

MARIANGELA TORREGLOSA RUIZ

Análise da integridade e do número de cópias
dos elementos transponíveis Hobo e P em
populações brasileiras de *Drosophila melanogaster*.



*

1910000987



MARIANGELA TORREGLOSA RUIZ

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE E DO NÚMERO DE CÓPIAS
DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS *HOB* E *P* EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Drosophila melanogaster*.**

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP

2001



MARIANGELA TORREGLOSA RUIZ

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE E DO NÚMERO DE CÓPIAS
DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS *HOB* E *P* EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Drosophila melanogaster*.**



T987/01

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas - Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto

São José do Rio Preto-SP
2001



L575
R931a

Genética

Assunto CAPES: 2.02.04.00 - 0 - Genética animal

Ruiz, Mariangela Torreglosa.

Análise da integridade e do número de cópias dos elementos transponíveis *hobo* e *P* em populações brasileiras de *Drosophila melanogaster* / Mariangela Torreglosa Ruiz. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2001.

81 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Cláudia Márcia Aparecida Carareto.

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

1. Elementos transponíveis. 2. Elementos *P*. 3. Elementos *hobo*. 4. Elementos *KP*. 5. Disgenesia híbrida. 6. *Drosophila melanogaster*. I. Carareto, Cláudia Márcia Aparecida. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

MARIANGELA TORREGLOSA RUIZ

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE E DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS
ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS *HOB* E *P* EM POPULAÇÕES
BRASILEIRAS DE *D. melanogaster*.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

São José do Rio Preto, 21/02/2001.

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob a orientação da Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



Dedico este trabalho às
duas pessoas que, por mim,
a vida dedicaram: ao meu
pai Ginez Antonio Ruiz (*in
memorian*) e à minha mãe
Célia Aparecida Brito Ruiz.

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho somente foi possível graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que, de diferentes formas, estiveram nele envolvidos.

À minha orientadora **Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto**, pela orientação segura, amizade, exemplo de profissionalismo e pela confiança depositada desde do início da minha vida profissional, sendo ela um exemplo do amor à ciência.

À **Profa. Dra. Maura Helena Manfrin**, pela atenciosa análise da pro-forma e por todas as sugestões.

À **Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral**, pela análise da pro-forma e sugestões, pela permissão do uso dos equipamentos de seu laboratório e pela amizade nestes dois anos.

À **Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva** e ao **Prof. Dr. José Osmar Gaspar** pela permissão do uso dos equipamentos de seu laboratório, que foram de importância crucial para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Sônia Maria Oliani**, que incentivou meus primeiros passos na carreira científica.

À **Profa. Dra. Paula Rahal** por todas as sugestões, pelo carinho e apoio.

Aos demais professores do **Departamento de Biologia**, pelos preciosos ensinamentos, pela colaboração e incentivo.

Ao amigo **Josué Rodrigues dos Santos**, pelo apoio técnico e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, **Simone Carvalho Fernandes**, **Paulo Antônio Mazziero** e **Sebastião Dias Barbosa**, e aos funcionários da **Seção de Pós-Graduação**, pela colaboração na execução dos diversos trabalhos.

Aos amigos **Marcos Roberto Higino Estécio**, **Alessandra Bernadete Trovó** e **Giuliana Fujino**, meus grandes “parceiros”, amigos que de forma direta contribuíram para escrever alguns capítulos de minha vida nestes últimos anos.

Agradeço ao apoio, ao incentivo e à paciência por ouvirem todos os meus “choros” e “gargalhadas” durante este período.

Aos amigos do **Departamento de Física** pelos primeiros ensinamentos das técnicas de laboratório.

Às amigas **Luciane Madureira de Almeida** e **Juliana Polachini de Castro** que me proporcionaram o aprendizado das técnicas utilizadas com muita paciência e dedicação e aos estagiários **Flávia Cal Sabino** e **Luís Gustavo da Conceição Galego**, pela convivência nestes dois anos.

Às amigas **Alessandra Theodoro Laranja**, **Luciana Márcia Sant’ana Espinha**, **Priscila Belintani**, **Andréia Estela Moreira** pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos do **Laboratório de Biologia Molecular** e aos demais amigos da Pós-Graduação pela convivência nestes dois anos.

A todos os amigos das **Equipes Jovens de Nossa Senhora**, pelo apoio e amizade dedicada, contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus primos **Vladineu**, **Janice** e **Cristian Torreglosa** pela acolhida e apoio na cidade de Ribeirão Preto.

À minha avó **Angelina Pereira de Souza**, por sempre estar me esperando com o almoço quentinho e na hora certa.

À minha irmã **Mariana Torreglosa Ruiz**, pela compreensão de todos os meus momentos de mau humor e por todo o amor dedicado.

À minha mãe **Célia Aparecida Brito Ruiz** que, mesmo trabalhando duro para cumprir o papel de pai e mãe, sempre se preocupou comigo e me deu colo todas as vezes que precisei.

Ao meu pai, **Ginez Antonio Ruiz**, que em vida proporcionara toda a minha formação e com seu exemplo de amor, dedicação e profissionalismo colaborara para a realização deste trabalho.

À **CAPES** e **FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À **Deus** por tudo.

O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton
(1643-1727)



Sumário

I. Introdução	09
II. Material e Métodos	
A. Material Biológico	21
B. Metodologia	
1. Extração do DNA genômico	22
2. Análise da qualidade do DNA extraído	23
3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
4. Transformação rápida e clonagem da bactéria DH5 α para multiplicação dos plasmídeos pHX4 e p π 25.1	25
5. Hibridização em membrana	27
6. Análises Estatísticas	31
III. Resultados	
1. Transformação de <i>Escherichia coli</i> e produção de sondas	33
2. Análises moleculares dos elementos transponíveis	35
A. Elemento transponível <i>hobo</i>	35
B. Elemento transponível <i>P</i>	41
3. Análises Estatísticas	53
IV. Discussão	57
V. Conclusões	71
VI. Referências Bibliográficas	73
VII. Resumo	80
VIII. Abstract	81

I. INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis são seqüências móveis de DNA repetitivo que estão dispersas no genoma de todos os organismos, desde bactérias até eucariotos superiores. Compreendem uma grande fração dos genomas. O humano, por exemplo, contém cerca de 35% de elementos transponíveis, o de milho, 50%, e o de *Drosophila melanogaster* cerca de 15% (Kidwell & Lisch, 2000).

Os elementos transponíveis (TEs) estão envolvidos com a origem de ampla variedade de fenômenos biológicos, tais como (a) a ocorrência de mutações, causadas pela sua inserção ou pelo transporte de seqüências do DNA hospedeiro quando se deslocam de uma posição genômica para outra, (b) a ocorrência de deleções e duplicações de seqüências gênicas resultantes da recombinação homóloga entre duas de suas cópias ou, ainda, (c) a dispersão de uma variedade de genes, como aqueles para resistência a antibióticos contidos em elementos transponíveis de bactérias (Craig, 1997).

O movimento dos TEs pode ter um impacto importante na estrutura, na variabilidade e na função dos genomas hospedeiros, desde que se inserem tanto em seqüências codificadoras ou não, como também em seqüências reguladoras (Capy *et al.*, 1998).

Dois níveis de seleção podem estar relacionados aos elementos transponíveis – seleção positiva, em nível do DNA do TE e seleção negativa, em nível do organismo hospedeiro. A seleção positiva resulta da habilidade das seqüências dos elementos transponíveis replicarem mais rapidamente do que as seqüências do genoma hospedeiro. Como os TEs codificam apenas proteínas relacionadas à sua própria propagação, a seleção positiva fundamenta-se na “hipótese do DNA egoísta” ou, mais apropriadamente, “hipótese do DNA parasita” (Pardue, 2000). A seleção negativa resulta das inserções mutacionais, que são deletérias para os hospedeiros, e das recombinações ectópicas entre as seqüências homólogas de elementos localizados em regiões não-homólogas do genoma.



Embora se aceite a ocorrência de seleção positiva, as opiniões sobre a frequência de efeitos benéficos decorrentes da presença dos elementos transponíveis no genoma hospedeiro são conflitantes. Alguns pesquisadores afirmam que a seleção positiva é tão rara que não exerce impacto algum na evolução do genoma hospedeiro, enquanto outros, consideram que os TEs possam produzir efeitos benéficos para seus hospedeiros mais frequentemente do que os conhecimentos prévios sugeriam (Kidwell & Lisch, 2000). Pardue (2000), por exemplo, que extratos de fungos podem ativar a transposição do elemento *Tnt1* no tabaco; neste caso, o estresse ambiental poderia ativar os elementos transponíveis. A ativação decorrente do estresse poderia ser uma tática utilizada pelos TEs para se manterem, mas, também poderiam conferir benefícios ao hospedeiro, desde que, se ativados, induziriam mudanças genômicas durante tempos difíceis.

No curso de sua evolução, os TEs acumularam várias características que presumidamente estimulam sua habilidade para aumentar em número de cópias. Um exemplo é a presença de sinais regulatórios, tais como elementos intensificadores (do inglês: “enhancers”), que habilitam esses elementos a modular a expressão gênica dos hospedeiros. Um exemplo recente é fornecido pelo gene da apolipoproteína, em humanos. Um “*enhancer*” deste gene, localizado 20 kb à montante do sítio de início da transcrição, está contido inteiramente dentro de um elemento da superfamília *LINE*; então, o elemento transponível torna-se uma parte integral da regulação do gene hospedeiro (Kidwell & Lisch, 2000).

A neutralidade dos elementos transponíveis em nível do organismo também é muito comum, especialmente pela inativação dos TEs deletados, que compreendem a vasta maioria destas seqüências no genoma dos eucariotos.

Em síntese, as relações entre os elementos transponíveis e o genoma de seus hospedeiros são altamente complexas e pobremente compreendidas. Mesmo que tais elementos constituam uma parcela da “carga genética” do genoma do hospedeiro, eles podem favorecer uma adaptação mais rápida às mudanças ambientais ou estresses de outra natureza. Desse modo, estes efeitos são paradoxais e não mutuamente exclusivos (Capy *et al.*, 1998).



A expressão dos elementos transponíveis pode ser afetada por várias pressões, uma das mais importantes é a mistura de genomas. Um dos exemplos do efeito da mistura de genomas na mobilização dos TEs é a síndrome da disgenesia híbrida. A definição desta síndrome foi dada por Kidwell & Kidwell (1976) como “uma síndrome de traços genéticos correlacionados que são espontaneamente induzidos em híbridos entre certas linhagens que interagem mutuamente, usualmente em uma única direção”. Esta síndrome foi descrita em *D. melanogaster* para o elemento transponível *P*, e um fenômeno similar foi descrito para outros dois elementos independentes, os elementos *hobo* e *I*.

Segundo Craig (1997), embora elementos móveis possam se inserir em muitos sítios diferentes, a utilização do sítio-alvo geralmente não é aleatória: a maioria dos TEs apresenta algum grau de seletividade ao sítio-alvo. São diversos os padrões de seleção destes sítios, e estes padrões são característicos de cada tipo de elemento.

A seleção do sítio-alvo pode estar relacionada tanto com seqüências particulares do DNA-alvo, como com sua estrutura. Como exemplos de TEs que apresentam especificidade quanto a seqüências particulares citam-se o elemento *Tn10* de bactérias, que se insere preferencialmente em seqüências 5'-NGCTNGACN - 3', os elementos *Tc1* e *Tc3* de *Caenorhabditis elegans*, que selecionam dinucleotídeos TA, ou o elemento *Ty3* de *Sacharomyces cerevisiae*, que se insere a poucos nucleotídeos acima dos promotores dos genes da RNA pol III. Como exemplos de elementos que se inserem preferencialmente em estruturas particulares de DNA podem ser citados o elemento *Ty5* de *S. cerevisiae*, que se insere preferencialmente na cromatina silenciosa, o elemento *Tn7* de bactérias, que seleciona plasmídeos conjugantes, o que propicia sua transmissão entre clones de bactérias, e o elemento *P* de *D. melanogaster*, que se insere preferencialmente em seqüências palindrômicas de 14 pb (Craig, 1997).

Os padrões particulares de seleção do sítio-alvo provavelmente facilitam a propagação do elemento e otimizam a relação elemento-hospedeiro. Um padrão comum consiste em evitar a inserção em genes essenciais. Por exemplo, certos elementos se inserem à montante dos promotores, diminuindo, assim, a

probabilidade de inserção em seqüências codificadoras de proteínas essenciais, o que torna a inativação improvável. Outra estratégia para evitar a inativação de genes essenciais é a inserção em genes que possuem muitas cópias, desse modo, a inativação funcional é improvável. Alguns elementos são também íntrons, por possuírem sinais de *splicing*, ao se inserirem em um gene essencial, poderão ser removidos do RNA mensageiro pelo processamento do RNA. Entretanto, muitos elementos inserem-se em diferentes posições, ocasionalmente inserindo-se em genes essenciais.

O padrão de seletividade do sítio-alvo observado para um elemento particular, será influenciado pela frequência com que o sítio é usado como alvo e ao modo como as inserções são detectadas. Por exemplo, os estudos iniciais sobre o elemento *P* de *Drosophila* indicavam que a maioria das inserções estava localizada em seqüências eucromáticas, sugerindo que a heterocromatina seria geralmente refratária à inserção desses elementos transponíveis (Engels, 1989). Estudos subseqüentes mostraram, entretanto, que os elementos *P* inserem-se também na heterocromatina, mas que a maioria dessas inserções não é observada porque são “silenciadas”.

Os elementos transponíveis compreendem uma ampla variedade de seqüências e podem ser agrupados em classes, subclasses, superfamílias, famílias e subfamílias (Capy *et al.*, 1998). As classes são definidas através dos mecanismos de transposição e as subclasses através da estrutura molecular dos TEs. As superfamílias caracterizam-se por apresentarem motivos protéicos ou assinaturas semelhantes. As famílias caracterizam-se pela existência de motivos semelhantes e por apresentarem cerca de 30 a 50 % de similaridade e as subfamílias são caracterizadas por apresentarem 50 a 70 % de similaridade na seqüência de aminoácidos das proteínas produzidas pelos elementos.

A maioria dos elementos transponíveis é agrupada em duas grandes classes, de acordo com seu modo de transposição: classe 1, que inclui os retrotransposons, e classe 2, que inclui os transposons de DNA. Os retrotransposons movimentam-se através de um mecanismo duplicativo que envolve a produção de um RNA intermediário: o elemento original é mantido “*in*

situ”, onde é transcrito, este elemento de RNA é então transcrito reversamente em DNA, que se integra em nova localização genômica. A maior parte dos transposons de DNA, por sua vez, movimenta-se como pedaços de DNA, cortando-se e inserindo-se em novas localizações genômicas.

Há, ainda, uma terceira classe de TEs que é composta por vários elementos que são de difícil classificação, pois possuem características não-usuais, bem como, seus mecanismos de transposição não estão claros. Estes TEs são agrupados nas superfamílias *Foldback* e *MITE*.

Os retrotransposons e os transposons de DNA possuem mecanismos de transposição conhecidos, bem como são conhecidas suas estruturas moleculares. Os retrotransposons são agrupados em duas subclasses: a subclasse I, que inclui os retrotransposons com LTRs (do inglês: “Long Terminal Repeats”) e possui as superfamílias *gypsy-like*, *Ty3*, *Tf1* e *Ty1-copia*, e a subclasse II, que inclui os retrotransposons sem LTRs e possui as superfamílias *LINE* e *SINE*. Por sua vez, os transposons de DNA também são agrupados em duas subclasses, sendo que a subclasse I possui as superfamílias *mariner-Tc1* e *ISa* e a subclasse II, as superfamílias *ISb*, *hAT*, *P*, *MuDR*, *CACTA* e *Tx*. Nas superfamílias *hAT* e *P* estão incluídos os elementos transponíveis *hobo* e *P*, respectivamente, que foram estudados neste trabalho.

O elemento *hobo* foi descrito por McGinnis *et al.* (1983). Em *D. melanogaster*, este transposon apresenta 2959 pb de comprimento, possui repetições terminais invertidas de 12 pb e duas ORFs, uma grande, que se estende da posição nucleotídica 307 a 2289, e uma pequena, que se estende da posição 208 a 303. À montante dessas ORFs estão as sequências CAAT e TATA e à jusante estão diversas sequências sobrepostas candidatas à sinais de poliadenilação (Calvi *et al.*, 1991). A transposição de *hobo* parece ser específica à linhagem germinativa, devido à limitação da transposase a esse tecido (Periquet *et al.*, 1994).

Análises moleculares revelaram duas classes de linhagens definidas pelo elemento *hobo*: linhagens H, que contém alguns elementos completos e numerosos elementos deletados, e linhagens E, que não apresentam estes

transposons (Blackman & Gelbart, 1989). Algumas linhagens contêm somente elementos deletados internamente e presumidamente não-autônomos, estas são denominadas DH (Periquet *et al.*, 1994). Galindo *et al.* (1995) propuseram que algumas populações naturais são H^o, isto é, apresentam potencial de repressão à transposição de elementos *hobo*, mas não apresentam potencial de atividade *hobo*; são consideradas similares ao citótipo Q do sistema P-M. Outras são H⁺, isto é, apresentam potencial de repressão e potencial de atividade *hobo*.

O número de elementos *hobo* completos no genoma de linhagens H é geralmente baixo, duas a 10 cópias, enquanto que o número de elementos defectivos varia de 30 a 75 cópias (Streck *et al.*, 1986; Blackman *et al.*, 1987).

Os elementos *hobo* estão presentes em *D. melanogaster* e *D. simulans*. Ambas espécies possuem linhagens H e E. Em *D. melanogaster*, todas as linhagens antigas são E, enquanto que todas as recém-coletadas são H. Esses achados fundamentaram a proposta que o elemento *hobo* completo tem uma história de introdução horizontal recente nesta espécie (Pascual & Periquet *apud* Simmons, 1992), supostamente entre 1930 e 1940, entretanto, a espécie doadora permanece desconhecida (Capy *et al.*, 1998).

Em *D. melanogaster*, o elemento *hobo* pode dar origem à síndrome da disgenesia híbrida (Blackman *et al.*, 1987; Yannopoulos *et al.*, 1987), em descendentes de cruzamentos entre fêmeas de linhagem E e machos de linhagem H. Entretanto, alguns traços disgênicos têm sido observados em cruzamentos recíprocos (Bonnivard *et al.*, 1997). A síndrome inclui esterilidade termosensível a 25°C, devido à atrofia das gônadas, quebras e rearranjos cromossômicos, mutações e recombinação em machos (Bazin *et al.*, 1999).

O elemento *P* foi o primeiro elemento transponível identificado em *D. melanogaster*. Na maior parte das populações naturais desta espécie, a minoria dos elementos *P* são completos e a maioria são seqüências deletadas internamente. O elemento completo possui 2,9 kb de comprimento e contém repetições terminais invertidas de 31 pb (O'Hare & Rubin, 1983) e repetições subterminais de 11pb. Possui quatro ORFs, todas necessárias para codificar a transposase, enzima que catalisa a transposição. A transposase é uma molécula de 87 KDa, que

ligando-se às regiões subterminais das extremidades do elemento, faz uma clivagem escalonada em cada extremidade, que habilita a seqüência agora livre no genoma a ligar-se ao sítio-alvo de inserção no DNA hospedeiro (Kaufman & Rio, 1991).

Quando os elementos *P* são mobilizados também produzem a síndrome da disgenesia híbrida (Kidwell *et al.*, 1977). Em *D. melanogaster*, esta síndrome caracteriza-se pela esterilidade dependente de altas temperaturas (29°C), taxas elevadas de mutações, rearranjos cromossômicos e recombinação em machos. Estes efeitos são observados principalmente na progênie de machos com elementos *P* completos e fêmeas que não possuem tais elementos. Esses dois tipos de linhagens são chamados “P” e “M”, respectivamente, porque contribuem, paternalmente (P) e maternalmente (M) para a disgenesia híbrida. O cruzamento recíproco (fêmeas P x machos M) produz híbridos nos quais os traços disgênicos são muito reduzidos.

As linhagens de *D. melanogaster* são classificadas quanto ao sistema P-M de acordo com o padrão e a freqüência de indução dos traços disgênicos em cruzamentos diagnósticos. Os traços mais comumente usados como diagnóstico são a esterilidade gonadal e a mutabilidade “singled-weak” (Engels, 1989). A esterilidade disgênica é altamente dependente da temperatura e resulta da falha no desenvolvimento das gônadas dos machos e das fêmeas. Linhagens P possuem elementos *P* ativos, mas seu nível de atividade pode variar e todas possuem habilidade para reprimir a transposição. Em um subgrupo de linhagens P, denominadas P fracas ou Q, a freqüência de esterilidade gonadal em cruzamentos diagnósticos é baixa. Há dois subtipos principais de linhagens M, as linhagens M e as linhagens M’ ou pseudo M. As linhagens M verdadeiras não possuem elementos *P* e possuem uma baixa habilidade repressora da transposição, enquanto que as M’ possuem elementos *P*, mas a habilidade repressora varia de alta a moderadamente baixa.

A taxa de transposição do elemento *P* é controlada por uma série de mecanismos relacionados tanto com a estrutura do elemento como com sua interação com o genoma hospedeiro. De acordo com Capy *et al.* (1998), há no



sistema P-M duas formas principais de regulação da transposição, a regulação através do citótipo e a regulação através de elementos KP.

A regulação através do citótipo é herdada maternalmente e dependente da existência de um repressor da transposição, uma proteína de 66 KDa. Este repressor é uma transposase truncada que retém um sítio promotor de ligação da transposase. O acúmulo de uma pequena quantidade de repressor durante a ovogênese, decorrente da existência de cópias completas no genoma materno, é suficiente para especificar e transmitir o citótipo P (Engels, 1989). Elementos *P* completos, ou seqüências deletadas que perderam o último éxon, podem codificar esta proteína e regular a transposição de *P*. O citótipo P inclui um componente estritamente extracromossômico, denominado pré-citótipo P e a ação de cópias *P* cromossômicas transmitidas por ambos os pais. O pré-citótipo P promove a determinação do citótipo P.

A determinação do citótipo P de um indivíduo requer a herança do pré-citótipo P (maternalmente) e de elementos *P* reguladores cromossômicos (maternalmente ou paternalmente). Dados experimentais mostram que este repressor atua como um repressor transcricional (Lemaitre *et al.*, 1991), ligando-se à seqüência promotora do elemento. Levando-se em conta que a transposase e o repressor competem pelo mesmo promotor e pelo mesmo pré-RNA mensageiro, a repressão transcricional não pode ser completa como o citótipo P; o pré-citótipo P não pode persistir em um zigoto que não possui cópias *P* cromossômicas.

Outros mecanismos de repressão são transmitidos biparentalmente e expressos zigoticamente (Kidwell, 1985). Segundo Gloor *et al.* (1993), há dois tipos de elementos capazes de reprimir a mobilidade do elemento *P* e a disgenesia híbrida: elementos do tipo I, tanto completos como contendo pequenas deleções, e elementos do tipo II, com deleções mais extensas, dos quais o elemento *KP* é um exemplo.

Dentre os elementos do tipo II, ao menos dois tipos de mecanismos poderiam produzir a repressão zigótica.

O primeiro mecanismo é decorrente da existência do elemento *KP*. Este elemento contém 1154 pb de comprimento, tendo sido originado de uma deleção



simples na posição 808-2560 do elemento *P* completo. Foi encontrado em quase todas as linhagens que apresentam repressão zigótica. Mesmo incompleto, o elemento *KP* pode codificar um polipeptídeo capaz de reprimir a transposição através da formação de heterodímeros com a transposase (Black *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1998).

O segundo mecanismo é decorrente da titulação da transposase. Esta enzima pode se ligar à região promotora, tanto dos elementos completos, como dos incompletos, que passam a competir por ela. Se há muitas cópias defectivas e a transposase se liga também às regiões promotoras dessas cópias, a disponibilidade da enzima para a ligação nas regiões promotoras dos elementos completos e a realização da transposição fica diminuída (Simmons & Bucholz, 1985; Simmons *et al.*, 1987).

Finalmente, a regulação pode também ser controlada por fatores produzidos pelos hospedeiros, como é o caso das proteínas IRBP (*Inverted Repeat Binding Protein*) e PSI (*P element Somatic Inhibitor*). Essas proteínas interagem com 16 dos 31 pb das repetições terminais invertidas, regulando a transposição. Há evidências de que a IRBP está envolvida no reparo das quebras da dupla hélice do DNA, regulando assim o processo de transposição (Rio & Rubin, 1988). A proteína PSI, por sua vez, inibe o processamento do RNAm do terceiro intron do elemento *P* em células somáticas (Adams *et al.*, 1997). Sua baixa concentração em células da linhagem germinativa é responsável pela especificidade tecidual para a produção de transposase.

Quesneville & Anxolabéhère (1998) concluíram que os tipos e os números de cópias dos elementos transponíveis *P* nas diferentes linhagens de *D. melanogaster* refletem o fato de que cada mecanismo tem um impacto diferente na regulação dos diferentes estados de equilíbrio. Os mecanismos de regulação cooperam para estabilizar uma população e, então, induzem ao polimorfismo destes sistemas.

De acordo com Anxolabéhère *et al.* (1989), a análise de populações selvagens de *D. melanogaster* coletadas nos cinco continentes revelou uma diferenciação profunda no sistema P-M. As populações eram todas polimórficas e



todos os indivíduos possuíam elementos *P*, entretanto, suas estruturas e atividades variaram consideravelmente de uma região para outra. Na América do Norte, as populações eram praticamente todas *P* e *Q*. Na África Central também encontravam-se os tipos *P* e *Q*, do Senegal ao Quênia, mas, ao sul da África as linhagens eram do tipo *M'*. Na África do Norte, Europa e Ásia, a distribuição mudava consideravelmente; os tipos *P* e *Q* encontravam-se unicamente nas extremidades do continente eurasiático (França, Japão, litoral chinês) e o restante das populações eram *M'*.

Os estudos moleculares mostraram a existência de um gradiente longitudinal: o número de cópias de elementos *P* decrescia da França para a Ásia Central e também de maneira simétrica da região de Pequim para o interior da China. Na Oceania, os tipos *P* e *Q* eram encontrados nas ilhas e uma variação latitudinal foi encontrada na Austrália, com populações *P* e *Q* ao norte e *M'* ao sul (Anxolabéhère *et al.*, 1990, Boussy, 1987; Boussy & Kidwell, 1987).

Por outro lado, análises de coleções de moscas coletadas antes de 1920 e mantidas em laboratório mostraram que estas linhagens não apresentavam elementos *P*. O elemento *P* mais antigo em *D. melanogaster* foi encontrado em uma linhagem coletada nos anos 50. Na França e na antiga União Soviética, as primeiras fontes contendo esse elemento são do final da década de 60. As últimas linhagens totalmente livres desse elemento provêm de amostras de populações coletadas em meados de 1960, nos Estados Unidos, e em 1974 na União Soviética.

Duas hipóteses principais propiciam uma explicação sobre a relação entre distribuição das linhagens e a idade laboratorial. A primeira, denominada “hipótese da perda estocástica” (Engels, 1989), sugere que esses elementos já estiveram presentes no genoma de *D. melanogaster*, mas foram perdidos rapidamente por deriva ou outros mecanismos. Uma explicação alternativa, a “hipótese da invasão recente” (Kidwell, 1983), propõe que os elementos *P* são uma adição muito recente ao genoma de *D. melanogaster*.

Segundo a hipótese da invasão recente, os elementos *P* foram introduzidos no genoma de *D. melanogaster* por transferência horizontal recente da espécie *D.*



willistoni, que é restrita às América do Sul e Central (Clark & Kidwell, 1995). A sequência de DNA do elemento *P* de *D. willistoni* é idêntica à de *D. melanogaster*, diferindo apenas por uma transição de A para G na posição 32 (Daniels *et al.*, 1990). O mecanismo de transferência horizontal do elemento *P* de *D. willistoni* para *D. melanogaster* é desconhecido, entretanto, alguns organismos têm sido propostos como vetores, tais como, vírus e ácaros, sendo o ácaro *Proctolaelaps regalis* particularmente interessante devido a características morfológicas e comportamentais que facilitariam a transferência (Houck *et al.*, 1991). A invasão das populações européias e dos outros continentes pelos elementos *P* deu-se pelo cruzamento de indivíduos que migraram do continente americano. Os dados de distribuição geográfica são compatíveis com essa hipótese.

Embora a idéia da perda estocástica tenha sido a mais aceita inicialmente pelos drosofilistas, não foi confirmada por estudos teóricos e empíricos. Nenhuma perda consistente de elementos *P* foi observada em estoques de laboratório em um período de dez anos. Ao contrário, quando linhagens P e linhagens M são misturadas, a tendência geral é a população híbrida evoluir em direção ao fenótipo P (Kidwell *et al.*, 1983; Anxolabéhère *et al.*, 1989).

A variação geográfica e temporal das sequências *P* em populações naturais de *D. melanogaster* tem sido amplamente investigada. O levantamento realizado por Anxolabéhère *et al.* (1989) mostrou uma profunda diferenciação na estrutura e na atividade das sequências *P*, de acordo com a localização geográfica. Esses estudos foram realizados com amostras de populações de *Drosophila* da América do Norte, Ásia e Europa, e algumas amostras de populações sul americanas, mantidas em centros de estoques dos Estados Unidos da América. Entretanto, pouco se sabe sobre a distribuição genômica dos elementos *P* nas populações naturais de *D. melanogaster* na América do Sul. Em relação ao elemento *hobo*, as informações disponíveis são mais escassas ainda.

As primeiras informações sobre a distribuição dos fenótipos H-E e P-M, em sete populações brasileiras de *D. melanogaster* foram fornecidas por Vetorazzi (1997) e Vetorazzi *et al.* (1999).



Quanto ao sistema H-E, linhagens de Santa Catarina e do Maranhão foram classificadas como H^+ , pois apresentaram potencial moderado de atividade *hobo* e alto grau de repressão. Linhagens de São Paulo e Minas Gerais apresentaram potenciais de atividade *hobo* baixos e valores altos de repressão, sendo intermediárias entre as linhagens H^+ e H^0 . Por sua vez, linhagens do Rio Grande do Sul, Paraná e Piauí comportaram-se como H^0 , apresentando altos potenciais de repressão, mas baixos potenciais de atividade *hobo*.

Quanto ao sistema P-M, as linhagens provenientes das regiões com clima temperado (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), caracterizadas por estações climáticas bem definidas, e com temperatura média anual entre 16°C e 20°C, apresentaram os menores potenciais de atividade P e foram classificadas como Q e M'. Entretanto, as linhagens provenientes de regiões com temperaturas médias anuais entre 15°C e 35°C, respectivamente, como as coletadas em Minas Gerais e São Paulo e aquelas procedentes de regiões com temperaturas médias anuais entre 25°C e 35°C, como as procedentes do Maranhão e Piauí, onde as temperaturas atingem valores superiores a 40°C, no verão, mostraram o maior potencial de atividade P, tendo sido classificadas como P moderadas.

Tendo em vista a relevância de caracterizar as populações brasileiras de *D. melanogaster* quanto à ocorrência dos elementos transponíveis *P* e *hobo* em seus genomas, neste trabalho, amostras de populações de *Drosophila melanogaster* provenientes de oito regiões brasileiras, foram analisadas com os seguintes objetivos:

- (a) estimar o número de cópias e a integridade dos elementos;
- (b) estabelecer relações entre a distribuição geográfica dos fenótipos P-M e H-E e o número de cópias e a estrutura molecular desses elementos;
- (c) verificar a existência de elementos repressores *KP*, como estratégia para elucidar os principais mecanismos de repressão da transposição das linhagens brasileiras e
- (d) investigar a existência de relações entre o número de cópias dos elementos *hobo* e *P* de cada população.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Material Biológico

Neste trabalho foram estudadas oito linhagens de *Drosophila melanogaster*, procedentes de diferentes regiões geográficas brasileiras, que haviam sido anteriormente classificadas quanto aos sistemas P-M e H-E de disgenesia híbrida (Vetorazzi *et al.*, 1999). A representação gráfica de cada linhagem, procedência, ano de coleta, coletores e respectivos fenótipos dos sistemas P-M e H-E estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de *D. melanogaster* estudadas quanto ao número de cópias e integridade dos elementos transponíveis *hobo* e *P*.

Linha -gens	Procedências	Anos de coleta	Coletores/Instituição	Fenótipos P-M/H-E
MA	São Luís	1995	S.R.P.Martins (UFMA)	P moderada, H ⁺
PI	Teresina	1996	Z.M.da Silva (UNPI)	P moderada, H ⁰
MG	Santana do Riacho	1995	C.R.Vilela (USP, SP)	P moderada, H ⁰
SP	S. J. Rio Preto	1995	C.M.A.Carareto (UNESP/ São José do Rio Preto)	P moderada, H ⁰
PR	Maringá	1996	A.S.Lapenta (UEM)	Q, H ⁰
SC	Joinville	1996	V.C.R.Vetorazzi (URJ)	M', H ⁻
RS ₁	Santa Maria	1999	E.L.S.Loreto (UFSM)	*
RS ₂	Porto Alegre	1995	V.L.S.V.Gaiesky (UFRGS)	Q, H ⁰

*: não classificada fenotipicamente.

As linhagens utilizadas como controles positivos da ocorrência dos elementos *hobo* e *P* são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Linhagens de *D. melanogaster* utilizadas como controles positivos da presença dos elementos transponíveis *hobo* e *P*.

Linhagem	Elemento	Doador/Instituição
23,5/CyL	<i>hobo</i>	I. Boussy (Universidade Loyola, Chigaco, IL, USA)
Harwich	<i>P</i>	M.Kidwell (Universidade do Arizona, Tucson, AZ, USA)
Krasnodar 75	<i>KP</i>	S. Ronsseray (Universidade Paris, França)

B. Metodologia

1. Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico das linhagens foi utilizado o protocolo de Jowett (1986), com modificações. Cerca de 100 indivíduos, coletados dos estoques, foram macerados dentro de tubos *ependorff* mergulhados em nitrogênio líquido. A cada tubo foram acrescentados 700 µL de Tampão de Lise (uréia 7 M; NaCl 350 mM; EDTA 20 mM; n-lauryl sarcosine 1%; SDS 0,5 %) e 4 µL de proteinase K (10mg/mL), os quais, a seguir, foram incubados à temperatura de 60°C, durante 1 hora. Após a incubação foram adicionados 700 µL de Tampão de Extração (Fenol/Tris, pH 7,8) a cada tubo, os quais foram agitados vagarosamente durante 10 minutos e centrifugados a 13.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante produzido em cada tubo foi então coletado e colocado em novo tubo.

O procedimento de extração foi repetido quatro vezes. Na primeira vez acrescentou-se um volume de Tampão de Extração igual ao do sobrenadante. Na segunda e na terceira vez, acrescentou-se meio volume de Tampão de Extração e meio volume de clorofórmio/álcool isoamílico. Na quarta vez acrescentou-se um volume igual ao do sobrenadante de clorofórmio/álcool isoamílico. Após a última

centrifugação, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo novo, acrescentando-se 20% do seu volume de Acetato de Sódio (1M pH 5,2) e dois volumes de álcool etílico a -20°C . Os tubos foram então agitados, mantidos em gelo durante 30 minutos e armazenados à temperatura de -70°C até o dia seguinte. Na manhã seguinte, o DNA foi precipitado por centrifugação (13.000 rpm) durante 15 minutos e desidratado através de três banhos com 300 μL de álcool 70%. Em cada etapa, os tubos foram mantidos 30 minutos a 4°C , sendo a seguir centrifugados durante 5 minutos, a 13.000 rpm. Após a secagem do *pellet* de DNA durante 20 minutos, a 37°C , foram adicionados 30 μL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA, pH 8,0), a cada tubo, que foram mantidos à temperatura ambiente para a eluição do DNA. No dia seguinte, foram adicionados 2 μL de RNase (10mg/mL) e os tubos foram mantidos em banho-maria, a 37°C , durante 1 hora. O DNA eluído foi armazenado à temperatura de -20°C , até o momento da análise.

2. Análise da qualidade do DNA extraído

A análise da integridade do DNA extraído foi realizada através da observação do DNA total em gel de agarose (1% TAE), corado com brometo de etídeo. A análise da adequação do DNA para a técnica de Southern blot foi realizada através da digestão 1 μL deste DNA com 0,5 μL da endonuclease de restrição *Pst I*, durante 2 horas, a 37°C . O produto da digestão foi observado em um gel de agarose (1% TAE), corado com brometo de etídeo.

3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A investigação inicial da presença dos elementos transponíveis *hobo* e *P* no genoma das oito linhagens foi realizada através da reação em cadeia da polimerase. Os oligonucleotídeos *primers* utilizados são apresentados na Tabela 3.



Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos *primers* utilizados para a amplificação dos elementos *hobo* e *P* e de suas posições nucleotídicas.

Elemento	Primer		Posição
<i>hobo</i>	<i>sense</i>	hoboA: 5' CACCTCCAATTTATCCCGCC 3'	651- 670
	<i>antisense</i>	hobo B: 5' GGATGGCAATACGAAGC 3'	1598-1614
<i>P</i>	<i>sense*</i>	829: 5' AACATAAGGTGGTCCCGTCG 3'	12 – 31
	<i>antisense*</i>	830: 5' CGACTGGGCAAAGGAAATCC 3'	757-776
	<i>sense/anti</i>	pM- IR: 5' CATAAGGTGGTCCCGTCG 3'	14-21 e
	<i>sense**</i>		2877- 2888

*Houck *et al.* (1991).

** Haring *et al.* (1995).

Os produtos de amplificação esperados são de 963 pb para a sequência do elemento *hobo*, e de 764 pb e de 2900 pb, respectivamente, para as sequências inicial e completa do elemento *P*.

As reações de amplificação para os elementos *hobo* e *P* foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ L); 2,5 μ L de tampão 10X; 2,0 μ L de solução de dNTPs (10 mM); 1,0 μ L $MgCl_2$ (50 mM); 1,25 μ L de solução dos *primers sense* e *antisense* (5 pmoles/ μ L); 15,9 μ L de água mili-Q autoclavada e 1,0 μ L do DNA genômico (200 ng/ μ L). As misturas foram submetidas a 30 ciclos de PCR, consistindo cada um de 1 minuto de desnaturação, a 94°C; 1 minuto de *annealing* dos *primers*, a 55°C e 3 minutos de extensão dos *primers*, a 72°C.

A reação para a amplificação do elemento *P* completo foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ L); 2,5 μ L de tampão 10X; 2,0 μ L de solução de dNTPs (10mM); 2,5 μ L $MgCl_2$ (50 mM); 2,5 μ L de solução do *primer* M-IR (5 pmoles/ μ L); 15,9 μ L de água mili-Q autoclava

e 1,0 μL do DNA genômico (200 ng/ μL). A mistura foi desnaturada durante 7 minutos, a 94°C e a seguir submetida a 30 ciclos de 45 segundos de desnaturação, a 94°C; 45 segundos de *annealing* dos *primers*, a 57°C; 1 minuto e 20 segundos de extensão dos *primers*, a 72°C e 5 minutos de extensão final, a 72°C.

O DNA amplificado foi utilizado para a investigação da presença dos elementos *hobo* e *P* nas linhagens, como também, para a produção de sondas a serem utilizadas durante as análises de *Southern*.

4. Transformação e clonagem da bactéria DH5 α para multiplicação dos plasmídeos pHX4 e p π 25.1.

Os plasmídeos pHX4 e p π 25.1 foram utilizados como vetores das seqüências dos elementos transponíveis *hobo* e *P*, respectivamente.

O plasmídeo pHX4 contém o fragmento de 2,6 Kb obtido pela digestão do elemento *hobo* completo com a endonuclease de restrição *Xho I* e subclonado no plasmídeo Bluescript, que possui 2,96 Kb e um sítio para a endonuclease de restrição *Xho I* (Loreto, 1997).

O plasmídeo p π 25.1 é originado do plasmídeo pBR322, que possui 4360 pb e sítios para endonucleases de restrição, onde foi inserido o elemento P completo de *D. melanogaster* no sítio *Bam HI* (O'Hare & Rubin, 1982).

Para a transformação (Sambrook *et al.*, 1989), foi preparada uma placa com meio LB sólido (1% de triptônio, 0,5 % de extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,5% ágar) e cepas da linhagem DH5 α de *Escherichia coli*. As placas foram mantidas a 37°C, durante 15 horas, para o crescimento das colônias.

Foram preparados tubos com os plasmídeos pHX4 e p π 25.1. Em um tubo com 600 μL de tampão TFB (KCl 100 mM; MnCl₂.4H₂O 45 mM; CaCl₂.2 H₂O 10 mM; HAcOCl₃ 3 mM e Mes 10mM, pH 6,3), mantido em gelo, foram adicionadas colônias de bactérias da placa preparada no dia anterior. Após a homogeneização das colônias

no tampão, o tubo foi mantido em repouso durante 20 minutos. A seguir, 200 μL de seu conteúdo foi colocado em dois tubos: em um deles foram acrescentados 2 μL do plasmídeo pHX4, e no outro, 2 μL do plasmídeo p π 25.1. Estes tubos foram, então, incubados em gelo durante 15 minutos.

Após a incubação para a transformação de bactérias, os tubos receberam um choque térmico durante 90 segundos, a 42°C, sendo, a seguir, mantidos em gelo durante 5 minutos. Na sequência, foram adicionados aos tubos 800 μL de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, com a adição de Mg^{+2} 20 mM, e glicose à concentração de 20 mM, no momento da utilização), os quais foram mantidos sob agitação moderada durante 60 minutos, a 37°C, para a regeneração das células. A seguir, os tubos foram centrifugados à velocidade de 4.000 rpm, durante 2 minutos.

Ao tubo com os 200 μL restantes do tampão TFB com bactérias foram acrescentados 3 μL de água mili-Q autoclavada. Este tubo foi utilizado como controle negativo da reação de transformação.

Os *pellets* obtidos de cada tubo após a centrifugação foram ressuspensos e as células foram espalhadas em três placas de Petri com meio LB sólido: uma placa controle, onde foram aplicados 100 μL do conteúdo do tubo controle negativo (apenas células bacterianas), e duas placas, onde foram aplicados 50 μL e 150 μL , respectivamente, do conteúdo do tubo contendo as células transformadas com o plasmídeo de interesse. Às placas com as células transformadas, adicionou-se ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram, então, mantidas a 37°C, para o crescimento das colônias bacterianas.

Após o crescimento, uma única colônia de bactérias foi transferida para 2 mL de meio LB líquido (1% de triptônio, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) contendo ampicilina à concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A pré-cultura foi incubada durante 10 horas, a 37°C, sob agitação vigorosa. Após o período de incubação, 500 μL da pré-cultura foram colocados em 50 mL de meio LB líquido com a mesma



concentração de ampicilina e novamente incubados a 37°C, durante 4 horas. A seguir, foram acrescentados 50 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de clorafenicol, mantendo-se a cultura em incubação, durante 8 horas, a 37°C.

Os plasmídeos foram extraídos através do kit Flexi Prep (Amersham Pharmacia Biotech do BrasilTM), segundo as recomendações do fabricante. A integridade dos plasmídeos e o sucesso da transformação foram avaliados através da digestão dos plasmídeos pHX4 e p π 25.1, respectivamente, com as endonucleases de restrição *Xho I* e *Bam HI*.

Da digestão do plasmídeo pHX4 espera-se a produção de dois fragmentos: um com 2,96 Kb correspondente ao plasmídeo Bluescript, e outro com 2,6 Kb correspondente ao elemento *hobo* presente no inserto.

Da digestão do plasmídeo p π 25.1 espera-se a produção de dois fragmentos: um com 4,4 Kb, correspondente ao pBR322, e outro com 4,7 Kb, correspondente ao fragmento de 2,9 Kb do elemento *P* completo, e cerca de 1,8 Kb de DNA flanqueador proveniente do cromossomo X de *D. melanogaster*, de onde foi extraído o elemento *P* contido no plasmídeo p π 25.1.

5. Hibridização em membrana

A averiguação dos números de cópias e da integridade das seqüências dos elementos *hobo* e *P* foi realizada através do método de *Southern* (Sambrook *et al.*, 1989). Para isto, foi utilizado o sistema de hibridização quimioluminescente ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech do BrasilTM), cujas etapas são descritas abaixo.



a. Digestão enzimática do DNA genômico das linhagens

O DNA genômico extraído foi digerido durante 15 horas , aproximadamente, com endonucleases de restrição que possuem sítios nos elementos estudados. Estes sítios estão ilustrados na Figura 1.

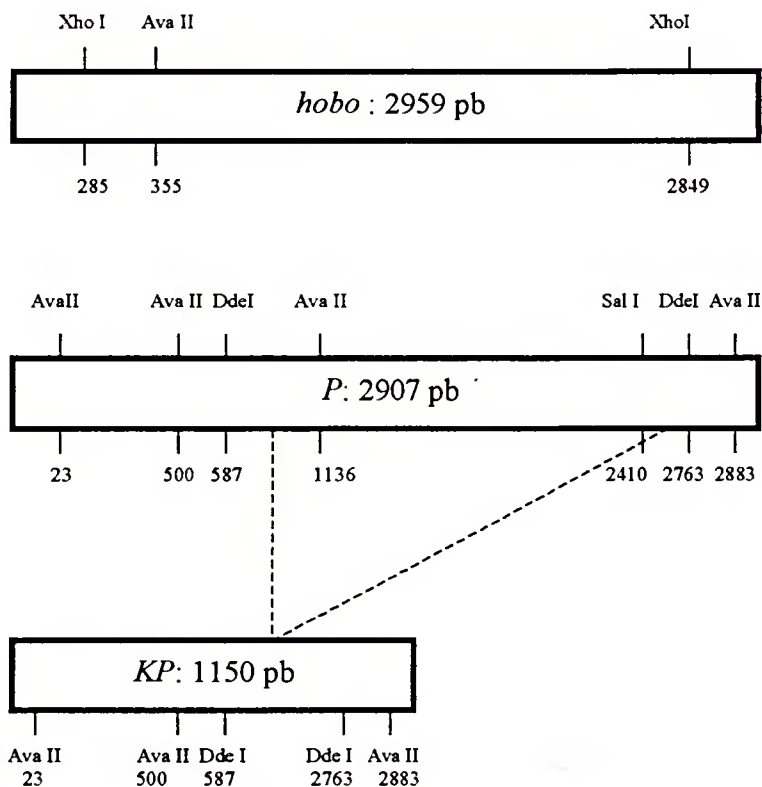


Figura 1. Representação esquemática da localização dos sítios das endonucleases de restrição utilizadas no estudo dos elementos *hobo*, *P* completo e do elemento *KP* (área pontilhada corresponde à deleção de 1752 pb, compreendida entre as posições 808 e 2560).

a₁. Elemento *hobo*

Estimativa do número de cópias: utilizou-se a endonuclease *Ava II*, que reconhece apenas um sítio de restrição na sequência *hobo* (posição 355). Dessa maneira, são produzidos fragmentos de tamanhos variáveis, definidos à direita pelo sítio *Ava II* da sequência *hobo* e, à esquerda, pelo primeiro sítio *Ava II* do DNA genômico. Portanto, a cada inserção genômica desse elemento corresponde um fragmento de tamanho específico, o que possibilita estimar o número de inserções diferentes no genoma das linhagens.

Análise da integridade: utilizou-se a endonuclease *Xho I*, que reconhece dois sítios de restrição ao longo da sequência *hobo* (posições 285 e 2849), e produz um fragmento interno de 2564 pb, que abrange praticamente toda a extensão do elemento completo.

a₂. Elemento *P*

Estimativa do número de cópias: utilizou-se a endonuclease *Sal I*, o que reconhece apenas um sítio na sequência *P*, à direita, na posição 2410 e, à esquerda, no primeiro sítio *Sal I* no DNA genômico, produzindo fragmentos de tamanho variáveis, correspondentes a cada inserção genômica.

Análise da integridade: utilizou-se a endonuclease *Ava II*, que reconhece quatro sítios de restrição ao longo da sequência *P* (posições 23, 500, 1136 e 2883), e gera fragmentos internos de 478 pb, 544 pb e 1883 pb, que abrangem praticamente toda a extensão de um elemento completo.

Presença do elemento *KP*: utilizou-se a endonuclease *Dde I*, que no elemento completo reconhece dois sítios (posições 587 e 2763), e gera um fragmento interno de

2,2 kb. Como o *KP* é derivado do elemento *P* completo, em decorrência de uma deleção entre as posições 808 e 2560, a digestão com a enzima *Dde I* gera um fragmento interno de apenas 422 pb.

b. Sondas

Foram utilizadas como sondas, sequências dos elementos *hobo* e *P*, amplificadas respectivamente dos plasmídeos pHX4 e p π 25.1 (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências amplificadas dos plasmídeos utilizadas como sonda para a análise do número de cópias e da integridade dos elementos transponíveis *hobo* e *P*.

Elemento	Sonda		Tamanho
<i>hobo</i>	Número de cópias	sequência do plasmídeo pHX4	963 pb
	Integridade	sequência do plasmídeo pHX4	963 pb
<i>P</i>	Número de cópias	sequência do plasmídeo p π 25.1	764 pb
	Integridade	sequência do plasmídeo p π 25.1	2,9 kb

Os amplificados foram purificados através do Kit ConcertTM Rapid PCR Purification System (Life Technologies Gibco BRL), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a averiguação da existência de elementos *KP*, utilizou-se como sonda um fragmento de 896 pb obtido da digestão do plasmídeo p π 25.1 com a endonuclease *Puv II*. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1 %, e a banda correspondente ao fragmento *Puv II* foi extraída através do kit Concert Rapid GelTM – Extraction System (Life Technologies Gibco BRL).

c. Análise de *Southern*

Cerca de 12 µg do DNA genômico das linhagens, digeridos durante 15 horas, aproximadamente, com as endonucleases de restrição apropriadas, foram aplicados em gel de agarose 1% com tampão TAE. O gel foi tratado com HCl 250 mM para a retirada das purinas e desnaturado com uma solução de NaCl 1,5 M e Tris HCl 0,5 M, pH 7,5, à temperatura ambiente, conforme as instruções do fabricante do sistema ECL.

A transferência do DNA do gel para a membrana de náilon (Hybond N⁺ Amersham Pharmacia Biotech do BrasilTM) foi realizada em recipiente de vidro com 20xSSC (Na₃ citrato 0,3M e NaCl 3M), durante 15 horas. Em seguida, a membrana foi lavada em 6xSSC e o DNA foi fixado sob luz ultravioleta.

O DNA fixado na membrana foi pré-hibridizado durante 1 hora, a 42°C, com tampão de hibridização ECL e, a seguir, hibridizado com a sonda apropriada durante 12 horas, a 42°C. Para cada mL de tampão foi utilizado 1 ng da sonda marcada. Após a hibridização, foram realizados dois banhos de 20 minutos com Tampão Primário (uréia 6 M; 0,4% de SDS e 0,5xSSC), a 42°C, e dois banhos de 5 minutos, com Tampão Secundário (2xSSC), à temperatura ambiente.

Para a detecção da hibridização, a membrana foi banhada em volumes iguais dos reagentes de detecção ECL 1 e 2 e, a seguir, exposta ao filme autorradiográfico (Hyperfilm-ECL), durante 30 minutos a 1 hora. A revelação e a fixação do filme foi realizada com os produtos Kodak KGBX Developer and Replenisher e Kodak KGBX Fixer and Replenisher, de acordo com as orientações do fabricante.

6. Análises Estatísticas

As linhagens foram comparadas quanto aos números de cópias dos elementos *hobo* e *P*. Para isto, foram considerados dois grupos: linhagens de clima tropical (Maranhão, Piauí e São Paulo) e linhagens de clima temperado (região serrana de



Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e do Rio Grande do Sul). A linhagem proveniente de Minas Gerais foi agrupada dentre as linhagens de clima temperado, desde que é procedente de uma região serrana de Minas Gerais (Serra do Cipó), com temperatura média anual de 22°C. As frequências dos números de cópias das linhagens agrupadas foram comparadas através do teste *t* de Student com $p \leq 0,01$.

Foram, ainda, realizadas análises de correlação e construídos gráficos de dispersão do número de cópias dos elementos *hobo* e *P* de cada linhagem contra a latitude da região onde foi coletada. Foram realizadas também análises de correlação entre o número de cópias dos elementos *hobo* e dos elementos *P* em cada linhagem.



III. RESULTADOS

Neste trabalho foram realizadas análises moleculares para a averiguação da ocorrência, da integridade e do número de cópias dos elementos transponíveis *hobo* e *P* em oito populações brasileiras de *D. melanogaster*.

1. Transformação de *Escherichia coli* e Produção de Sondas

Na Figura 2 são apresentados os resultados da transformação da bactéria *E. coli*, linhagem DH5 α , com os plasmídeos p π 25.1 e pHX4. Na coluna 1 do gel encontra-se o DNA marcador 1Kb (396 pb a 12216 pb). Observa-se na terceira coluna o produto de uma digestão incompleta do plasmídeo e, na quarta, os fragmentos de 4,7 Kb e 4,4 kb, esperados da digestão completa do plasmídeo p π 25.1 com a endonuclease de restrição *Bam* HI. Nas colunas 5 e 6 são observados os fragmentos de 2,96 Kb e 2,6 Kb, esperados da digestão do plasmídeo pHX4 com a endonuclease de restrição *Xho* I.

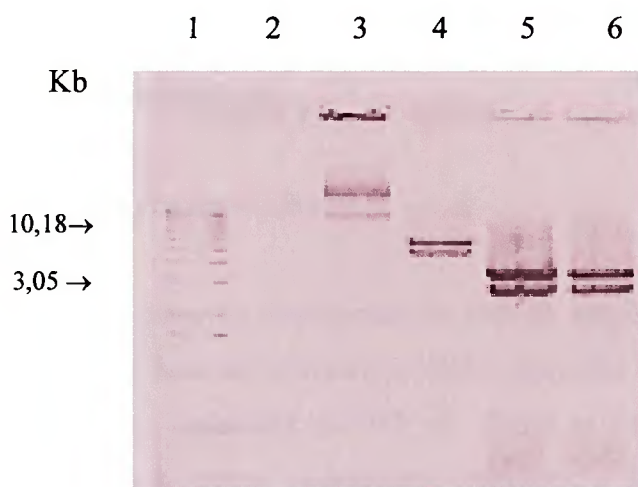


Figura 2. Produto da digestão dos plasmídeos p π 25.1 e pHX4, extraídos da linhagem DH5 α de *E. coli*, com as endonucleases de restrição *Bam* *H*I e *Xho* *I*, respectivamente. Colunas 1: DNA marcador 1 Kb; 3 e 4: digestão parcial e completa de p π 25.1, respectivamente; 5 e 6: digestão completa de pHX4.

2. Análises moleculares dos elementos transponíveis

Todas as amostras foram aplicadas nos géis para as análises moleculares segundo o gradiente latitudinal da origem geográfica das linhagens: MA, PI, MG, SP, PR, SC, RS₁ e RS₂.

A. Elemento transponível *hobo*

a. Ocorrência e número de cópias

A Figura 3 mostra os fragmentos de 963 pb amplificados da sequência *hobo*. Na primeira coluna encontra-se o DNA marcador 1 Kb e nas demais observam-se as bandas esperadas de 963 pb. Todas as linhagens apresentaram alguns fragmentos com pesos moleculares inferiores a 963 pb, indicando a presença de deleções internas nessa região do elemento *hobo*.

Para a análise do número de cópias, o DNA genômico foi digerido com a endonuclease de restrição *Ava II* e hibridado como amplificado de 963 pb da sequência *hobo* do plasmídeo pHX4 (Figura 4). A variação foi de 13 (linhagem do Maranhão) a 28 (linhagem de Porto Alegre, RS₂) cópias, sendo o número médio igual a $22,13 \pm 4,52$ cópias. Os números de cópias estimados para as demais linhagens foram: PI = 26; MG = 20; SP = 22; PR = 24; SC = 21 e RS₁ = 23. Na Figura 5 está esquematizado o padrão de bandas de cada linhagem.

b. Integridade

Todas as linhagens apresentaram o fragmento de 2564 pb esperado da digestão de um elemento *hobo* completo com a endonuclease de restrição *Xho I*, além de fragmentos menores, resultantes de deleções internas. Observa-se também um elemento deletado comum a todas as linhagens, com aproximadamente 1,0 Kb (Figura 6). A Figura 7 apresenta de forma esquematizada os padrões de bandamento de cada linhagem.

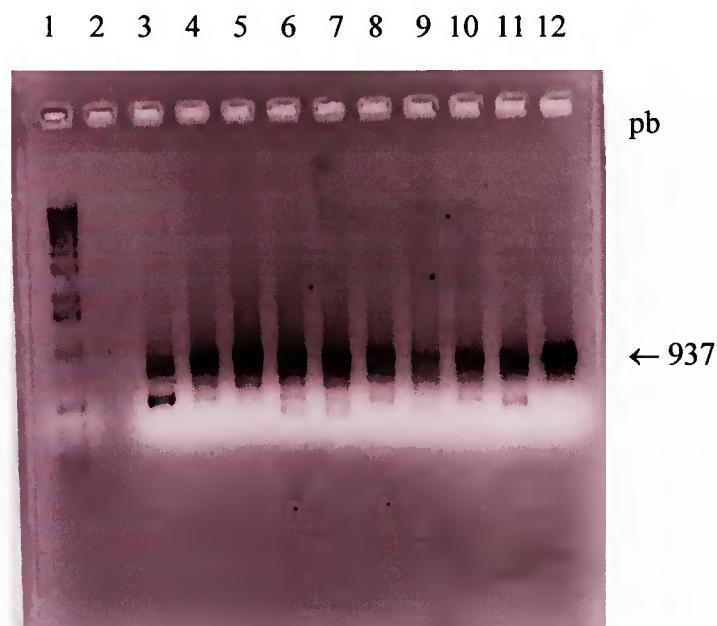


Figura 3. Amplificado de 936 pb da sequência *hobo* (Colunas 1: DNA marcador 1 Kb; 3: MA; 4: PI; 5: MG; 6: SP; 7: PR; 8: SC; 9: RS₁; 10: RS₂; 11: linhagem-referência 23,5/Cyl e 12: controle positivo, plasmídeo pHX4).

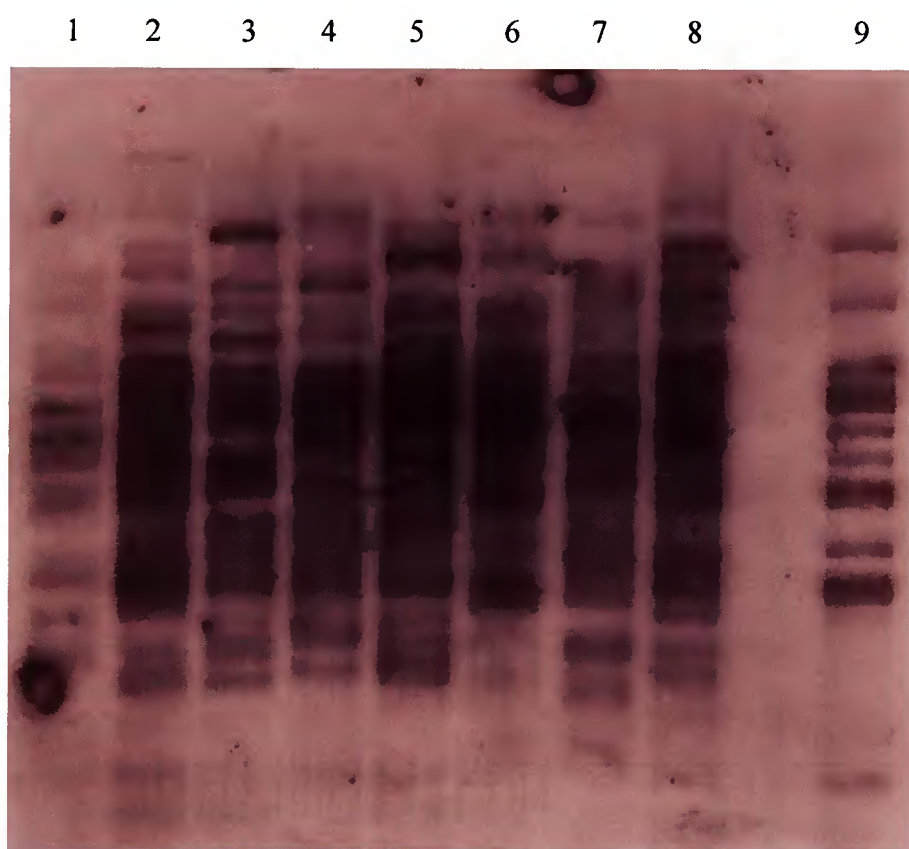


Figura 4. *Southern blot* do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Ava II* e hibridizado com o amplificado de 937 pb da sequência *hobo* contida no plasmídeo pHX4 (Colunas 1: MA; 2: PI; 3: MG; 4: SP; 5: PR; 6: SC; 7: RS₁; 8: RS₂ e 9: linhagem Harwich-w).

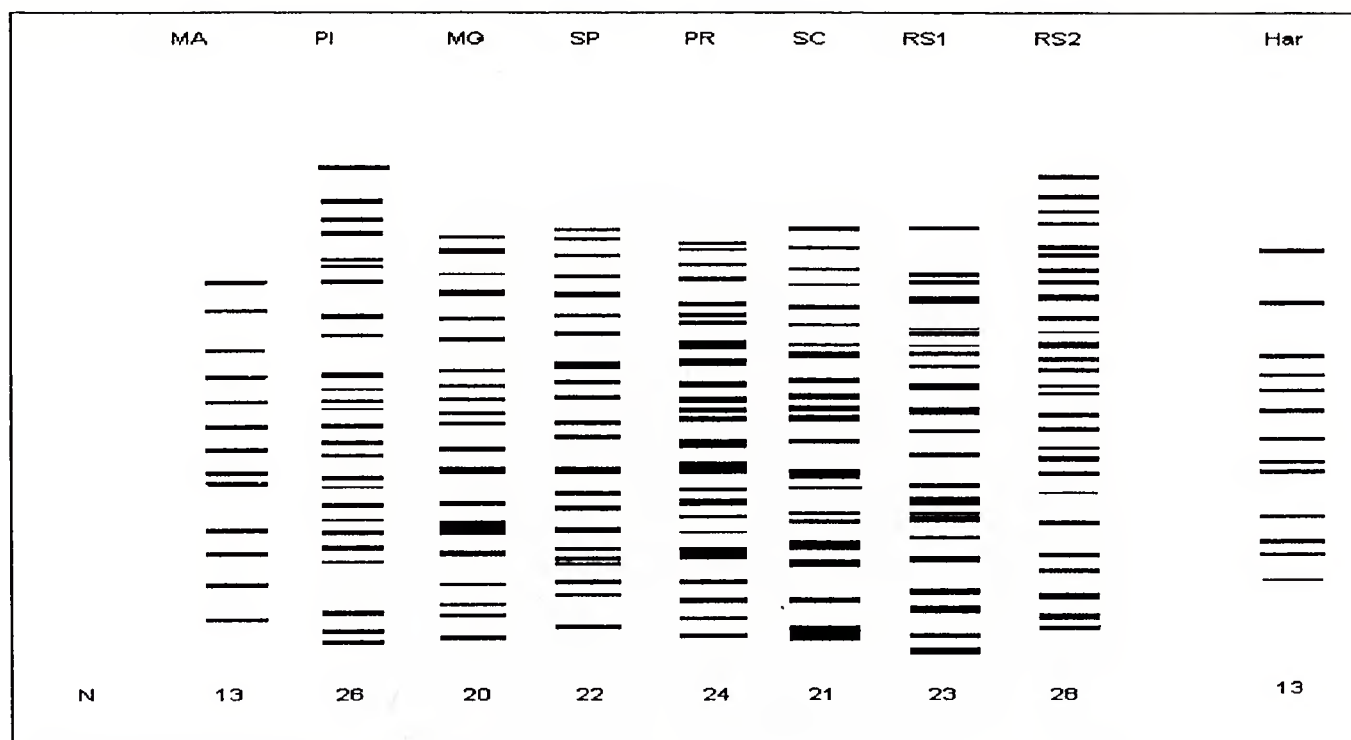


Figura 5. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Ava II*, e hibridizado com o amplificado de 937 pb da sequência *hobo* contida no plasmídeo pHX4 (N: número de bandas).

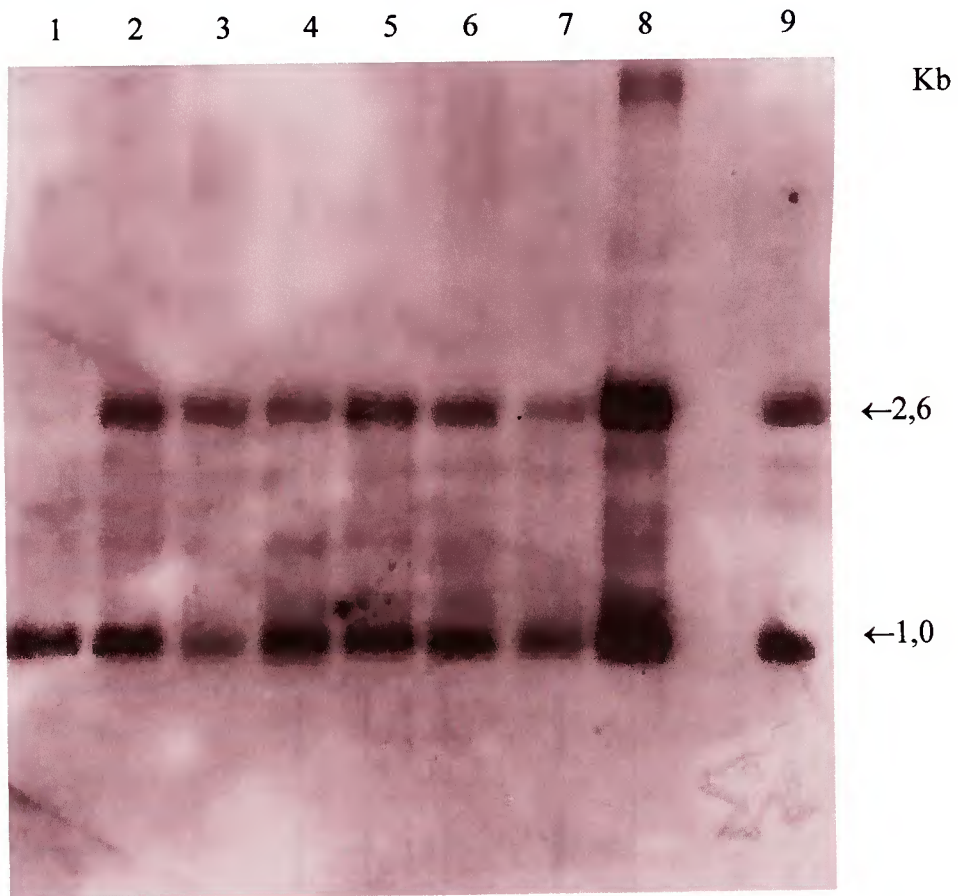


Figura 6. *Southern blot* do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Xho I*, e hibridizado com o amplificado de 937 pb da sequência *hobo* contida no plasmídeo pHX4 (Colunas 1: MA; 2: PI; 3: MG; 4: SP; 5: PR; 6: SC; 7: RS₁; 8: RS₂ e 9: linhagem-referência 23,5/CyL).

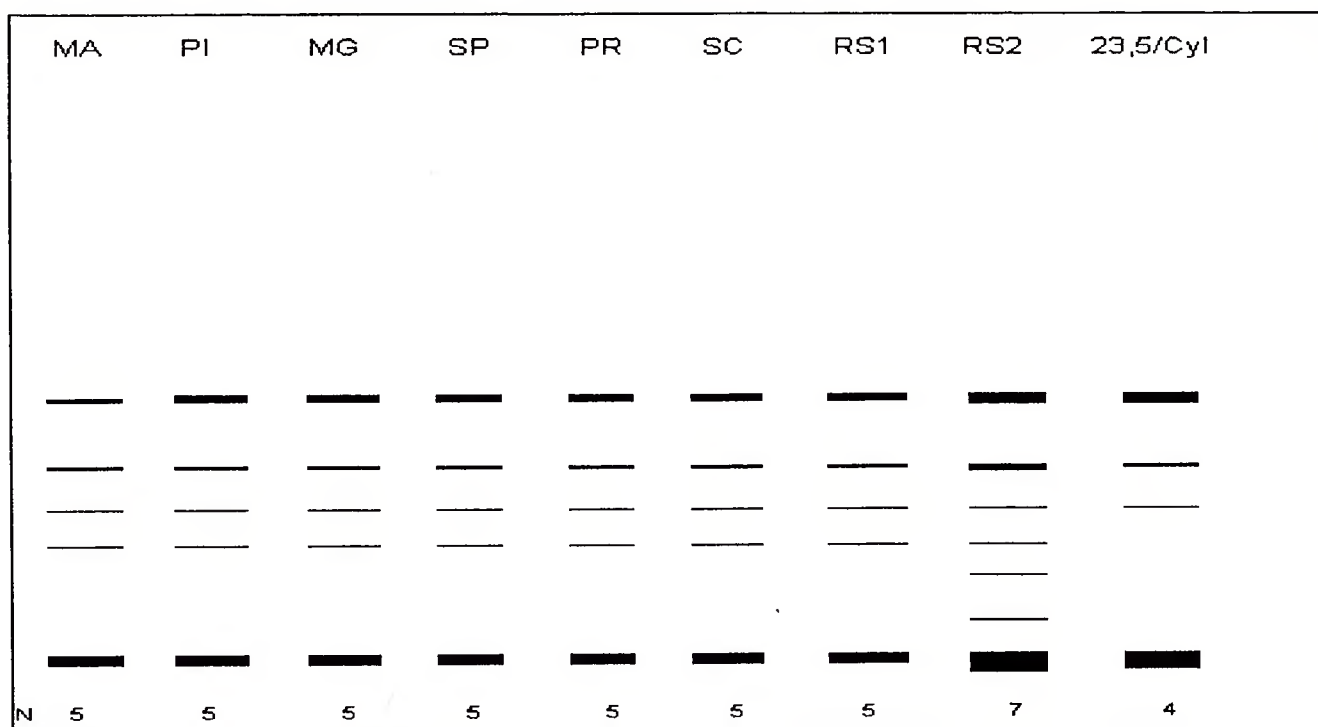


Figura 7. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Xho I*, e hibridizado com o amplificado de 937 pb da sequência *hobo* contida no plasmídeo pHX4 (N: número de bandas).

B. Elemento transponível *P*

a. Ocorrência e número de cópias

Para a verificação da ocorrência dos elementos *P* nas populações de *D. melanogaster* foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase.

A Figura 8 mostra as seqüências do elemento *P* amplificadas com os oligonucleotídeos *primers* #829 e #830. Na primeira coluna encontra-se o DNA marcador 1 Kb, nas demais colunas observam-se as bandas esperadas.

A Figura 9 mostra as seqüências amplificadas do elemento *P* com o oligonucleotídeo *primer* pM-IR. Na primeira coluna encontra-se o DNA marcador 1 Kb. Todas as linhagens apresentaram um fragmento de aproximadamente 1150 pb, mas não o fragmento de 2,9 Kb esperado a partir da amplificação do elemento *P* completo. Também a linhagem Krasnodar 75, na qual o elemento *KP* foi inicialmente identificado, e, portanto, utilizada como controle positivo da ocorrência deste elemento, apresentou o fragmento de 1150 pb, mas não o de 2,9 Kb.

Para a análise do número de cópias do elemento transponível *P*, o DNA digerido genômico foi digerido com a endonuclease de restrição *Sal I* e hibridizado com o amplificado de 764 pb da seqüência *P* do plasmídeo p π 25.1 (Figura 10). A variação foi de 9 (linhagem do Maranhão) a 15 (linhagem de Porto Alegre, RS₂) cópias, sendo o número médio igual a $13,75 \pm 3,15$ cópias. Os números de cópias estimados para as demais linhagens foram: PI = 12; MG = 19; SP = 11; PR = 15; SC = 13 e RS₁ = 16. Na Figura 11 está esquematizado o padrão de bandas de cada linhagem.

b. Integridade

Para a análise da integridade do elemento *P*, os DNAs das oito linhagens foram digeridos com a endonuclease de restrição *Ava II* e hibridizados com o amplificado de 2,9 Kb do plasmídeo p π 25.1 (Figura 12).



A linhagem controle Harwich-w apresentou os três fragmentos esperados (1,8 Kb; 0,54 Kb e 0,47 Kb), além de outros fragmentos. Todas as linhagens brasileiras apresentaram o fragmento correspondente a 1,8 Kb, e dentre elas, as linhagens MA, PI, SC, RS₁ e RS₂ apresentaram os de 0,63 e 0,48 Kb, que correspondem aos dois fragmentos gerados pela digestão do elemento *KP* com a endonuclease de restrição *Ava II*. As linhagens MG, SP e PR apresentaram três fragmentos (0,63 Kb, 0,54 Kb e 0,48 Kb), o que indica a presença do elemento deletado *KP* e do elemento completo.

A Figura 13 apresenta de forma esquematizada os padrões de bandamento observados no *blot*.

c. Elemento *KP*

Para a análise da existência do elemento deletado *KP*, o DNA genômico foi digerido com a endonuclease de restrição *Dde I* e hibridizado com um fragmento do elemento *P* de 896 pb, obtido da digestão do plasmídeo p π 25.1 com a endonuclease *Puv II* (Figura 14).

A linhagem controle Harwich-w, que possui o elemento *P* completo, apresentou o fragmento correspondente a 2,2 Kb, que indica a presença do elemento completo. As demais linhagens apresentaram o fragmento correspondente a 2,2 Kb, mas também um fragmento de 422 pb, correspondente ao produto de digestão do elemento *KP*. A linhagem controle para *KP*, Krasnodar 75, também apresentou este fragmento. Além destes, todas as linhagens apresentaram outros fragmentos com tamanhos variáveis.

A Figura 15 apresenta de forma esquematizada os padrões de bandamento observados no *blot*.



d. Comparação dos resultados moleculares com a classificação fenotípica de Vetorazzi *et al.* (1999).

A Tabela 5 apresenta a comparação dos resultados das análises moleculares realizadas neste trabalho e das análises fenotípicas relatadas por Vetorazzi *et al.* (1999). São apresentados os índices de disgenesia gonadal, a intensidade das bandas relativas aos números de elementos *P* completos e *KP*, obtidos pela análise de *Southern* (Figura 14 e 15), o número total de cópias de inserções *P* (Figura 10 e 11) e o número de elementos deletados, excluindo-se o elemento *KP*, obtidos através da análise da integridade dos elementos *P* (Figura 12 e 13).



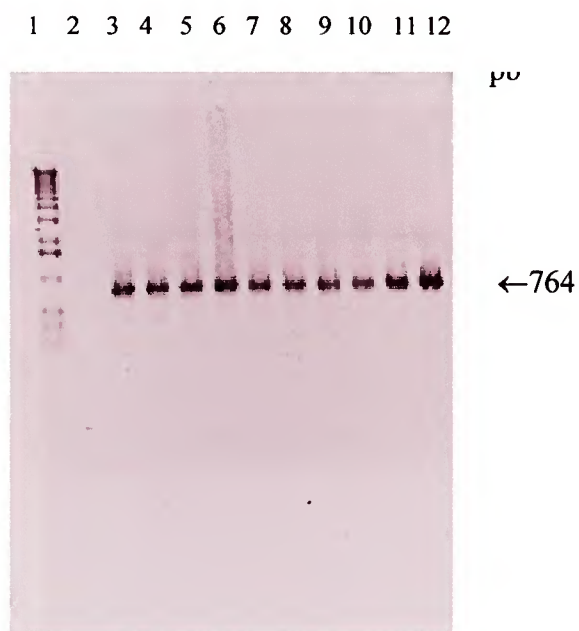


Figura 8. Amplificado de 764 pb de seqüências *P* (Colunas: 1 :DNA marcador 1 Kb; 3: MA; 4: PI; 5: MG; 6: SP; 7: PR; 8: SC; 9: RS₁; 10: RS₂; 11: linhagem-referência Harwich-w e 12: controle positivo, plasmídeo p π 25.1).

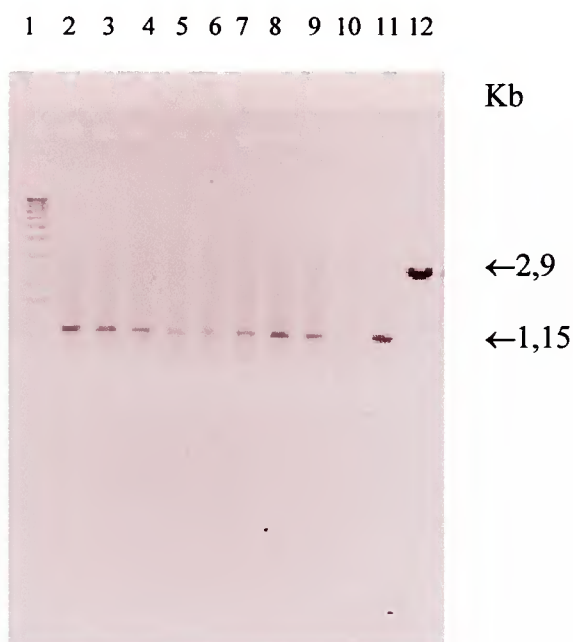


Figura 9. Amplificado de 1.150 pb das prováveis seqüências *KP* (Colunas 1: DNA marcador 1 Kb; 2: MA; 3: PI; 4: MG; 5: SP; 6: PR; 7: SC; 8: RS₁; 9: RS₂; 10: linhagem-referência para o elemento *P* completo Harwich-w; 11: linhagem-referência para o elemento *KP* Krasnodar 75 e 12: controle positivo, plasmídeo p π 25.1.

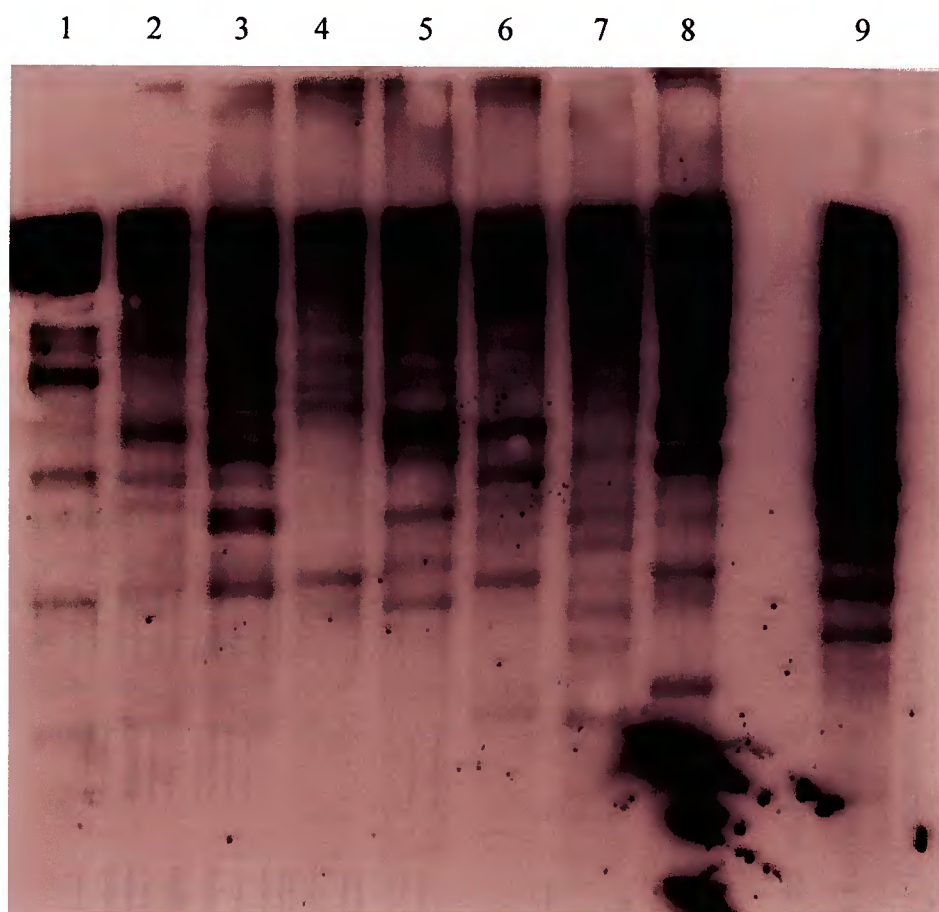


Figura 10. *Southern blot* do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Sal I*, e hibridizado com a sonda de 764 pb da sequência *P* contida no plasmídeo p π 25.1 (Colunas 1: MA; 2: PI; 3: MG; 4: SP; 5: PR; 6: SC; 7: RS₁; 8: RS₂ e 9: linhagem-referência Harwich-w).

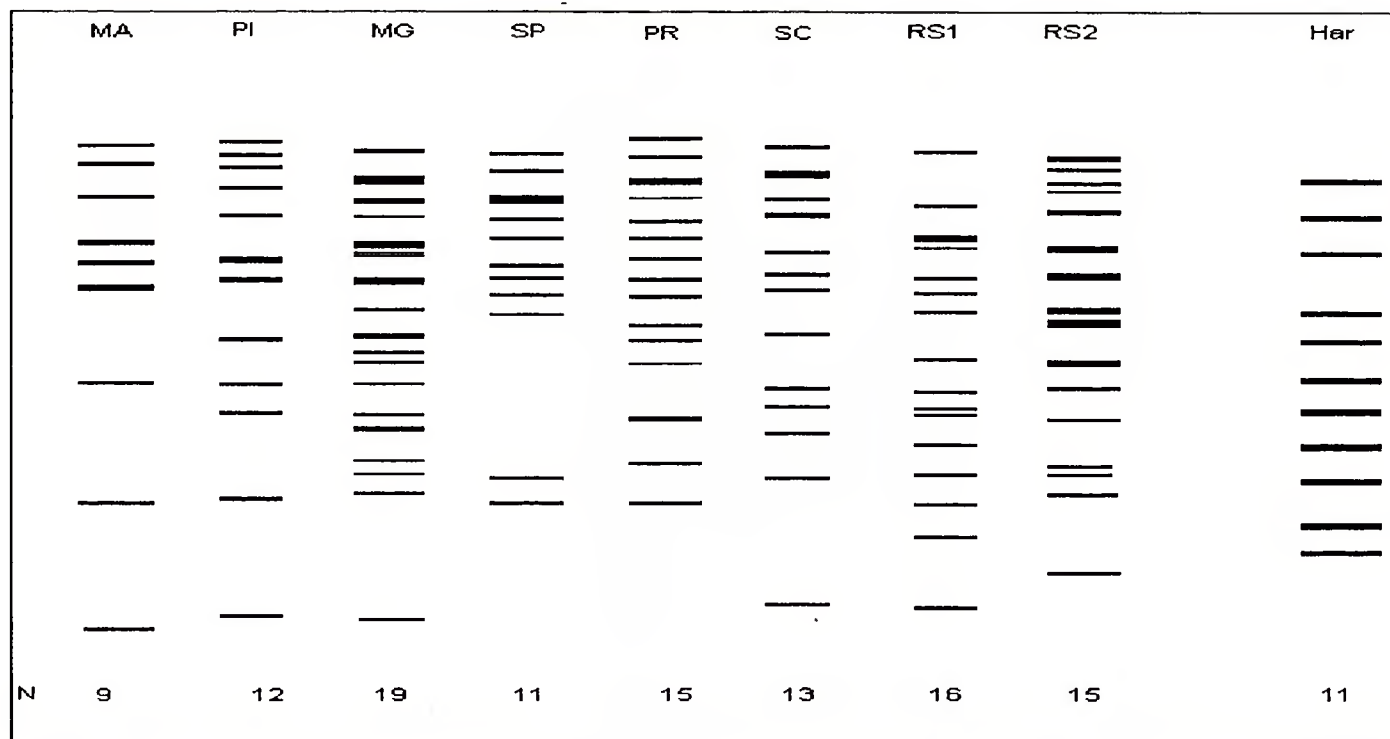


Figura 11. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Sal I* e hibridizado com o amplificado de 764 pb da sequência *P* contida no plasmídeo p π 25.1 (N: número de bandas).

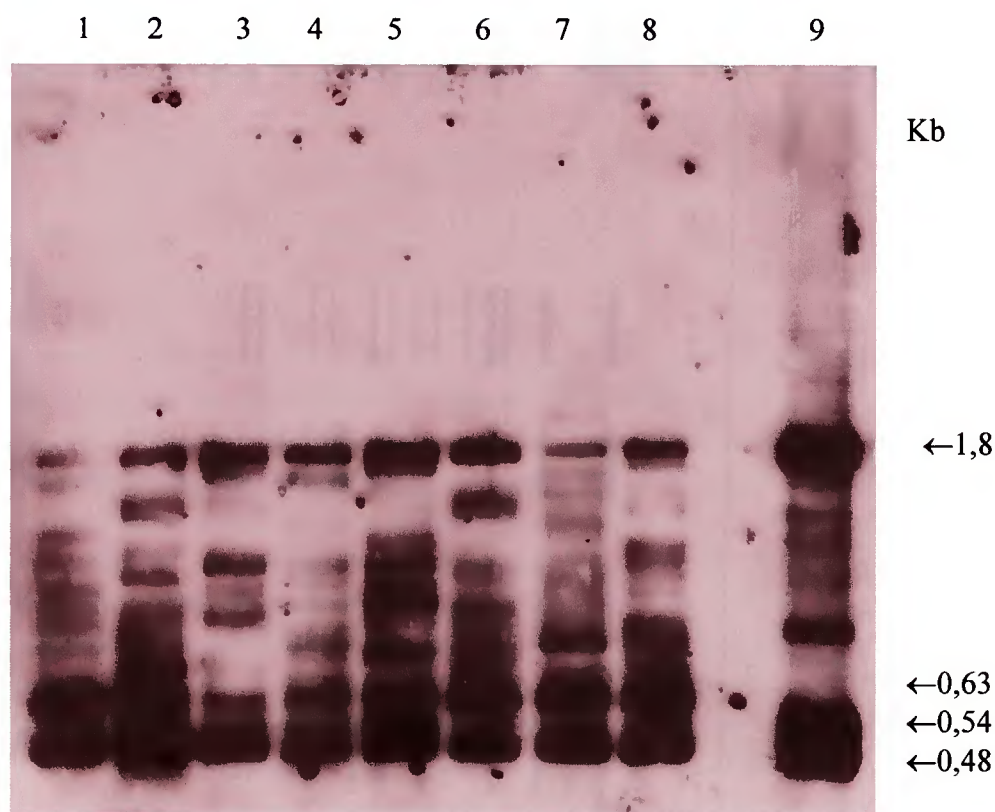


Figura 12. *Southern blot* do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Ava II*, e hibridizado com o amplificado de 2,9 Kb da sequência *P* contida no plasmídeo $\pi\pi 25.1$ (Colunas 1: MA; 2: PI; 3: MG; 4: SP; 5: PR; 6: SC; 7: RS₁; 8: RS₂ e 9: linhagem-referência Harwich-w).

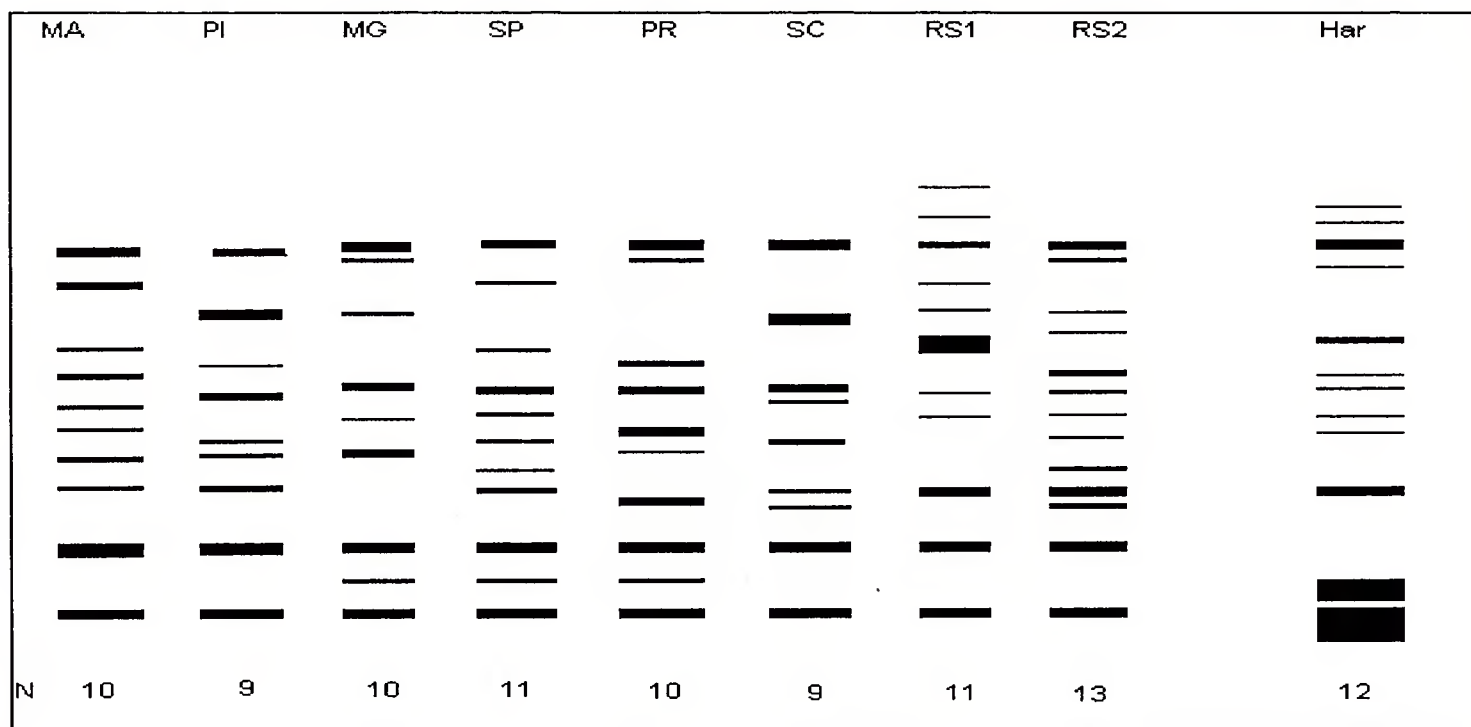


Figura 13. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Ava II* e hibridizado com o amplificado de 2,9 Kb da sequência *P* contida no plasmídeo p π 25.1 (N: número de bandas).

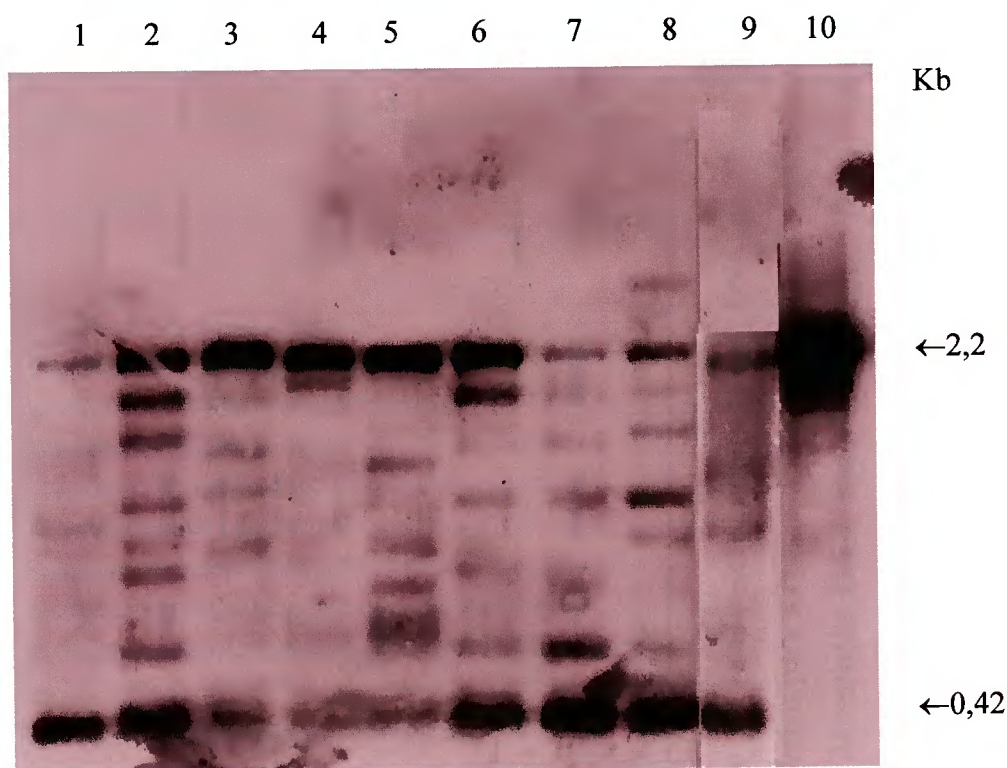


Figura 14. *Southern blot* do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a endonuclease de restrição *Dde I*, e hibridizado com a sequência de 896 pb do elemento *P*, produto da digestão do plasmídeo $\pi\tau 25.1$ com a endonuclease de restrição *Puv II* (Colunas 1: MA; 2: PI; 3: MG; 4: SP; 5: PR; 6: SC; 7: RS₁; 8: RS₂; 9: controle positivo Krasnodar 75; 10: controle negativo Harwich-w).

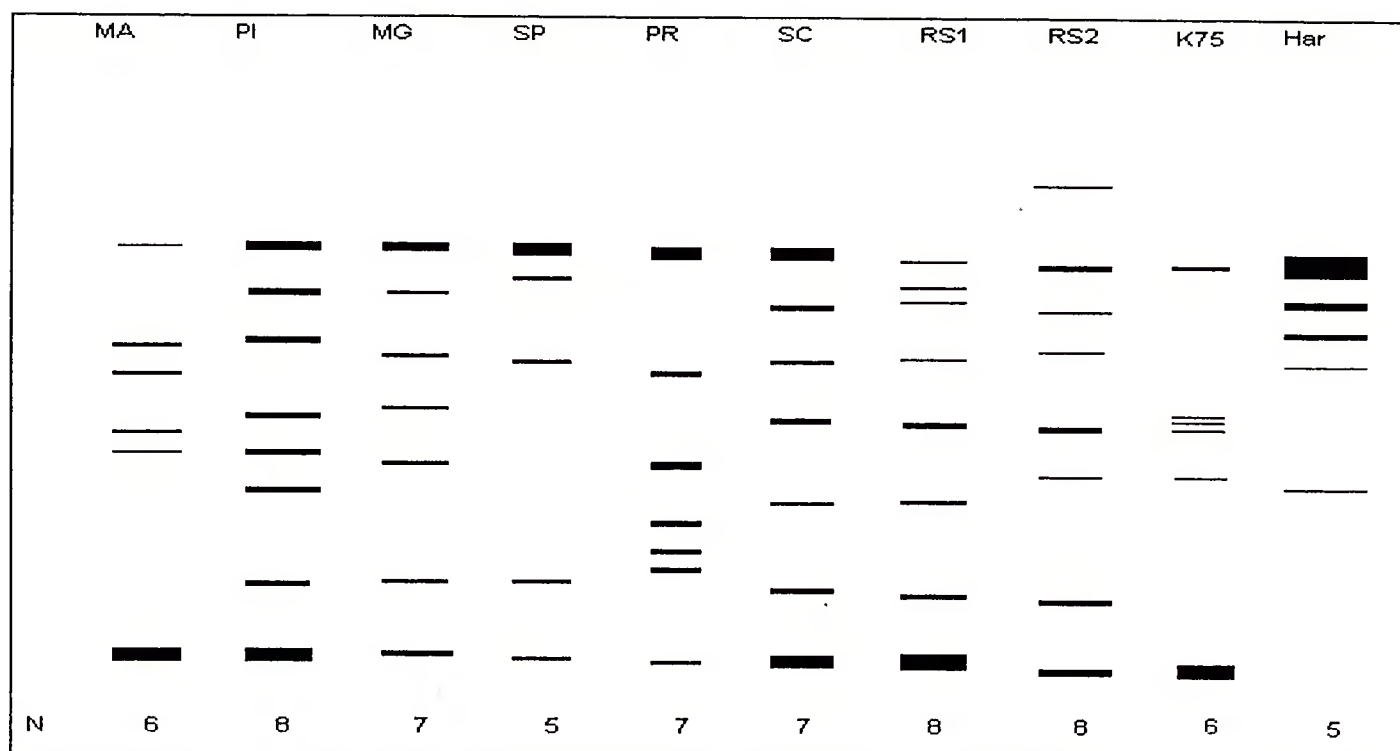


Figura 15. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das oito linhagens de *D. melanogaster*, da linhagem controle positivo para *KP*: Krasnodar 75 e controle positivo para o elemento *P* completo: Harwich, digerido com a endonuclease de restrição *Dde I*, e hibridizado com o fragmento de 896 pb da sequência *P*, obtido da digestão do plasmídeo p π 25.1 com a enzima de restrição *Puv II* (N: número de bandas).

Tabela 5. Índices de disgenesia gonadal (DG¹), fenótipos do sistema P-M, intensidade das bandas de 2,2 Kb e 0,42 Kb, resultantes da digestão de elementos *P* completos ou *KP* com a endonuclease de restrição *Dde I* e números de elementos *P* deletados e total.

Linha gens	DG ¹ (%)		Fenótipos P-M *	Bandas		Nº de elementos	
	A	A*		<i>P</i>	<i>KP</i>	deletados	total
MA	20,00	8,33	P	+	+++	8	9
PI	10,17	10,83	P	+++	+++	7	12
MG	14,16	1,66	P	+++	++	6	19
SP	19,29	0,83	P	+++	+	8	11
PR	9,16	6,00	Q	+++	+	7	15
SC	0,89	11,66	M'	+	++	7	13
RS ₁	-----	-----	-	+	+++	7	16
RS ₂	5,83	2,50	Q	+	+++	11	15

Intensidade de banda: +: fraca; ++: intermediária; +++: forte.

¹ de acordo com Vettorazzi *et al.* (1999).

3. Análises Estatísticas

a. Associações entre o número de cópias dos elementos transponíveis e a temperatura média anual do local de coleta das linhagens.

a₁. Elemento *hobo*

Tendo em vista que dentre os fatores ambientais que estimulam a disgenesia híbrida a temperatura é um dos mais importantes, foram comparados os números de cópias das linhagens de clima tropical e de clima temperado.

As linhagens de clima tropical apresentaram $20,33 \pm 6,66$ como número médio de cópias, enquanto que as linhagens de clima temperado apresentaram $23,20 \pm 3,11$ cópias. As médias foram comparadas através do teste *t* de Student, que indicou ser a diferença não significativa ($t_7 = 0,70$; $p > 0,05$).

a₂. Elemento *P*

O mesmo agrupamento, linhagens de clima tropical e linhagens de clima temperado, foi considerado para avaliar se a temperatura média anual do ambiente original das linhagens e o número de cópias dos elementos *P* mantidos em seus genomas estão de alguma maneira associados. Os números médios de inserções e seus erros padrões foram iguais a $15,60 \pm 2,19$ e $10,67 \pm 1,53$, respectivamente nas linhagens de clima temperado e tropical. O teste *t* de Student mostrou que as frequências do número de cópias dos dois grupos são significativamente diferentes ($t_7 = 3,74$; $p = 0,013$).

b. Associação entre o número de cópias dos elementos transponíveis e a distribuição geográfica das linhagens.

Para a verificação da relação entre a distribuição geográfica das linhagens e o número de cópias dos elementos transponíveis *hobo* e *P* foram realizadas



análises de correlação linear, utilizando-se como variáveis a latitude do local onde as linhagens foram coletadas e o número de cópias dos elementos transponíveis, apresentados na Tabela 6.

b₁. Elemento *hobo*

O valor de r da análise de correlação entre a latitude e o número de cópias do elemento *hobo* foi não significativa ($r = 0,522$; $t = 1,49$; $p > 0,05$), indicando ausência de associação entre o número de cópias dos elementos *hobo* e a latitude da região geográfica de onde a linhagem é procedente.

b₂. Elemento *P*

A análise de correlação entre a latitude e o número de cópias do elemento *P* também indicou ausência de correlação entre essas variáveis ($r = 0,571$; $t = 1,71$; $p > 0,05$). Entretanto, como o valor de t ficou próximo ao valor crítico para o nível de significância de 0,05 ($t_c = 1,94$), embora não significativa a correlação, os valores dos números de cópias foram plotados em um gráfico de dispersão (Figura 17). A reta teórica que melhor descreve a dispersão dos pontos sugere uma tendência relacionada com a latitude: maior a latitude do local de coleta da linhagem, maior o número de cópias do elemento transponível *P*.

c. Associação entre o número de cópias dos elementos *hobo* e *P*.

Foi realizada análise de correlação entre os números de cópias dos dois elementos transponíveis, que indicou a ausência de associação entre os números de cópias de *hobo* e *P* nas linhagens ($r = 0,384$; $t = 1,02$; $p > 0,05$).



Tabela 6. Latitudes dos locais de coleta das linhagens de *D. melanogaster* e números de cópias dos elementos transponíveis *hobo* e *P*.

Linhagens	Latitude	<i>hobo</i>	<i>P</i>
MA	2 ⁰ 32" SLat	13	9
PI	5 ⁰ 09" SLat	26	12
MG	18 ⁰ 20" SLat	20	19
SP	20 ⁰ 49" Slat	22	11
PR	23 ⁰ 25" SLat	24	15
SC	26 ⁰ 18" SLat	21	13
RS ₁	29 ⁰ 41" SLat	23	16
RS ₂	30 ⁰ 02" SLat	28	15

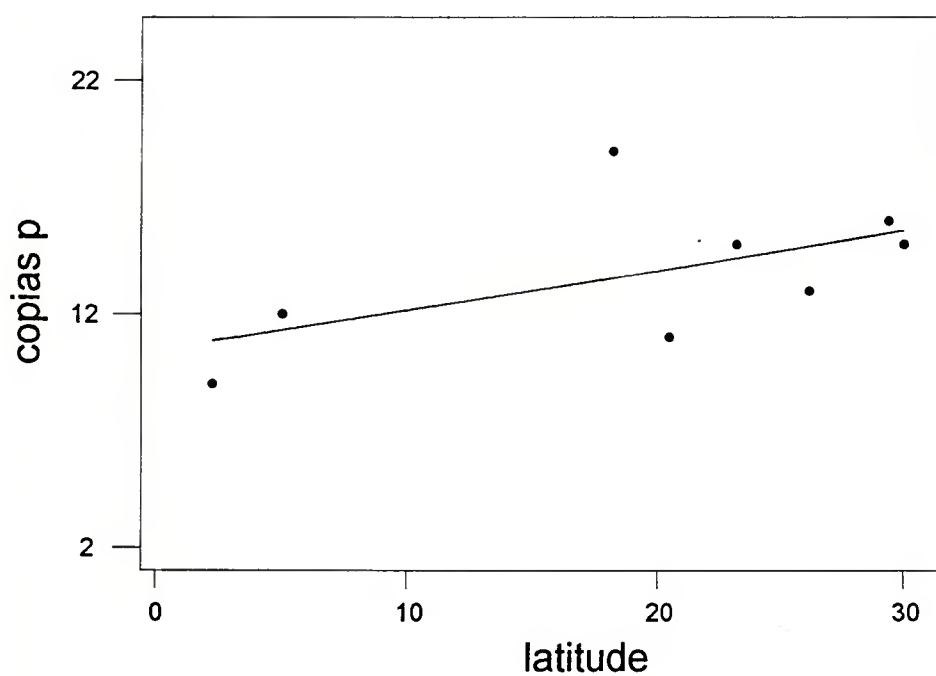


Figura 16. Gráfico de dispersão dos números de cópias do elemento transponível *P* (ordenada) em relação a latitude do local de coleta das linhagens de *D. melanogaster* (abscissa).

IV. DISCUSSÃO

Os elementos transponíveis *hobo* e *P* são os principais causadores do fenômeno da disgenesia híbrida em *Drosophila melanogaster*. Resultados da literatura mostram que os fatores responsáveis pela distribuição geográfica do sistema P-M e H-E de disgenesia híbrida, e pela regulação da transposição, variam em grandes áreas geográficas e não estão completamente estabelecidos.

As linhagens naturais contêm muitas seqüências completas e deletadas de elementos transponíveis, sendo que as deletadas ocorrem em quantidade comparativamente maior. Essas seqüências deletadas parecem desempenhar um papel importante na regulação, atuando como repressores da transposição.

Blackman & Gelbart (1989) relataram que o número de seqüências *hobo* completas encontradas em *D. melanogaster* é baixo, de duas a 10 por genoma, entretanto, o número de cópias deletadas pode variar de 35 a 70. Os números de cópias do elemento *hobo* (Figura 4) foram variáveis entre as linhagens brasileiras. O maior valor foi observado na linhagem RS₂ (28 cópias) e o menor na linhagem MA (13 cópias). A amplificação da região central do elemento (Figura 3), mostrou que as linhagens apresentam várias seqüências deletadas.

Vários fatores ambientais parecem influenciar a dinâmica da dispersão dos elementos transponíveis, tais como, agentes químicos, estresse físico, ataques virais, bacterianos e fúngicos. Dentre esses fatores, o melhor estudado é a temperatura, que parece ter diferentes impactos na transposição dos elementos transponíveis, os quais podem resultar em efeitos globais no genoma. Portanto, a atividade dos elementos transponíveis deve ser uma expressão desses efeitos (Capy *et al.*, 1998).

Apesar de os valores obtidos sugerirem a ocorrência de maior número de seqüências *hobo* em linhagens do sul do Brasil, a análise estatística mostrou que as diferenças entre as linhagens de clima tropical (MA, PI, SP) e as de clima temperado (MG, PR, SC, RS1 e RS₂) não foram significantes. Também não significantes foi a correlação entre as latitudes das origens geográficas das linhagens e o número de cópias dos elementos *hobo*. Os dados de Boussy *et al.*



(1988), referentes às linhagens australianas de *D. melanogaster*, também indicaram diferenças não significantes entre as linhagens do norte tropical com as linhagens do sul temperado. Da mesma maneira, os resultados de Vettorazzi (1997) não mostraram qualquer relação dos fenótipos com a origem geográfica das linhagens. Desde que a transposição do elemento *hobo* ocorre a temperaturas relativamente baixas (25° C), as diferenças não significantes podem refletir ausência de seleção para número de cópias dependente da temperatura ambiental.

O elemento *hobo* completo tem 3,0 Kb de comprimento (Calvi *et al.*, 1991). Além da sequência completa, quase todas as linhagens de *D. melanogaster* possuem cópias deletadas, com tamanho em torno de 1,5 Kb. Tais elementos são denominados *Th*. Periquet *et al.* (1989; *apud* Loreto, 1997) sugeriram que o acúmulo desses elementos no genoma pode desempenhar algum papel regulatório na transposição de *hobo*, da mesma maneira que o elemento *KP* da superfamília *P* de *D. melanogaster*.

Pelo menos três tipos desses elementos deletados foram descritos em *D. melanogaster* (*Th1*, *Th2* e *hobo vg^{al}*). O elemento *Th1* possui 1,51 Kb de comprimento e uma deleção interna de 1,45 Kb. O elemento *Th2* tem 1,49 Kb de comprimento e uma deleção interna de 1,47 Kb, e o elemento *hobovg^{al}* tem 1,87 Kb de comprimento com uma deleção interna de 1,09 Kb (Periquet *et al.*, 1994). Quando clivados com a endonuclease de restrição *Xho I*, o elemento completo gera um fragmento de 2,6 Kb, o elemento *Th1*, produz um fragmento de 1,11 Kb; o *Th2*, produz um fragmento 1,09 Kb, enquanto que o elemento *vg^{al}* produz o fragmento de 1,47 Kb.

As análises de *Southern* mostraram o fragmento correspondente a 2,6 Kb em todas as linhagens brasileiras, bem como, na linhagem-referência 23,5/CyL (Figura 6). A amplificação de fragmentos inferiores a 936 pb indicou a presença de elementos deletados, que puderam também ser observados pela análise de *Southern* como sendo praticamente invariáveis entre as linhagens. O *Southern blot* mostrou também a ocorrência de fragmentos de aproximadamente 1,0 Kb, que pelo peso molecular pode-se supor ser um dos elementos *Th*. Entretanto, apenas

pelo tamanho dos fragmentos não é possível identificá-los como um dos elementos repressores desta família.

As linhagens brasileiras não apresentaram diferenciação quanto a integridade do elemento *hobo*. Periquet *et al.* (1989), analisando linhagens do continente eurasiático (França a China), revelaram a presença do elemento completo de 2,6 Kb e de um elemento *Th* de aproximadamente 1,5 Kb em quase todas as linhagens. Estes autores também não observaram diferenças geográficas na distribuição genômica dos elementos *hobo* nas áreas estudadas.

As análises de PCR realizadas para a identificação do elemento *P* (Figuras 8 e 9) mostraram que todas as linhagens apresentam a sequência completa, mas também um fragmento de 1,15 Kb (Figura 9).

As análises de *Southern* (Figura 10) mostraram a heterogeneidade dos números de cópias deste elemento entre as linhagens brasileiras, com valores máximo (19 cópias) e mínimo (9 cópias) sendo observados nas linhagens MG e MA, respectivamente.

Estudos dos números de cópias totais dos elementos *P* em populações mundiais de *D. melanogaster* mostraram existir uma redução gradual no sentido oeste-leste, a partir da América do Norte. Os valores observados foram de 30 a 50 cópias na América do Norte (Ronsseray *et al.*, 1989), 30 cópias na Europa Ocidental (Anxolabéhère *et al.*, 1985) e 12 cópias na Rússia (Biémont *et al.*, 1990). Os resultados deste trabalho sugerem que as linhagens de *D. melanogaster* brasileiras são mais assemelhadas às européias ou russas do que às norte-americanas.

Os dados de distribuição geográfica do número de cópias e da estrutura dos elementos *P* são compatíveis com a hipótese formulada por Kidwell (1979) de uma invasão recente dos elementos *P* na espécie *D. melanogaster*, através de transferência horizontal a partir de *D. willistoni* (Daniels *et al.*, 1990). De acordo com Anxolabéhère *et al.* (1990) essa invasão teria ocorrido antes de 1950, na América do Norte, sendo os epicentros possíveis o sul dos Estados Unidos ou a América Central. A invasão das populações M européias e dos outros continentes, pelos elementos *P*, se deu após 1950 por um processo de invasão em cascata pelo

cruzamento com indivíduos provenientes do continente americano. Este processo ainda não estaria totalmente terminado. Durante a fase inicial de invasão das populações americanas, produziram-se elementos defectivos, cuja presença limita o potencial disgênico dos indivíduos. A invasão das populações francesas (tipo M') por fontes contendo uma mistura de elementos completos e incompletos conduziu pelo mesmo fenômeno de deleções internas ao aumento da frequência relativa de elementos defectivos e à formação de populações com potencial disgênico P baixo. Estas novas populações passaram a propagar esses elementos P essencialmente defectivos e deram origem às fontes eurásianas que são atualmente M'.

As linhagens classificadas como P forte possuem de 40 a 50 cópias de elementos P por genoma haplóide. Aproximadamente um terço desses elementos são completos; os dois terços restantes são elementos menores, originados a partir de deleções internas da sequência P completa. As linhagens classificadas como Q têm cerca de 25 a 60 cópias de sequências P por genoma haplóide.

As linhagens M verdadeiras não possuem elementos P. As linhagens M' que constituem a vasta maioria das linhagens selvagens de *D. melanogaster* encontradas atualmente na Europa, Ásia e sudeste da Austrália (Kidwell, 1983; Anxolabéhère *et al.*, 1985; Boussy & Kidwell, 1987) possuem poucos elementos completos, mas muitas cópias são deletadas. Os números variam de cinco a 35, com um valor extremo de 52 cópias (Ronsseray *et al.*, 1989). As origens dessas linhagens podem representar um estágio de transição durante a distribuição dos elementos P nessas regiões (Anxolabéhère *et al.*, 1985).

Boussy (1987) e Boussy & Kidwell (1987) observaram uma forte clina latitudinal no potencial de disgenesia gonadal em populações de *D. melanogaster* do leste da Austrália. O padrão clinal englobava três regiões, nas quais as populações eram qualitativamente uniformes: região norte, com populações P (variando de P forte a Q), região central com populações Q (com pouca variabilidade entre as linhagens), e uma região sul com populações M (variando de M para Q). Os trabalhos acima citados indicaram a existência de clinas latitudinais, com fenótipos P ao norte da Austrália, com clima tropical, e fenótipos

Q e M' ao sul, com clima temperado. No Brasil, as clinas não puderam ser evidenciadas (Vetorazzi *et al.*, 1999), talvez devido à grande extensão territorial e ao número limitado de linhagens, ou ainda, ao período de manutenção de alguns meses das linhagens MA, MG e RS₂ no laboratório, sob temperatura constante de 25°C, que poderia ter minimizado diferenças seletivas originadas em seus ambientes naturais. Mesmo assim, pode ser caracterizada a diferenciação das linhagens do norte em relação às do sul.

Os resultados deste trabalho mostraram que a correlação entre as latitudes dos locais de coleta das linhagens e o número de cópias do elemento *P* não é significativa, embora o gráfico de dispersão mostre uma tendência de associação positiva entre a latitude e o número de cópias (Figura 16). Como a latitude e a temperatura média anual são positivamente correlacionadas, essa tendência pode ser reforçada pelas diferenças significantes mostradas pelo teste *t* de Student entre os números de cópias dos elementos *P* das linhagens de clima tropical (MA, PI e SP) e temperado (MG, PR, SC, RS₁ e RS₂).

Boussy (1987) discutiu várias hipóteses sobre os fatores determinantes da variação clinal dos fenótipos P-M em populações australianas de *D. melanogaster*. Uma delas é que o gradiente de temperatura poderia estar agindo como um agente seletivo para formar a clina P-M. Os modelos de dinâmica de populações de elementos transponíveis têm mostrado que a seleção contra indivíduos que possuem várias cópias de elementos por genoma pode regular a proporção de indivíduos que possuem esses elementos, ou o número médio de elementos por genoma (Charlesworth & Charlesworth, 1983). Desde que a disgenesia gonadal aumenta drasticamente em moscas desenvolvidas acima de 25°C, altas temperaturas poderiam atuar como agente seletivo para indivíduos com baixa atividade *P*. Contudo, os padrões clinais obtidos por Boussy & Kidwell (1987) e Vetorazzi *et al.* (1999) estão na direção contrária dessa explicação.

Os resultados deste trabalho mostram menor número de seqüências *P* nas regiões de clima tropical. Esses resultados são concordantes com a proposição de Daniels *et al.* (1990), de que a limitação do número de elementos no genoma poderia ser uma maneira de minimizar os efeitos fenotípicos deletérios da



disgenesia híbrida em nível orgânico, em regiões de clima quente o ano todo, desde que a disgenesia gonadal ocorre em temperaturas superiores a 25°C, levando à maior produção de descendentes estéreis.

Desde que os elementos *hobo* e *P* causam o fenômeno da disgenesia híbrida torna-se relevante determinar se existe associação entre os números de cópias de ambos, ao ocorrerem no mesmo genoma. Boussy *et al.* (1988), estudando linhagens australianas, observaram que os fenótipos P-M e H-E são independentes. A mesma falta de associação foi constatada neste trabalho, a análise de correlação entre o número de cópias do elemento *hobo* e *P* não se mostrou significativa.

Um dos objetivos deste trabalho foi a análise da integridade dos elementos transponíveis *P* e a detecção de elementos deletados *KP* como forma de se identificar os sistemas de regulação da transposição de elementos *P* nas populações de *D. melanogaster*.

Para detectar o elemento *KP* foram realizados 30 ciclos da reação de PCR com o *primer* pM-IR, que amplifica o elemento completo, mas com um tempo baixo para o *annealing* (45 segundos), o que favorece a amplificação de seqüências de tamanhos menores. Dois tipos de controles indicaram que a seqüência de 1,15 Kb amplificada pelo *primer* pM-IR corresponde ao elemento *KP*: a linhagem Krasnodar 75, onde este elemento foi descrito (Black *et al.*, 1987), também apresentou o mesmo fragmento e a linhagem-referência Harwich-w, bem como, o plasmídeo p π 25.1 apresentaram o fragmento de 2,9 Kb correspondente ao elemento *P* completo, mas não apresentaram a seqüência de 1,15 Kb. Também segundo Black *et al.* (1987), a linhagem-referência Harwich-w não apresenta o elemento *KP* (Figura 9).

A digestão de um elemento *P* completo com a endonuclease *Ava II* produz três fragmentos, consistindo cada um de 1,8 Kb, 0,54 kb e 0,48 Kb, que somados correspondem praticamente à seqüência *P* completam. Todas as linhagens apresentaram o fragmento de 1,8 Kb, decorrente da digestão do elemento completo (Figura 12), bem como, o fragmento de 0,48 Kb, que é decorrente da digestão tanto de elementos completos como de elementos *KP* (os dois primeiros

sítios de clivagem da *Ava II* ocorrem nas posições 23 e 500, que ambos possuem, desde que a deleção interna do elemento *KP* abrange a região 808 a 2560). Entretanto, o fragmento de 0,54 Kb foi observado apenas nas linhagens MG, SP e PR. A ausência deste fragmento nas demais linhagens pode ser decorrente de grande quantidade de elementos *KP*. Como os fragmentos de 0,63 Kb, que indicam a presença do elemento *KP*, e o de 0,54 Kb são muito próximos é possível que a sonda se ligue preferencialmente ao fragmento que possuía o maior número de cópias, detectando assim, o fragmento de 0,63 Kb em todas as linhagens, mas não o de 0,54 Kb, naquelas que continham muitos elementos *KP*.

Os resultados acima descritos são semelhantes aos obtidos por Anxolabéhère *et al.* (1990) em linhagens procedentes da República Popular da China: altas frequências de elementos *KP*, observadas pela presença do fragmento de 0,63 Kb e fraca marcação do fragmento de 0,54 Kb. Boussy *et al.* (1988), com o objetivo de esclarecer a clina latitudinal dos fenótipos P-M das linhagens do leste australiano, também detectaram o fragmento de 0,63 Kb em produtos da digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *Ava II* e a presença irregular do fragmento de 0,54 Kb.

Além dos elementos completos e *KP* foram observadas nas linhagens brasileiras diversas seqüências de tamanhos variáveis, que correspondem a pequenas deleções em sítios diferentes do elemento *P* (Figura 13). Há vários tipos de elementos *P* deletados descritos em *D. melanogaster*, dentre eles, destaca-se o elemento *SR*, observado por Corish *et al.* (1996) em linhagens Q. Este elemento compreende 2635 pb e apresenta uma deleção entre os introns 2 e 3, que se estende da posição 2341 a 2649, como também, uma inserção de 36 pb rica em AT nesse sítio. As deleções internas encontradas nas linhagens estudadas neste trabalho podem ser devidas à presença de diversos elementos deletados que habitam o genoma de *D. melanogaster*.

A estratégia utilizada para confirmar a presença dos elementos *KP* nos genomas das linhagens foi a realização de uma análise de *Southern* através da digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição *Dde I* e hibridização com o fragmento *Puv II* do elemento completo. Como essa sonda hibridiza nas

posições 586 a 1482 do elemento *P*, esperava-se observar um fragmento de 2,2 Kb na presença do elemento completo e um fragmento de 0,42 Kb na presença do elemento *KP* (Biémont *et al.*, 1990).

Os *blots* resultantes das digestões com as endonucleases *Ava II* e *Dde I* podem ser considerados conjuntamente, para serem estimadas as quantidades de elementos completos e *KP* existentes em cada linhagem.

Como a digestão do elemento *KP* com a endonuclease *Ava II* produz um fragmento de 0,63 Kb exclusivo deste elemento e um fragmento de 0,48 Kb, comum a ele e ao elemento completo e, com a endonuclease *Dde I* produz um fragmento de 0,42 Kb, podemos deduzir que as linhagens MG, SP e PR possuem pequena quantidade de elementos *KP*, visto apresentarem os fragmentos de 0,63 Kb (Figura 12) e de 0,42 Kb (Figura 14) com intensidade fraca.

Por outro lado, a digestão do elemento *P* completo com a endonuclease *Ava II* produz os fragmentos de 1,8 Kb, 0,54 Kb e 0,48 Kb e com a endonuclease *Dde I*, apenas o fragmento de 2,2 Kb, assim, podemos deduzir que as linhagens MG, SP e PR contêm grande quantidade de elementos completos, visto apresentarem as quatro bandas intensas (Figuras 12 e 14).

As linhagens MA, SC, RS₁ e RS₂ apresentaram os fragmentos de 0,42 Kb e 0,63 Kb com intensidade forte, enquanto que os fragmentos de 2,2 Kb e 1,8 Kb foram pouco intensos. O fragmento de 0,54 kb, por sua vez não foi detectado nessas análises. Estes resultados indicam grande quantidade de elementos *KP* e pequenas quantidades de elementos completos.

A linhagem PI, ao contrário das citadas acima, apresentou tanto as bandas que indicam a presença do elemento completo, como as bandas que indicam a presença do elemento *KP* com intensidade forte, sugerindo que possui grandes quantidades dos dois elementos.

Black *et al.* (1987), analisando linhagens de *D. melanogaster* coletadas na Europa, Ásia, América do Norte e Austrália não encontraram elementos *KP* em populações americanas classificadas fenotipicamente como P, mas encontraram esses elementos em linhagens P fortes de outras regiões geográficas, como também em linhagens P moderadas, Q e M'. Neste trabalho foram encontrados

elementos *KP* em todas as linhagens estudadas, independente de serem classificadas como P moderada, Q e M'.

Boussy *et al.* (1988) observaram que a maior parte dos elementos encontrados nas populações australianas eram completos e *KP* e que existe uma correlação entre o número de elementos *KP* e o fenótipo P-M: o número de elementos *KP* foi muito menor nas regiões P do que nas Q ou M'. Nas populações brasileiras, também a maior parte dos elementos encontrados são elementos completos e *KP*, e existe uma correspondência entre o número de repressores *KP* e o fenótipo P-M, resultados concordantes com os de Boussy *et al.* (1988). As linhagens MA e PI, classificadas fenotipicamente como P, mas com grande quantidade de elementos *KP*, foram exceções a essa concordância.

Vetorazzi *et al.* (1999) realizaram cruzamentos-diagnóstico, com o propósito de avaliar os graus de atividade *P* (cruzamentos A) e de repressão ao elemento *P* (cruzamentos A*) destas linhagens, através da frequência de disgenesia gonadal observada nos descendentes. A linhagem RS₁ não foi classificada fenotipicamente, mas os resultados das análises moleculares indicam semelhança com a linhagem RS₂, semelhança devida provavelmente à proximidade geográfica dos locais de origem destas linhagens. A comparação entre os resultados fenotípicos e moleculares foi apresentada na Tabela 5.

Os índices de disgenesia gonadal dos cruzamentos A variam de moderados a baixo, indicando baixo potencial de atividade *P* nas linhagens, enquanto que os dos cruzamentos A* estiveram próximos a 10%, ou inferiores, indicando alta capacidade de repressão à transposição.

Dentre as linhagens classificadas fenotipicamente como P, a linhagem MA, apresentou o maior potencial de atividade, e o grau de repressão à disgenesia também alto. Os dados moleculares deste trabalho evidenciaram que essa linhagem possui grande quantidade do elemento *KP* em seu genoma e menor quantidade de elementos *P* completos. A linhagem PI apresentou grau de atividade *P* baixo e de repressão moderado. Em nível molecular, esta linhagem possui quantidades de elementos *P* completos e de elementos *KP* equivalentes. A linhagem MG possui grau de atividade *P* moderado e alto potencial de repressão,

bem como, apresenta pequena quantidade de elementos repressores KP e grande quantidade de elementos completos. Também a linhagem SP possui pequena quantidade de elementos KP , potencial de atividade P moderado e grande quantidade de elementos P completos, alto potencial de repressão. Verificam-se, portanto, variações nas relações entre fenótipo e as quantidades de elementos completos e KP .

As linhagens PR e RS₂, classificadas como Q, apresentaram baixos índices de disgenesia híbrida em cruzamentos A, indicando baixa atividade P , mas alto grau de atividade repressora. A linhagem RS₂ apresentou grande quantidade de elementos repressores KP e pequena quantidade de elementos P completos. Estes dados estão de acordo com os resultados de Boussy *et al.* (1988), onde populações do tipo Q apresentam maior número de cópias do elemento KP . Entretanto, a linhagem PR, também classificada como Q, apresentou grande quantidade de elementos P completos e baixa quantidade de elementos KP .

Por último, a linhagem SC, classificada como M', apresentou baixos níveis de atividade P e nível alto de repressão à transposição. Os dados moleculares mostraram quantidade intermediária de elementos P completos e de elementos KP .

Daniels *et al.* (1987), estudando uma linhagem transformada, com grande número de elementos completos e deletados, observaram que não houve desenvolvimento da atividade regulatória completa mesmo depois de 34 meses (DG em cruzamentos A* de 60%), embora a linhagem tivesse acumulado grande número de elementos completos e deletados e gerasse um índice de disgenesia em cruzamentos A de 100%. Parece, então, existir um número crítico de elementos ou mais provavelmente, uma classe particular de elementos necessários para a regulação.

Todo *et al.* (1984) encontraram uma correlação negativa entre o número de elementos completos e o índice de disgenesia apresentado nos cruzamentos A* e Boussy *et al.* (1988) observaram que parece haver um número limiar de elementos P completos, abaixo do qual a susceptibilidade a atividade P é possível e outro limiar, mais alto, acima do qual a atividade P é possível. Estes autores observaram

também que um aumento do número de elementos *KP* por genoma é correlacionado com um nível reduzido de atividade *P* entre as linhagens australianas.

A observação acima é consistente com um papel simplesmente regulatório ou repressor para o elemento *KP*, no qual um produto do elemento de alguma maneira impede a atividade da transposase do elemento completo. Entretanto, nas linhagens Q e M australianas, um número alto de elementos *KP* por genoma não se correlaciona com a habilidade regulatória. Uma interpretação possível desta observação é que a regulação por elementos *KP* pode operar em elementos potencialmente ativos no mesmo genoma que possui elementos *KP*, mas não em elementos ativos introduzidos em outro genoma (como nos cruzamentos A*).

Todas as linhagens estudadas neste trabalho apresentaram atividade *P* moderada ou baixa e altos níveis de repressão e possuem tanto o elemento completo como o elemento *KP*. Estes resultados sugerem que em todas as linhagens foi atingido o número limiar de elementos *KP* necessário para a ocorrência da repressão da transposição.

Black *et al.* (1987) acreditam que os elementos *KP* acumularam-se como consequência da interação entre a transposição e a seleção natural. Entretanto, ressaltaram que nenhum processo agindo sozinho poderia explicar racionalmente o acúmulo destes elementos. Outro fator responsável pelo acúmulo poderia ser a deriva genética, mas seria necessário propor que o evento de deleção que deu origem ao elemento *KP* ocorreu em algumas das primeiras moscas que trouxeram elementos *P* para a Europa e a Ásia e que os elementos *P* encontrados nas linhagens M' australianas são de origem eurásiana. Somente dessa maneira a distribuição atual observada poderia ser explicada.

Daniels *et al.* (1987) observaram que durante a transposição do elemento *P*, ocorrem deleções em alta frequência seria, então, esperado que outros elementos deletados também tivessem aumentado em número de cópias e se espalhado através das populações. Os estudos de Black *et al.* (1987) mostraram que em populações naturais os demais elementos deletados não têm se acumulado, nem em termos de número de cópias, nem em termos de distribuição geográfica.

Um modelo puramente molecular de distribuição teria que supor que há algumas propriedades estruturais e funcionais do elemento *KP*, sozinho ou em conjunto com elementos *P*, que facilitariam seu acúmulo sob todas as outras deleções derivadas. Entretanto, através do sequenciamento nada que facilitasse esse acúmulo foi revelado em sua estrutura.

Black *et al.* (1987) propuseram que a distribuição dos elementos *KP* está intimamente relacionada com sua habilidade para reprimir a disgenesia híbrida induzida por *P*, enquanto que Boussy *et al.* (1988) sugeriram que existe um número limiar de elementos *KP* para a ocorrência da repressão. Em essência, os autores sugerem a existência de uma interação entre a transposição e a seleção natural: que a variação natural do número de cópias do elemento *KP* leva à variação fenotípica nos níveis de disgenesia, que seria a base da seleção no tempo em que essas linhagens estão evoluindo. A progênie de moscas com alto número de cópias *KP* e conseqüentemente, menor grau de disgenesia, em uma geração, produziriam preferencialmente a próxima geração.

As variações entre os números de elementos *P* completos e elementos *KP* observadas nas linhagens brasileiras podem ser entendidas 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 da natureza seja estável. Não se deve também descartar o efeito do tempo de manutenção das linhagens no laboratório. Entre as análises fenotípicas e as moleculares decorreram cerca de 90 gerações.

A natureza dinâmica da distribuição do sistema P-M é demonstrada nos trabalhos de Boussy *et al.* (1998) e French *et al.* (1999). Novas análises fenotípicas e moleculares das populações do leste australiano indicaram uma mudança da clina latitudinal P-Q-M (Boussy, 1987; Boussy & Kidwell, 1987) para Q-P-Q-M.

Boussy (1987) propôs uma hipótese denominada de "introdução em massa", que se baseia na história de introdução dos elementos *P* nas populações australianas de *D. melanogaster* supondo que as características das moscas introduzidas ainda se refletiriam nas populações atuais para explicar a distribuição do sistema P-M: as populações P do norte teriam se originado de migrantes da América do Norte, onde a regulação da transposição faz-se principalmente através do citótipo e elementos *KP* são raros, enquanto que as do sul foram originadas a partir da Europa, onde a regulação se faz através dos elementos *KP*, com subsequente migração e mistura gerando o padrão clinal observado.

Os estudos de Boussy *et al.* (1998) que, além dos elementos *P*, avaliaram a ocorrência de outros marcadores moleculares nas populações australianas e de French *et al.* (1999) não corroboraram a proposição de introdução em massa. Entretanto, segundo Boussy (*op cit.*) a diferenciação clinal das populações australianas pode ser decorrente de pequenas introduções; levando-se em conta a dinâmica infectiva dos elementos P no genoma, poucas moscas poderiam ser suficientes para introduzir os elementos *P* nas populações nativas de *D. melanogaster* que ainda não continham elementos *P*.

O alto número de elementos *KP* observado em muitas populações brasileiras, como também a semelhança aos padrões obtidos por Boussy *et al.* (1988) nas linhagens australianas, pode sugerir a ocorrência de mais de uma introdução do elemento *P* nestas populações. A proposta de Anxolabéhère *et al.* (1990), de dispersão dos indivíduos contendo elementos *P*, a partir do sul dos Estados Unidos para a Europa (ao leste), Ásia (ao oeste) e América do Sul (ao sul) pode ser ampliada pelos resultados deste trabalho. O padrão fenotípico das linhagens P do norte do Brasil assemelha-se às linhagens P da América do Norte, que apresentam índices intermediários a altos de potencial P; enquanto que as do sul, assemelham-se mais às linhagens da Eurásia com fenótipos Q e M' e alta frequência de elementos *KP*.

A proposição de introduções de linhagens Q e M', portadoras de altas frequências de elementos *KP*, a partir de linhagens provenientes possivelmente da Europa ou da Ásia pode ser sugerida para as populações brasileiras. A introdução

de moscas provenientes do continente eurasiático poderia ter ocorrido através do fluxo gênico associado às migrações humanas e transporte de frutas, que ocorreu principalmente na segunda metade deste século, do continente eurasiático para o sul do Brasil. Esta introdução seria possível devido às altas taxas de reprodução da espécie *D. melanogaster* e ao poder infectivo dos elementos *P*. Migrações posteriores de indivíduos dessas populações no sentido sul-norte seriam responsáveis pela existência de grande número de elementos *KP* nas populações do norte do Brasil. Se for assim, então as diferenças apresentadas nas características P-M entre o norte e o sudeste e sul do Brasil pode ser um fenômeno transitório.

Está claro que as populações naturais têm evoluído diferentes estratégias moleculares para a função de repressão da transposição. Os resultados deste trabalho contribuem para o conhecimento de alguns aspectos dos mecanismos de repressão nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster*, através da verificação da presença de elementos deletados *KP*. Estudos posteriores visando a identificação de outros elementos deletados poderão fornecer maiores detalhes sobre os mecanismos de repressão da transposição.



V. CONCLUSÕES

1. Os resultados das análises moleculares indicaram a presença dos elementos transponíveis *hobo* e *P* em todas as linhagens brasileiras de *Drosophila melanogaster*.

2. Não foi detectada associação entre o número de cópias dos elementos *hobo* e a origem geográfica das linhagens.

3. Os números de cópias dos elementos *P* das linhagens provenientes de regiões com clima tropical (MA, PI, SP) foram significativamente menores que os das linhagens de clima temperado (MG, PR, SC, RS₁ e RS₂), sugerindo que a limitação do número de cópias no genoma poderia ser uma maneira de minimizar os efeitos fenotípicos deletérios da disgenesia híbrida em nível orgânico, em regiões com temperaturas médias anuais altas.

3. Todas as linhagens apresentaram o elemento *hobo* completo e uma sequência deletada específica, de aproximadamente 1,5 Kb. A presença desta sequência em todas as linhagens sugere a possibilidade de se tratar de um elemento repressor.

4. Os resultados mostraram independência dos sistemas H-E e P-M, visto ter sido não significativa a correlação entre os números de cópias dos elementos *hobo* e *P*.

5. Todas as linhagens apresentaram o elemento *P* completo e o elemento deletado *KP*. A presença do elemento *KP* e o alto grau de repressão à atividade *P*, características das oito linhagens, sugere que em todas foi atingido um número limiar deste elemento, necessário para a ocorrência da repressão da transposição.

6. As linhagens do norte do Brasil mostraram-se mais assemelhadas às linhagens norte-americanas quanto ao sistema P-M, enquanto que, as linhagens do sul assemelharam-se mais às eurásianas.

7. A presença de alto número de elementos *KP* e as características fenotípicas do sistema P-M, sugerem ter ocorrido no Brasil mais de uma introdução de indivíduos com elementos *P*. Uma ao norte, decorrente de amostras provenientes da América da Norte, e outras, ao sul, decorrentes de amostras

provenientes de regiões com altas frequências de elementos KP, possivelmente da Europa ou da Ásia. Fluxo gênico no sentido sul-norte seria responsável pela existência de grande quantidade de elementos KP nas populações do norte do Brasil.

8. Os resultados deste trabalho indicam que um dos principais mecanismos de regulação da transposição do elemento *P* em populações brasileiras de *Drosophila melanogaster* deve-se ao elemento KP. Para elucidar os mecanismos de repressão da transposição destas linhagens e identificar outros elementos repressores, bem como, para ter-se um panorama mais amplo da distribuição dos fenótipos P-M, torna-se necessário a obtenção de maior número de amostras das populações brasileiras e a realização análises moleculares complementares.



VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. D.; RANG, R. S.; RIO, D. C. The alternative splicing factor PSI regulates *P*-element third intron splicing in vivo. *Genes Dev.*, v. 11, p. 129-138, 1997.

ANXOLABÉHÈRE, D.; NOUAUD, D.; PÉRIQUET, G.; TCHEN, P. *P*-element distribution in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*: a genetic and molecular analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 5418-5422, 1985.

ANXOLABÉHÈRE, D.; KIDWELL, M. G.; PÉRIQUET, G. L'historie d'une invasion génétique. *La recherche*, v. 20, p. 1328-1338, 1989.

ANXOLABÉHÈRE, D.; KAI, H.; NOUAUD, D.; PÉRIQUET, G. The distribution of the P-M system in *Drosophila melanogaster* strains from the people's Republic of China. *Gen. Sél. Evol.*, v. 22, p. 175-188, 1990.

BAZIN, C.; DENIS, B.; CAPY, P.; BONNIVARD, E.; HIGUET, H. Characterization of permissivity for *hobo*-mediated gonadal dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 261, p. 480-486, 1999.

BIÉMONT, C.; RONSSERAY, S.; ANXOLABÉHÈRE, D.; IZAABEL, H.; GAUTIER, C. Localization of *P* elements, copy number regulation, and cytotype determination in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Res.*, v. 56, p. 3-14, 1990.

BINGHAM, P. M.; KIDWELL, M. G.; RUBIN, G. M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the *P* element, a *P* strain-specific 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 hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.*, v. 6, p. 4125-4135, 1987.

BLACKMAN, R. K.; GELBART, W. M. The transposable element *hobo* of *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D. E., HOWE, M. M. (Ed.). *Mobile DNA*, Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1989. p.523-530.

BLACKMAN, R. K.; GRIMALAIA, R.; MACY, M.; KOEHLER, D.; GELBART, W. M. Mobilization of *hobo* elements residing within the decapentaplegic gene complex: suggestion of a new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, v. 49, p. 497-505, 1987.

BONNIVARD, E.; HIGUET, D.; BAZIN, C. Characterization of natural populations of *Drosophila melanogaster* with regard to the *hobo* system: a new hypothesis on the invasion. *Gen. Res.*, v. 69, p. 197-208, 1997.

BOUSSY, I. A. A latitudinal cline in P-M gonadal dysgenesis potential in Australian *Drosophila melanogaster* populations. *Genet. Res.*, v. 49, p. 11-18, 1987.

BOUSSY, I. A.; KIDWELL, M. G. The P-M hybrid dysgenesis cline in Eastern Australian *Drosophila melanogaster*: discrete P, Q and M regions are nearly contiguous. *Genetics*, v. 115, p. 737-745, 1987.

BOUSSY, I. A.; HEALY, M. J.; OAKESHOTT, J. G.; KIDWELL, M. G. molecular analysis of the P-M gonadal dysgenesis cline in Eastern Australian *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 119, p. 889-902, 1988.

BOUSSY, I. A.; ITOH, M.; RAND, D.; WOODRUFF, R. C. Origin and decay of the *P* element-associated latitudinal cline in Australian *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 104, p. 45-57, 1998.

CALVI, B. R.; HONG, T. J.; FINDLEY, S. D.; GELBART, W. M. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. *Cell*, v. 66, p. 465-471, 1991.

CAPY, P., BAZIN, C., HIGUET, D., LANGIN, T. **Dynamics and Evolution of Transposable Elements**. 1 ed. Austin : Landes Bioscience, 1998. 197 p.

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



CLARK, J. B.; KIDWELL, M. G. A phylogenetic perspective on *P* transposable element evolution in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 11428-11433, 1995.

CORISH, P.; BLACK, D. M.; FEATHERSTON, D. W.; MERRIAN, J.; DOVER, G. A. Natural repressors of *P*-induced hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a model for repressor evolution. *Gen. Res.*, v. 67, p. 109-121, 1996.

CRAIG, N. L. Target site selection in transposition. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 66, p. 437-474, 1997.

DANIELS, S. B.; CLARK, S. H.; KIDWELL, M. G.; CHOVNICK, A. Genetic transformation of *Drosophila melanogaster* with an autonomous *P* element: phenotypic and molecular analyses of long-established transformed lines. *Genetics*, v. 115, p. 711-723, 1987.

DANIELS, S. B.; CHOVNICK, A.; BOUSSY, I. A. Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 7, p. 586-606, 1990.

DANIELS, S. B.; PETERSON, K. R.; STRAUSBAUGH, L. D.; KIDWELL, M. G.; CHOVNICK, A. Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable element between *Drosophila* species. *Genetics*, v. 124, p. 339-355, 1990.

ENGELS, W. R. A *trans*-acting product needed for *P* factor transposition in *Drosophila*. *Science*, v. 226, p. 1194-1196, 1984.

_____. *P* elements in *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D. E., HOWE, M. M. (Ed.). **Mobile DNA**, Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1989. p.439-484.

FLAVELL, A. Did retroviruses evolve from transposable elements? *Nature*, v. 289, p. 10-11, 1981.



FRENCH, D. J.; CORISH, P.; SHI, M.; DOVER, G. A. Evolutionary flux of *P* element regulation in a *Drosophila melanogaster* hybrid dysgenesis cline. *Genet. Res.*, v. 73, p. 205-216, 1999.

GALINDO, M. I.; LADEVÉZE, V.; LEMEUNIER, F.; KALMES, R.; PÉRIQUET, G.; PASCUAL, L. Spread of the autonomous transposable element *hobo* in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 12, p. 723-734, 1995.

GLOOR, G. B.; PRESTON, C. R.; JOHNSON-SCHLITZ, D. M.; NASSIF, R. W.; PHILLIS, R. W.; BENZ, W. K.; ROBERTSON, H. M.; ENGELS, W. R. Type I repressors of *P* element mobility. *Genetics*, v. 135, p. 81-95, 1993.

HARING, E.; HAGEMANN, S.; PINSKER, W. Different evolutionary behaviour of *P* element subfamilies: M-type and O-type elements in *Drosophila bifasciata* and *D. imaii*. *Gene*, v. 120, p. 1003-1013, 1995.

HOUCK, M. A.; CLARK, J. B.; PETERSON, K. R.; KIDWELL, M. G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, v. 253, p. 1125-1128, 1991.

JACKSON, M. S.; BLACK, D. M.; DOVER, G. A. Amplification of *KP* elements associated with the repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 120, p. 1003-1013, 1988.

JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B., *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986. p. 275-286.

KAUFMAN, P. D.; RIO, D. C. *Drosophila P*-element transposase is a transcriptional repressor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 88, p. 2613-2617, 1991.

KIDWELL, M. G.; KIDWELL, J. F. Selection for male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 84, p. 333-351, 1976.



KIDWELL, M. G.; KIDWELL, J. F.; SVED, J. A. 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. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the relationship between the P-M and I-R interaction systems. *Genet. Res.*, v.33, p.105, 1979.

_____. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 1655-1659, 1983.

_____. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: nature and inheritance of P element regulation. *Genetics*, v. 111, p. 337-350, 1985.

_____. Horizontal transfer of P elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica*, v. 86, p. 275-286, 1992.

_____. The evolutionary history of the P family of transposable elements. *Journal of Heredity*, v. 85, p. 339-345, 1994.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. *TREE*, v. 15, p. 95-99, 2000.

LEE, C. C.; BEALL, E. L.; RIO, D. C. DNA binding by the KP repressor protein inhibits P-element transposase activity *in vitro*. *EMBO J.*, v. 17, p. 4166-4174, 1998.

LEMAITRE, B.; RONSSERAY, S.; COEN, D. P regulatory products repress *in vivo* the P promotor activity in P-LacZ fusion genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 4419-4423, 1991.

LORETO, E. L. S. Elementos transponíveis em espécies neotropicais de *Drosophila* e suas implicações evolutivas. Porto Alegre, 1997. 171 p. Tese (Doutorado em Genética) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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.

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

PARDUE, M-L. Transposable elements: friends, foes, or merely fellow travelers? *Trends in Genetics*, v. 15, p. 95, 2000.

PÉRIQUET, G.; HAMELIN, M. H.; BIGOT, Y.; LEPISSIER, A. Geographical and historical patterns of distribution of *hobo* elements in *Drosophila melanogaster* populations. *J. Evol. Biol.*, v. 2, p. 223-229, 1989.

PÉRIQUET, G.; LEMEUNIER, F.; BIGOT, Y.; HAMELIN, M. H.; BAZIN, C.; LADEVÈZE, F.; EEKEN, J.; GALINDO, M. I.; PASCUAL, L.; BOUSSY, I. The evolutionary genetics of the *hobo* transposable element in *Drosophila melanogaster* complex. *Genetica*, v. 93, p. 79-90, 1994.

QUESNEVILLE, H.; ANXOLABÉHÈRE, D. Dynamics of transposable elements in metapopulations: a model of *P* element invasion in *Drosophila*. *Theor. Pop. Biol.*, v. 54, p. 175-193, 1998.

RIO, D. C.; RUBIN, G. M. Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 8929-8933, 1988.

RONSSERAY, S.; LEHMANN, M.; ANXOLABÉHÈRE, D. Copy number and distribution of *P* and *I* mobile elements in *Drosophila melanogaster* populations. *Chromosoma*, v. 98, p. 207-214, 1989.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, R. **Molecular cloning: A laboratory manuals**. 2^o ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 1.74-1.84.



SIMMONS, M. J.; BUCHHOLZ, I. M. Transposase titration in *Drosophila melanogaster*: a model for cytotype in P-M system of hybrid dysgenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 8119-8123, 1985.

SIMMONS, M. J.; RAYMOND, J. D.; BOEDIGHEIMER, M. J.; ZUNT, J. R. The influence of nonautonomous *P* elements on hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 117, p. 671-685, 1987.

SIMMONS, G. M. Horizontal transfer of *hobo* transposable elements within the *Drosophila melanogaster* species complex: evidence from DNA sequencing. *Molecular Biology Evolution*, v. 9, p. 1050-1060, 1992.

STRECK, R. D.; MACGAFFEY, J. E.; BECKENDORF, S. K. The structure of *hobo* transposable elements and their insertion sites. *EMBO J.*, V. 5, p. 3615-3623, 1986.

TODO, T.; SAKOYAMA, Y.; CHIGUSA, S. I.; FUKUNAGA, A.; HONJO, T.; KONDO, S. Polymorphism in distribution and structure of *P* elements in natural populations of *Drosophila melanogaster* in and around Japan. *Jpn. J. Genet.*, v. 59, p. 441-451, 1984.

VETORAZZI, V. C. R. **Disgenesia híbrida induzida pelos elementos transponíveis *P* e *hobo* em linhagens de *Drosophila melanogaster* de diferentes regiões brasileiras.** São José do Rio Preto, 1997. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) Universidade Estadual Paulista.

VETORAZZI, V. C. R.; LOURENÇO, M. F.; CARARETO, C. M. A. The distribution of the P-M hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster* strains from Brazil. *Genetica*, v. 105, p. 273-279, 1999.

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.

VII. RESUMO

Oito linhagens de *Drosophila melanogaster* foram estudadas quanto à ocorrência, ao número de cópias e à integridade dos elementos transponíveis *hobo* e *P*. Análises pela PCR indicaram a presença de elementos *hobo* e *P* completos em todas as linhagens, bem como, de elementos deletados de 1,0 Kb e 1,15 Kb, respectivamente para as seqüências *hobo* e *P*. Estas seqüências deletadas são possivelmente elementos repressores da transposição. O número médio de cópias do elemento *hobo* foi de $22,13 \pm 4,52$ e do elemento *P*, de $13,75 \pm 3,15$. Os números de cópias dos elementos *hobo* não mostraram associação com a origem geográfica das linhagens; entretanto, os números de cópias do elemento *P* das linhagens provenientes das regiões de clima tropical foram inferiores aos das linhagens de clima temperado ($t=3,74$; $p < 0,05$). A análise de *Southern* para a avaliação da integridade do elemento *hobo*, através da digestão com a endonuclease *Xho* I e hibridização com uma seqüência *hobo* de 963pb, mostrou em todas as linhagens a presença do fragmento de 2,6 Kb, correspondente ao elemento completo, e de uma seqüência de 1,0 Kb, possivelmente, um elemento repressor. As análises da integridade do elemento *P* foram realizadas pela digestão do DNA genômico com as endonucleases de restrição *Ava* II e *Dde* I e hibridizações com as seqüências de 2,9 Kb e de 986 pb (fragmento *Puv* II) do elemento *P*, respectivamente. Foram detectados elementos *P* completos e deletados, em quantidades variáveis, em todas as linhagens. Dentre estes, destacou-se o elemento repressor KP. O alto número de elementos KP e as características fenotípicas destas linhagens quanto ao sistema P-M, indicaram que as populações do norte do Brasil são mais assemelhadas às norte-americanas e as do sul, mais às eurásianas, sugerindo a ocorrência de mais de uma introdução de indivíduos com elementos *P* nas populações brasileiras de *D. melanogaster*.

Palavras-chaves: elementos transponíveis; elementos *P*; elementos *hobo*; elementos KP; disgenesia híbrida; *Drosophila melanogaster*.

VIII. ABSTRACT

Eight Brazilian strains of *Drosophila melanogaster* were studied regarding to occurrence, copy number and integrity of transposable elements *hobo* and *P*. PCR analysis indicated the presence of complete *hobo* and *P* elements in all strains, as well as deleted sequences of 1.0 Kb and 1.15 Kb, respectively for *hobo* and *P* elements. These deleted sequences are probably repressor elements from the transposition. The mean number of copies of *hobo* elements was 22.13 ± 4.52 and of *P* element was 13.75 ± 3.15 . The number of copies of *hobo* elements did not show association with the geographical origin of the strains; however, the number of copies of *P* elements in strains from tropical regions was lower than that from temperate regions ($t=3.74$; $p<0.05$). The *Southern* analysis to evaluate the integrity of the *hobo* element was carried out by means of digestion of genomic DNA with *Xho I* endonuclease and probed with the 963 bp sequence of the *hobo* element. The blots showed the presence of the 2.6 Kb fragment in all the strains, corresponding to the complete *hobo* element. A 1.0 Kb fragment was also observed, which probably corresponds to a repressor element. The analysis of *P* element integrity was performed by digesting DNA genomic with the restriction endonucleases *Ava II* and *Dde I* and probing it with the 2.9 Kb and 986 bp (*Puv II* fragment) sequences of *P* element, respectively. Complete and defective elements were detected in all the strains, in variable quantities. Among the defective elements, the repressor *KP* element was detected. The high number of *KP* elements and the phenotypical features of these strains regarding to the P-M system, show that the populations of the North of Brazil resemble those of the North-Americans, and that the populations of the South, to the Eurasian. These findings suggest the occurrence of more than one introduction of individual with *P* elements into the Brazilian populations of *Drosophila melanogaster*.

Keys words: transposable elements; *P* elements; *hobo* elements; *KP* elements; hybrid dysgenesis; *Drosophila melanogaster*.

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho.
São José do Rio Preto, fevereiro de 2001.

Mariangela Torreglosa Ruiz



