, M.G. The P-M hibrid dysgenesis cline in eastern Australian *Drosophila melanogaster*: discrete P, Q and M regions are nearly contiguos. *Genetics*, v.115, p.737-345, 1987.
- BOUSSY, I.A., DANIELS, S.B. *Hobo* transposable elements in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genetic Research* (Cambridge), v. 58, p. 27-34, 1991.
- BOUSSY, I.A., HEALY, M.J., OAKESHOTT, J.C., KIDWELL, M.G. Molecular analysis of P-M gonodal dysgenesis cline eastern Australian *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.119, p.889-902, 1988.
- BREGLIANO, J.C., KIDWELL, M.G. Hybrid dysgenesis determinants. In: SHAPIRO, J. A. (Ed.). *Mobile Genetic Elements*, New York: Academic Press,1983. p. 363-410.
- BRUN, G., PLUS, N. The viruses of *Drosophila*. In: ASHBURNER, M., WRIGHT, T.R.T (Ed.). *The genetics and biology of Drosophila*. New York: Academic Press, 1980. p. 626-702.
- BURNS, G.W., BOTTINO, P.J. Elementos de Transposição. In: *Genética*. Guanabara koogan, 6 ed., 1991, p. 219-221.
- CALVI, B.R., GELBART, W. M. The basis for germline specificity of the *hobo* transposable element in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal*, v. 13, p. 1636-1644, 1994.
- CARARETO, C.M.A. Adaptação Biológica. *Ciência e Cultura*, v. 41, n.1, p. 13-19, 1990.
- CHARLESWORTH, B., CHARLESWORTH, D. The populations dynamics of transposable elements. *Genetic Research*, v.42, p.1-27, 1983.
- CHARLESWORTH, B., LANGLEY, C. The evolution of self-regulated transposition of transposable elements. *Genetics*, v.112, p.359-383, 1986.



- CLARK, J.B., ALTHEIDE, T.K., SCHLOSSER, M.J., KIDWELL, M.G. Molecular evolution of *P* transposable elements in the genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species group. *Molecular Biology Evolution*, v.12, n.5, p.902-913, 1995.
- CORISH, P., BLACK, D.M., FEATHERSTON, D.W., MERRIAM, J., DOVER, G.A. Natural repressors of *P*-induced hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a model for repressor evolution. *Genetic Research* (Cambridge), v. 67, p. 109-121, 1996.
- CUMMINGS, M.P. Transmission patterns of eukariotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *Tree*, v.9, p.141-145, 1994.
- DANIELS, S.B., McCARRON, M., LOVE C., CHOVINICK, A. Dysgenesis induced instability of rosy locus transformation in *Drosophila melanogaster*: analysis of excision events and the selective recovery of control element deletions. *Genetics*, v.109, p. 95-117, 1985.
- DANIELS, S.B., CLARK, S.H., KIDWELL, M.G. , CHOVINICK, A. Genetic transformation of *Drosophila melanogaster* with an autonomous *P* element: phenotypic and molecular analyses of long-established transformed lines. *Genetic*, v.115, p. 711-723, 1987.
- DANIELS, S.B., PETTERSON, K.R., STRAUSBAUGH, L.D., KIDWELL, M.G., CHOVINICK, A. C. Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable elements between *Drosophila* species. *Genetics*, v.124, p. 339-355, 1990.
- DERZHAVETZ, E.M., KIM, A.I., ASLANIAN, M.M. The analysis of spontaneous chromosomal rearrangements in neuroblasts of genetically unstable mutator strain of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* (USSR), v. 24, p. 857-866, 1988.
- DOBZHANSKY, TH. Biological adaptation. *The Scientific Monthly*, v. 55, p. 391-402, 1942.
- DOOLITTLE, W.F., SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, v. 284, p. 601-603, 1980.
- EGGLESTON, W.B., JOHNSON-SCHLITZ, D.M., ENGELS, W.R. P-M dysgenesis does not mobilize other transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, v. 331, p. 368-370, 1988.



- ENGELS, W.R. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: rules of inheritance of female sterility. *Genetic Research* (Cambridge), v. 33, p. 219-236, 1979.
- _____. The *P* family of transposable elements in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, v. 17, p. 315-344, 1983.
- _____. *P* elements in *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed.). *Mobile DNA*, Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1989. p. 439-477.
- ENGELS, W.R., PRESTON, C.R. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. The biology of female and male sterility. *Genetics*, v. 92, p. 161-174, 1979.
- _____. Components of hybrid dysgenesis in a wild population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.95, p.111-128, 1980.
- ENGELS, W.R., BENZ, W.K., PRESTON, C.R., GRAHAM, P.L., PHILLIS, R.W., ROBERTSON, H.M. Somatic effects of *P* element activity in *Drosophila melanogaster*: pupal lethality. *Genetics*, v. 117, p. 745-757, 1987.
- FINNEGAN, D.J. The *I* factor and *I-R* hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed.). *Mobile DNA*, Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1989. p. 503-521.
- FITZPATRICK, B., SVED, J.A. High levels of fitness modifiers induced by hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research* (Cambridge), v. 48, p. 89-94, 1986.
- FONTDEVILLA, A. Genetic instability and rapid speciation: are they coupled? *Genetica*, v.86, p. 247-258, 1992.
- GALINDO, M.I., LADEVÈZE, V., LEMEUNIER, F., KALMES, R., PERIQUET, G., PASCUAL, L. Spread of the autonomous transposable element *hobo* in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology Evolution*, v. 12, n. 5, p. 723-734, 1995.
- GARDNER, E.J., SIMMONS, M.J., SNUSTAD, D.P. Transposable Genetic Elements In: *Principles of genetics*. John Wiley & Sons, INC. 8th ed. 1991. p. 230-246.
- GOOD, A.G., HICKEY, D.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the elimination of *P* elements through repeated backcrossing to an M-type strain. *Genome*, v. 29, p. 195-200, 1987.



- HARTL, D.L., LOZOVSKAYA, E.R., LAWRENCE, J.G. Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. *Genetica*, v. 86, p. 47-53, 1992.
- HATZOPOULOS, P., LOUIS, C. *Hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23,5 MRF. *Cell*, v. 49, p. 487-495, 1987.
- HICKEY, D.A. Evolutionary dynamics of transposable elements in prokariotes and eukariontes. *Genetica*, v. 86, p. 269-274, 1992.
- HO, Y.T., WEBER, S.M., LIM, J.K. Interacting *hobo* transposons in an inbreed strain and interaction regulation in hybrids of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 134, p. 895-908, 1993.
- HOUCK, M.A., CLARK, J.B., PETERSON, K.R., KIDWELL, M.G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genus by the mite *Protolaelaps regalis*. *Science*, v. 253, p. 1125-1129, 1991.
- JOUAN-DOFOURNEL, I., COSSET, F., CONTAMINE, D., VERDIER, G., BIEMONT, C. Transposable elements behavior following viral genomic stress in *Drosophila melanogaster* inbred line. *Journal of Molecular Evolution*, v.43, p.19-27,1996.
- KAPLAN, N.L., BROOKFIELD, J.Y.L. The effect on homozygosity of selective differences between sites of transposable elements. *Theoretical Population Biology*, v. 23, p.272-280, 1983.
- KAPLAN, N., DARDEN, T., LANGLEY, C. Evolution and extinction of transposable elements in Mendelian populations. *Genetics*, v.109, p.459-480,1985.
- KAUFMAN, P.D., RIO, D.C. *P* element transposition *in vitro* proceeds by a cut-and-past mechanism and uses GTP as a cofactor. *Cell*, v. 69, p. 27-69, 1992.
- KIDWELL, M.G. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, v. 80, p. 1655-1659, 1983.
- _____. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: partial sterility associated with embryo lethality in the P-M system. *Genetical Research (Cambridge)*, v. 44, p. 11-28, 1984.
- _____. *Chromosoma*, v.103, p. 659-668, 1995.



- ____. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: synthesis of *RP* strains by chromosomal contamination. *Genetic Research* (Cambridge), v. 47, p. 181-185, 1986.
- KIDWELL, M.G., NOVY, J.B. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: sterility resulting from gonadal dysgenesis in the *P-M* system. *Genetics*, v. 92, p. 1127-1140, 1979.
- KIDWELL, M.G., KIDWELL, J., SVED, J. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: A syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*, v. 86, p. 813-833, 1977.
- KIDWELL, M.G., NOVY, J.B., FEELEY, S.M. Rapid unidirectional change of hybrid dysgenesis potential in *Drosophila*. *J. Hered.*, v. 72, p. 32-38, 1981.
- KIDWELL, M.G., KIMURA, K., BLACK, D.M. Evolution of hybrid dysgenesis potential following *P* element contamination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 119, p. 815-828, 1988.
- KIDWELL, M.G., PETERSON, K.R., DANIELS, S.B. Evolution of *P* elements in the genus *Drosophila*. *Molecular Evolution*, p. 107-116, 1990.
- KIM, A.I., BELYAEVA, E.S. Transposition of mobile element *gypsy* (mdg 4) and *hobo* in germ-line and somatic cells of a genetically unstable mutator strains of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genes Genetics*, v. 229, p. 437-444, 1991.
- KIM, A.I., BELYAEVA, E.S., ASLANIAN, M.M. Autonomous transposition of *gypsy* mobile element and genetic instability in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genes Genetics*, v. 224, p. 303-308, 1990.
- KIYASU, P.K., KIDWELL, M.G. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the evolution of mixed *P* and *M* populations maintained at high temperature. *Genetic Research*, v. 44, p. 251-259, 1984.
- LANGLEY, C.H., MONTGOMERY, E., HUDSON, R., KAPLAN, N., CHARLESWORTH, B. On the role of unequal exchange in the containment of transposable element copy number. *Genetical Research* (Cambridge), v. 52, p. 223-235, 1988.
- LANKENAU, D-H. Genetics of genetics in *Drosophila*: *P* elements serving the study of homologous recombination, gene conversion and targeting. *Chromosoma*, v. 103, p. 659-668, 1995.



- LIM, J.K. Intrachromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (USA), v. 85, p. 9153-9157, 1988.
- LINTS, F.A., LINTS, C.V. Influence of preimaginal environment of fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids. II. Preimaginal temperature. *Experientia Gerontology*, v. 6, p. 417-426, 1971.
- LORETO, E.L.S. *Elementos transponíveis em espécies neotropicais de Drosophila e suas implicações evolutivas*. Porto Alegre, 1997. 171p. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas-Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- MACKAY, T.F. Transposable element-induced fitness mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research* (Cambridge), v. 48, p. 77-87, 1986.
- MARUYAMA, K., HARTL, D.L. Evolution of the transposable element *mariner* in *Drosophila* species. *Genetics*, v. 128, p. 319-329, 1991.
- MCGINNIS, W., SHERMOEN, A.W., BECKENDORF, S.K. A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure. *Cell*, v. 34, p. 75-84, 1983.
- MOUNT, S.M., RUBIN, G.M. Complete nucleotide sequence of the *Drosophila* transposable element *copia*: homology between *copia* and retroviral proteins. *Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 1630-1638, 1985.
- MUKAI, T., VOELKER, R.A. The genetic structure of natural population of *Drosophila melanogaster*. XIII. Further studies on linkage disequilibrium. *Genetics*, v. 86, p. 175-185, 1977.
- O'HARE, K., RUBIN, G.M. Structure of *P* element transposable and their sites of insertion and excision in *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, v.25, p. 24-35, 1983.
- O'HARE, K., ALLEY, M.R.K., CULLINGFORD, T.E., DRIVER, A. , SANDERSON, M.J. DNA sequence of the *Doc* retroposon in the white-one mutant of *Drosophila melanogaster* and of secondary insertions in the phenotypically altered derivatives white-honey and white-eosin. *Molecular Genes Genetics*, v. 225, p. 17-24, 1991.
- ORGEL, L.E., CRICK, F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, v. 284, p. 604-607, 1980.



- PAIK, Y.K., LEE, C.G., CHA, B.H., YIM, H.S. Prevalence of incomplete *P* elements in natural Q and M strains of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, v.71, p.256-257, 1992.
- PASCUAL, L., PERIQUET, G. Distribution of *Hobo* transposable elements in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology Evolution*, v.8, n.3, p. 282-296, 1991.
- PASYUKOVA, E.G., BELYAEVA, E.S., KOGAN, G.L., KAIDANOV, L.Z., GVOZDEV, V.A. Concerted transpositions of mobile genetic elements coupled with fitness changes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology Evolution*, v.3, p.299-312, 1986.
- PERIQUET, G., RONSSERAY, S., HAMELIN, M. H. Are *Drosophila melanogaster* populations under a stable geographical differentiation due to the presence of *P* elements? *Heredity*, v.63, p. 45-58, 1989.
- PERIQUET, G. HAMELIN, M.H., BIGOT, Y., KAI, H. Presence of the deleted *hobo* element Th in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*. *Gen. Sel. Evol.*, v. 21, p.107-111, 1989a.
- PERIQUET, G., M., HAMELIN, M. H., BIGOT, Y., LEPISSIER, A. Geographical and historical patterns of distribution of *hobo* elements in *Drosophila melanogaster*. *Journal Evolution Biology*, v. 2, p. 223-229, 1989b.
- PERIQUET, G., HAMELIN, M., KALMES, R., EAKEN, J. *Hobo* elements and their deletion-derivative sequences in *Drosophila melanogaster* and its sibling species *D. simulans*, *D. mauritiana* and *D. sechellia*. *Gen. Sel. Evol.*, v.22, p. 393-402, 1990.
- PIMPINELLI, S., BERLOCO, M., FANTI, L., DIMITRI, P., BONACCORSI, S., MARCHETTI, E., CAIZZI, R., CAGGESE, C., GATTI, M. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterocromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, v. 92, p. 3804-3808, 1995.
- PRESTON, C.R., ENGELS, W.R.. Movement of *P* elements within a *P* strain. *Drosophila Information Service*, v. 60, p.169-170, 1984.
- RASMUSOM, K.E., RAYMOND, J.D., SIMMONS, M.J. Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by individual naturally occurring *P* elements. *Genetics*, v.133, p.605-622, 1993.



- ROBERTSON, H.M., PRESTON, C.R., PHILLIS, W.R., JOHNSON-SCHLITZ, D., BENZ, W.K., ENGELS, W.R. A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 118, p. 461-470, 1988.
- RONSSERAY, S., LEMAITRE, B., COEN, D. Maternal inheritance of *P* cytotype in *Drosophila melanogaster*: a pre-*P* cytotype is strictly extra-chromosomally transmitted. *Molecular Genes Genetics*, v. 241, p. 115-123, 1993.
- RUBIN, G. M. Dispersed repetitive DNAs in *Drosophila*. In: *Mobile Genetic elements*. SHAPIRO, J.A. (Ed.) New York: Academic Press, 1983. p. 329-361.
- SHEEN, F., LIM, J.K., SIMMONS, M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster* mediated by *hobo* transposable elements. *Genetics*, v. 133, p. 315-334, 1993.
- SIEBEL, C.W., FRESCO, L.D., RIO, D.C. The mechanism of somatic inhibition of *Drosophila P*-element pre-mRNA splicing: multiprotein complexes at an exon pseudo-5' splice site control U1 snRNP binding. *Genes Development*, v. 6, p. 1386-1401, 1992.
- STAMATIS, N., MONASTIRIOTI, M., YANNOPOULOS, G., LOUIS, C. The P-M and the 23.5 MRF (*hobo*) systems of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* are independent of each other. *Genetics*, v. 123, p. 379-387, 1989.
- STEARNS, S.C., KAISER, M. Effects on fitness components of *P*-element inserts in *Drosophila melanogaster*: analysis of trade-offs. *Evolution*, v. 50, n. 2, p. 795-806, 1996.
- STRECK, D.R., MACGAFFEY, J.E., BECKENDORF, S.K. The structure of *Hobo* transposable elements and their insertion sites. *EMBO Journal*, v.5, n.13, p. 3615-3623, 1986.
- UYENOYAMA, M.K. Quantitative models of hybrid dysgenesis: rapid evolution under transposition, extrachromosomal inheritance, and fertility selection. *Theoretical Population Biology*, v.27, p. 176-201, 1985.
- VERESHCHAGINA, N.M., ILIADI, I.K., NIKITICH, O.A. Comparative studies of *P* and *hobo* element activity, fitness components and recombination parameters in two natural populations of *Drosophila melanogaster* in Moldova. *Hereditas*, v. 120, p. 91-98, 1994.



- YANNOPOULOS, G., STAMATIS, N., MONASTIRIOTI, M., HATZOPOULOS, P., LOUIS, C. *Hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23,5 MRF. *Cell*, v. 49, p. 487-495, 1987.
- WOODRUFF, R.C. Transposable DNA elements and life history traits. I. Transposition of *P*-DNA elements in somatic cells reduces the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v.86, p.143-154, 1992.
- WOODRUFF, R.C., BLOUNT, J.L., THOMPSON, JR. J.N. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* is not a general release mechanism for DNA transpositions. *Science*, v. 237, p. 1206-1208, 1987.
- WOODRUFF, R.C., NIKITIN, A.G. *P* DNA element movement in somatic cells reduces lifespan in *Drosophila melanogaster*: evidence in support of the somatic mutation theory of aging. *Mutation Research*, v. 338, p. 35-42, 1995.



Agradecimentos

Ao término deste trabalho, gostaria de expressar minha gratidão as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização. Em especial:

à Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, pela dedicação profissional e pela maneira segura com que sempre me orientou em cada etapa deste trabalho;

às Profas. Dra. Vera Lúcia Valente Gaiesky e Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela atenção e valiosas sugestões na análise da proforma;

à Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho;

ao Departamento de Biologia pela acolhida e cessão de dependências e equipamentos necessários durante a realização deste trabalho;

ao CNPq, pelo apoio financeiro;

aos Professores do Departamento de Biologia, pela amizade, incentivo, conhecimento e experiência profissional que proporcionaram meu amadurecimento científico;

à Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, pela amizade, colaboração e incentivos constantes;

à Dra. Claudia Regina Bonini Domingos pela presença amiga em todos os momentos;

aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação pela eficiência e disposição com que sempre me atenderam;

aos funcionários do Departamento de Biologia Laura N. A. Pinheiro, Simone C. Fernandes, Olga B. Pelicer, Sebastião D. Barbosa, Paulo Maziero, Josué dos Santos, Neusa Hinae Murai e Rosana S. de Souza, pelo apoio nestes anos de convívio;

às bibliotecárias, pela presteza no serviço de consulta bibliográfica;

à todos os amigos do curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e solidariedade nas horas alegres e nos momentos de dificuldade;

à turma da "salinha" Ana Paula, Ana Regina, Fátima, Patrícia, Lígia pelos
momentos inesquecíveis que passamos juntos;
aos meus pais Nelson e Helena, pelo amor e paciência constantes;
ao meu irmão Júlio, pelo incentivo constante;
ao Carlos, pela compreensão, carinho e apoio em todos os momentos;
Enfim ao Pai

