

MARCOS DE LUCCA JÚNIOR

Análise do Elemento Transponível *Bari-1* em
Drosophila Melanogaster, *D. Simulans* e Seus
Híbridos



1910001058



UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de São José do Rio Preto

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Programa de Pós-Graduação em Genética

MARCOS DE LUCCA JÚNIOR

ANÁLISE DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL *BARI-1* EM
DROSOPHILA MELANOGASTER, *D. SIMULANS* E SEUS
HÍBRIDOS.



T 1.058/02

Dissertação apresentada
para a obtenção do Grau
de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

São José do Rio Preto – SP
2002

Xeroxado



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética-Bioquímica do Departamento de Química e Geociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimentos

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

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, que desde a graduação me incentivou e deu exemplos de profissionalismo. Além de professor e orientador tornou-se, ao longo dos anos de convivência, grande amigo e companheiro.

À Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto pela amizade, atenção e grande auxílio no decorrer de todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar pela cooperação, permitindo o uso dos equipamentos do seu laboratório.

À Profa. Dra. Paula Rahal e à técnica de laboratório Janaína Gusmão Romeiro pela colaboração na etapa de transformação bacteriana.

Às amigas Juliana Polachini de Castro e Luciane Madureira de Almeida por sua grande colaboração na execução das técnicas moleculares.

À Ester Tartarotti, Milla Alves Baffi e Artur Tadeu Gomes, amigos e companheiros de laboratório que sempre me incentivaram e auxiliaram em tudo o que fiz. Tenho muito apreço por vocês.

À secretária do Departamento Rita Beatriz Seixas por sempre atender prontamente em todas as vezes que precisei da sua ajuda.

À técnica do laboratório Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira pela amizade e pelo auxílio nas atividades e preparação de reagentes.



Ao amigo Felipe Rafael Torres pela doação das linhagens NH de *Drosophila melanogaster* e de *D. simulans*.

Ao Prof. Dr. Wladimir João Tadei pela doação da linhagem GO de *D. simulans*.

À Direção do IBILCE pelas condições materiais que proporcionaram a realização deste trabalho.

Aos demais professores que, através de seu precioso e árduo trabalho, me deram a formação necessária para poder realizar, hoje, o que sempre sonhei em minha vida.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao meu irmão Marcelo e sua esposa Carla e ao meu irmão Mauro por sempre me incentivarem e demonstrarem por mim grande amor e amizade. Sem minha família nada disso teria sentido.

Ao meu sobrinho Murilo pelo seu lindo sorriso e inocência, sem os quais minha vida não teria hoje o brilho que tem.

À minha querida avó Ercília, que sempre foi para mim o exemplo de ser humano, bondade, generosidade e dedicação a serem seguidos.

Aos meus avós Donato Bulchi, José Antonio de Lucca e Carlota Bertani de Lucca, que, em vida, sempre foram exemplos de honestidade, trabalho, amor e carinho. Se estivessem aqui estariam sorrindo e orgulhosos dessa minha conquista. Tenho certeza que olham e zelam por mim.

À minha amada Néia pela compreensão da minha ausência, por seu amor e pelo seu sorriso a cada retorno. Você é essencial na minha vida.

Aos meus pais Marcos e Elizabeth. Através da sua luta e sacrifício para educar os filhos mostraram-se sempre presentes. A formação humana e união que me ensinaram alimentaram minha vontade de crescer e me tornar um homem de verdade. Este trabalho é um pequeno retorno a todo o amor, carinho e dedicação que investiram em mim. Obrigado.

À Deus por ter me concedido a vida, todos e tudo.



I. Introdução	8
II. Material e Métodos	18
1. Linhagem	18
2. Extração do DNA	20
3. PCR	21
4. Banda para o elemento flutuante	23
5. Digestão e montagem do DNA gelificado das linhagens	24
6. Hibridização em membrana	25
III. Resultados	
1. Hibridização do elemento	como um menino andando pela praia, achando aqui
2. Análise de pontos de ligação	e ali uma pedrinha mais lisa e uma concha mais
3. Análise das linhagens	bonita, tendo ainda pela frente encontrar o grande
4. Análise das linhagens	oceano da Verdade”.
IV. Discussão	Isaac Newton (1643-1727)
V. Conclusões	
VI. Referências	
VII. Summary	
VIII. Referências Bibliográficas	

Sumário

I. Introdução	8
II. Material e Métodos	18
1. Linhagens	18
2. Extração do DNA	20
3. PCR	21
4. Sonda para o elemento <i>Bari-1</i>	23
5. Digestão Enzimática do DNA genômico das linhagens	24
6. Hibridização em membrana	25
III. Resultados	27
1. Identificação do elemento transponível <i>Bari-1</i>	27
2. Análise do número de cópias do elemento <i>Bari-1</i>	31
1. Análise das linhagens híbridas	32
2. Análise das linhagens brasileiras	38
IV. Discussão	47
V. Conclusões	56
VI. Resumo	57
VII. Summary	59
VIII. Referências Bibliográficas	61



I. INTRODUÇÃO

Elementos de transposição, ou transposons, são segmentos lineares de DNA capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente de homologia entre a região genômica onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam. Embora constituam um grupo muito extenso e bastante heterogêneo, a maioria desses elementos genéticos móveis são dotados de algumas características comuns que lhe são peculiares, e que permitem diferenciá-los: 1) possuem seqüências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades (chamadas de repetições terminais); 2) carregam gene(s) que codifica(m) enzimas capazes de transportá-los; 3) criam, ao se inserir no DNA (como fruto do seu mecanismo de transposição), pequenas duplicações no sítio alvo de inserção, chamadas repetições diretas do DNA alvo, que são visualizadas como segmentos iguais adjacentes a cada uma das repetições terminais do transposon; e 4) existem em cópias múltiplas no genoma (Zaha, 1996).

O deslocamento dessas seqüências móveis de DNA afeta largamente células e organismos, alterando a organização estrutural do genoma, pois codificam produtos gênicos que interagem com os processos celulares. Além disso, os transposons podem modificar a expressão dos genes de seu hospedeiro dependendo do local de sua inserção. Eles podem se inserir dentro de seqüências codificadoras (exons),



dentro de seqüências não-codificadoras (introns) ou, ainda, dentro das seqüências regulatórias dos genes (Capy *et al.*, 1998). Pode ainda ocorrer uma recombinação entre eventuais cópias que ocupem um mesmo cromossomo, causando, possivelmente, uma deleção ou inversão da região intermediária. Consequentemente, uma seqüência eliminada por meio desse mecanismo pode vir a ser inserida, junto com o elemento que a carrega, em outra parte do genoma (Lewin, 1994).

Até o momento, só existem especulações do provável papel que os transposons possam exercer nos genomas eucarióticos. Fala-se tanto em parasitas genômicos (Hickey, 1982), como em agentes de reorganização gênica (Capy *et al.*, 1998), para designar seu papel evolutivo. Devido à sua natureza invasiva, pela aparente ausência de manifestações fenotípicas benéficas relacionadas à sua presença, e considerando-se também que algumas das conseqüências da transposição são fracamente destrutivas, alguns pesquisadores propuseram que os elementos de transposição não precisam prover vantagens adaptativas aos organismos hospedeiros para justificar sua presença nos genomas. Esta hipótese ficou conhecida com sendo a do Gene Egoísta, onde o elemento é tratado como um parasita, cuja única função é manter a sua própria sobrevivência (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). Algumas outras especulações propõem que os elementos transponíveis, ao causar rearranjos gênicos, promovem aumento da variabilidade genética e



consequentemente geram maior versatilidade adaptativa para as populações (Bingham *et al.*, 1982).

Os elementos transponíveis são agrupados em duas principais classes, de acordo com os mecanismos por eles utilizados para a transposição (Finnegan, 1989). A Classe I é caracterizada por elementos cuja transposição se dá por duplicação, via transcrição reversa de um RNA intermediário. Isto ocorre em várias etapas: primeiramente há a transcrição da sequência inserida, originando um RNA. Em seguida é sintetizada uma fita de DNA complementar a este RNA, através da atuação da transcriptase reversa (codificada pelo próprio transposon) e, por último, há a inserção deste DNA em um novo *locus*, por intermédio da enzima integrase, também codificada pelo transposon (Bingham & Zachar, 1989). Dentro desta classe podem ser designadas duas subclasses, baseando-se no tamanho de suas repetições terminais. A subclasse I contém elementos semelhantes aos retrovírus, com longas repetições terminais, denominadas LTRs (do inglês: *Long Terminal Repeats*), sendo divididos em 3 superfamílias: *Ty-copia*, *gypsy-Ty3* e *Tfl*, de acordo com suas sequências codificadoras. São encontrados em fungos, plantas e animais.

Na subclasse II são encontrados elementos que não se assemelham aos retrovírus e não possuem LTRs, subdivididos em duas superfamílias de acordo com o comprimento dos elementos: SINE (do inglês: *Short Interspersed Nuclear Element*) e LINE (do inglês: *Long Interspersed Nuclear Element*). Elementos da



superfamília SINE já foram encontrados em tartarugas, tabaco, salmões e mamíferos. Aqueles da superfamília LINE foram observados em fungos, plantas, *Drosophila* e mamíferos.

A Classe II é caracterizada por seqüências que se movem através de um mecanismo denominado “*cut and paste*”, que é conservativo, uma vez que há a saída do elemento de um lugar do genoma e sua inserção em outro loco. Tais transposons possuem repetições terminais invertidas variando entre 10 a 500 pb e codificam uma enzima chamada transposase, responsável pelo mecanismo de transposição (Engels *et al.*, 1990).

De acordo com as suas seqüências, seus comprimentos e a composição de suas repetições terminais invertidas, foram descritas duas subclasses para estes elementos (Capy *et al.*, 1998). A subclasse I é dividida em duas superfamílias: *mariner-Tc1*, freqüente em fungos, invertebrados e vertebrados; e *ISa*, típica de procariotos. Na subclasse II os elementos são subdivididos em seis superfamílias, a saber: *ISb*, *MuDr*, *CACTA*, *Tx*, *hAT* e *P*. A distribuição destes elementos é muito ampla, sendo encontrados em bactérias, milho, rãs, e outras gramíneas.

Capy *et al.* (1998) ainda consideram uma terceira classe, onde estão elementos transponíveis cujos mecanismos de transposição não foram totalmente elucidados. Incluem-se nesta classe as superfamílias *MITE* (do inglês: *Miniature Inverted Repeat Transposable Elements*), com curtas repetições terminais, observados em



arroz e milho; e *FB* (do inglês: *Foldback*), com longas repetições terminais, encontrados em *Drosophila*.

Espécies do gênero *Drosophila* são consideradas sistemas modelo para o estudo de elementos transponíveis. Em *Drosophila melanogaster* já foram descritos vários elementos transponíveis de classe I e II. Dentre aqueles pertencentes à classe II destacam-se os elementos *P* e *hobo* entre outros, largamente estudados quanto às suas ocorrências, distribuições e aspectos evolutivos.

Em 1993, Caizzi *et al.* descreveram um novo elemento transponível em *Drosophila melanogaster*, denominado *Bari-1*. Este elemento pertence à classe II e tem uma sequência de leitura (**ORF**, do inglês, *open reading frame*) com capacidade de codificar um polipeptídeo com 339 aminoácidos. A sequência de aminoácidos da proteína putativa do *Bari-1* é similar à transposase do elemento Tc-1 de *Caenorhabditis elegans* (Rosenzweig *et al.*, 1983).

O elemento *Bari-1*, apesar de ser encontrado na eucromatina e na heterocromatina como tantos outros elementos, é incomum em muitos aspectos. Primeiro, a organização das cópias heterocromáticas do *Bari-1* são muito diferentes de transposons de outras famílias localizados na heterocromatina. As cópias heterocromáticas dessas famílias estão geralmente rearranjadas e inativas, inseridas dentro da β -heterocromatina. A β -heterocromatina é uma região na junção hetero-eucromática que permanece visível nos cromossomos politênicos. Contrariamente,



as cópias heterocromáticas do *Bari-1* constituem um arranjo repetido único na α -heterocromatina. A α -heterocromatina forma a parte central do cromocentro nos cromossomos politênicos e é quase exclusivamente composta de DNA satélite (Appels & Peacock, 1978). Segundo, enquanto muitos outros elementos heterocromáticos exibem rearranjos que levam à uma perda da capacidade de codificação (Di Nocera *et al.*, 1986; Vaury *et al.*, 1989), as cópias heterocromáticas do *Bari-1* partilham com os elementos eucromáticos uma *ORF* idêntica, tanto na estrutura quanto na seqüência. Terceiro, enquanto elementos rearranjados e defectivos são comumente encontrados em outros sistemas (O'Hare & Rubin, 1983; Crozatier *et al.*, 1988; Streck *et al.*, 1986), todas as cópias eucromáticas do *Bari-1* são homogêneas tanto no tamanho quanto no mapa de restrição.

Posteriormente, Caggese *et al.* (1995) estudaram a variabilidade intra e interespecífica na distribuição dos elementos *Bari-1*, em várias populações de *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans*. Tais estudos mostraram que este elemento é comum à ambas as espécies. Entretanto algumas diferenças quanto o padrão de distribuição foram observadas. Em *D. melanogaster* os elementos *Bari-1* podem ser detectados por hibridização *in situ* somente no centrômero e nas regiões 55F e 91F do cromossomo 2. A região 55F é muito marcada em muitas linhagens desta espécie e deve representar um “ponto quente” para inserção, ou um sítio em



que o elemento *Bari-1* ficou imobilizado antes da separação da maioria das linhagens de *D. melanogaster*. Por outro lado, o sítio 91F representa uma situação um pouco mais extrema: o elemento *Bari-1* foi encontrado em todas as linhagens nessa região. Estes resultados representam bem a história da difusão do elemento *Bari-1* no genoma de *D. melanogaster*, uma vez que é uma espécie generalista e da qual se espera um alto grau de polimorfismo, que é de fato observado para muitos outros sítios de localização cromossômica deste elemento.

Por outro lado, em *Drosophila simulans*, não houve nenhuma marcação da região 91F. A principal diferença encontrada entre essas duas espécies é a presença marcante de grupos heterocromáticos do elemento *Bari-1* em *D. melanogaster*, mas não em *D. simulans*. Estudos realizados com outras duas espécies crípticas do complexo *simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia*, e com duas espécies filogeneticamente distantes do grupo *melanogaster*, *D. diplacantha* e *D. erecta*, sugerem uma origem evolucionária comum e rápida diversificação dos elementos *Bari-1* no gênero *Drosophila* (Moschetti *et al.*, 1998).

Drosophila melanogaster e *D. simulans* são espécies crípticas que diferem em apenas algumas inversões cromossômicas e que apresentam seqüências idênticas do DNA em mais de 90% do genoma. A hibridização entre essas duas espécies talvez seja o sistema melhor estudado no gênero *Drosophila*, principalmente em relação à determinação das causas da inviabilidade e esterilidade observada nos



híbridos, que impede o fluxo gênico. A hibridização entre *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* ocorre com relativa facilidade em laboratório (Sturtevant, 1920; Carracedo *et al*, 1998) e na natureza (Sperlich, 1962; Tracey *et al*, 1973; Mensua & Perez, 1977; Kamping & Van Delden, 1988). Muitos estudos têm demonstrado que a inviabilidade dos híbridos é sexo-específica e depende da direção do cruzamento: em cruzamentos envolvendo fêmeas *D. melanogaster*, os machos híbridos morrem no estágio de larva ou pupa, sendo a progênie constituída apenas por fêmeas estéreis (Hutter *et al.*, 1990; Hutter, 1997). Em cruzamento no sentido recíproco, geralmente, as fêmeas morrem ainda no estágio embrionário, obtendo-se, então, somente machos híbridos estéreis. Entretanto, em pelo menos um caso, já foi observada uma boa produção de fêmeas híbridas nesta direção de cruzamento, embora essas fêmeas sejam estéreis (Orr, 1996).

Outros estudos têm demonstrado que cruzamentos entre fêmeas *D. simulans* e machos *D. melanogaster* podem produzir, em algumas situações, descendentes férteis. Por exemplo, em cruzamentos envolvendo fêmeas *D. simulans* das linhagens C167.4, *Oxnard* e *vermilion*, cruzadas com machos *D. melanogaster* das linhagens IN(1)AB ou IN(1)AB,f. foram observadas fêmeas híbridas férteis, especialmente naqueles cruzamentos entre as fêmeas *D. simulans* da linhagem C167.4 e machos *D. melanogaster* da linhagem IN(1)AB (Davis *et al.*, 1996).



Esses resultados abrem a perspectiva de se verificar a transferência de seqüências de DNA entre essas duas espécies. De fato, várias linhagens híbridas derivadas de cruzamentos iniciais entre fêmeas *D. simulans* e machos *D. melanogaster* das linhagens acima citadas já foram obtidas seguindo-se o protocolo de Davis *et al.* (1996) e vêm sendo mantidas no laboratório há várias gerações. Essas linhagens contém seqüências do retroelemento "copia" de *D. melanogaster* introgrididas no genoma de *D. simulans* (Ceron, Lisch e Kidwell, em preparação).

Embora a transferência horizontal de elementos transponíveis, entre espécies sexualmente isoladas, venha sendo amplamente estudada, talvez ocorram muitos mecanismos que ainda não foram elucidados. Entretanto, pelo menos dois mecanismos com certeza atuam na transferência horizontal: a ação de vetores, como por exemplo do ácaro *Proctolaelaps regalis*, identificado como o responsável pela transferência recente do elemento *P* de *D. willistoni* para *D. melanogaster* (Houck *et al.*, 1991); ou através da produção de linhagens híbridas férteis que eventualmente venham se retrocruzar com um dos parentais, levando à introgressão de seqüências que contenham elementos transponíveis.

Com base nessas considerações, o presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos:



- 1) Verificar a presença e a distribuição genômica do elemento *Bari-1* nas linhagens IN(1) AB de *Drosophila melanogaster* e C167.4 de *Drosophila simulans*;
- 2) Verificar a distribuição deste elemento em linhagens híbridas estáveis originadas de cruzamentos entre fêmeas *D. simulans* (linhagem C167.4) e machos *D. melanogaster* (linhagem IN(1)AB). Essas observações poderiam esclarecer qual a contribuição de cada uma das espécies parentais na distribuição do elemento *Bari-1* nessas linhagens híbridas.
- 3) Verificar a distribuição deste elemento em linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans*, provenientes de diversas regiões geográficas, com as seguintes finalidades:
 - 3.1) Comparar as linhagens brasileiras entre si quanto à distribuição do elemento *Bari-1* em seus genomas.
 - 3.2) Comparar a distribuição do elemento *Bari-1* nessas linhagens com aquelas obtidas para as linhagens C167.4 de *D. simulans* e IN(1)AB de *D. melanogaster*;

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Linhagens

Utilizamos as linhagens IN(1)AB de *D. melanogaster* e C167.4 de *D. simulans* cedidas dos estoques mantidos no laboratório da Profa. Dra. Margaret G. Kidwell da Universidade do Arizona, em Tucson, Estados Unidos. Também foram utilizadas oito linhagens híbridas estáveis obtidas de cruzamentos entre fêmeas *D. simulans* e machos *D. melanogaster* das linhagens acima citadas (Ceron, Lisch & Kidwell, em preparação). Essas linhagens vêm sendo mantidas no laboratório de populações do Departamento de Biologia do IBILCE – UNESP de São José do Rio Preto.

As linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans* utilizadas nesse estudo foram provenientes de diversas regiões geográficas e estão especificadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Todas as linhagens de *D. melanogaster*, de *D. simulans* e linhagens híbridas foram mantidas em meio de fubá-trigo-araruta a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com repiques em intervalos de aproximadamente 20 dias.



Tabela 1. Linhagens brasileiras de *Drosophila melanogaster*.

Ano de Coleta	Origem	Código	Coletor
1996	Teresina, PI	TE	Profa. Zeneide Martins da Silva (UEPI)
1995	São Luís, MA	SL	Profa. Dra. Silma Regina Pereira Martins (UFMA)
1995	Santana do Riacho, MG	SR	Prof. Dr. Carlos Ribeiro Vilela (USP)
1999	Novo Horizonte, SP	NH	Felipe Rafael Torres (IBILCE/UNESP)
1996	Maringá, PR	MA	Profa. Dra. Ana Silvia Lapenta (UE Maringá)
1995	Santa Maria, RS	SM	Profa. Dra. Vera Lúcia S. Valente Gaiesky(UFRS)

Tabela 2. Linhagens brasileiras de *Drosophila simulans*.

Ano de Coleta	Origem	Código	Coletor
1997	Manaus, AM	MN	Profa. Dra. Isabel Rosa Cabral (UFPA)
1988	Goiânia, GO	GO	Dinocésar Cáris Rigue
1999	Novo Horizonte, SP	NH	Felipe Rafael Torres (IBILCE/UNESP)
1996	Maringá, PR	MA	Profa. Dra. Ana Silvia Lapenta (UE Maringá)
1995	Bento Gonçalves, RS	BG	Profa. Dra. Vera Lúcia S. Valente Gaiesky (UFRS)



II.2. Extração do DNA

O protocolo utilizado neste trabalho visando a análise de Southern é o de Jowett (1996), com algumas modificações. Cerca de 20 indivíduos (machos e fêmeas) foram macerados em tubos *epENDORF* após terem sido brevemente mergulhados em nitrogênio líquido. Ao macerado foram adicionados 700 μ L de Tampão de Lise (NaCl 0,6 M; Tris 2M; EDTA 1M; SDS à 10%) e 4 μ L de proteinase K (10mg/mL). A seguir, os tubos foram incubados a 65°C, durante 2 horas, sendo adicionados 700 μ L de Tampão de Extração (Fenol / Tris, pH 7,8). Após 10 minutos de agitação cuidadosa, os tubos eram centrifugados (13000 rpm, durante 10 minutos) e os sobrenadantes, retirados e transferidos para novos tubos.

O procedimento acima descrito foi repetido três vezes, adicionando-se na primeira vez um volume de Tampão de Extração igual ao do sobrenadante. Nas duas vezes seguintes adicionou-se volumes iguais de solução fenol: clorofórmio (1:1) e clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), respectivamente. Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos adicionando-se em seguida 0,2 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e dois volumes de álcool etílico (PA) gelado, agitando-se levemente. Após a precipitação do DNA, os tubos foram centrifugados (13000 rpm, durante 15 minutos), e o precipitado de DNA

desidratado com três banhos de álcool 70%, cada um, com duração de trinta minutos, sendo o *pellet* final seco em estufa, a 37°C, por aproximadamente 2 horas. A seguir, foram adicionados 30 µL de água bi-destilada esterelizada, aguardando-se cerca de 12 horas para que ocorresse a completa solubilização do DNA. O DNA era então estocado a -20°C até o seu uso.

II.3. PCR

A existência de elementos *Bari-1* nas linhagens de *D. melanogaster*, *D. simulans* e das linhagens híbridas foi investigada através da reação em cadeia da polimerase, utilizando-se 2 conjuntos de oligonucleotídeos.

Primeiramente, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos: 5'TTGTGAAAATACTTTTGCACACCTCTGT3' (*sense*), e. 5'ACAGAGGTGGTCAAAAGTATTTTCACAA3' (*antisense*), os quais amplificam uma sequência de 1,7 kb que corresponde à sequência completa do elemento *Bari-1*. Numa segunda fase, utilizamos os oligonucleotídeos Br₁ (*sense*) e Br₂ (*antisense*) os quais foram desenhados com o auxílio do *software* Primer-3,



desenvolvido pelo Massachusetts Institute of Technology-MIT (1997), disponível no site da Internet: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>. As seqüências desses oligonucleotídeos são: 5'ATTCGTCGCAGGCTAAAAGA3' *sense* e 5'TTGTAACACCACCTTTGGCA3' *antisense*, que são complementares à seqüência interna do elemento *Bari-1* nas posições dos nucleotídeos 453 a 1196, levando à amplificação de um fragmento de 703 pb. Esse amplificado foi posteriormente utilizado como sonda para seqüências do *Bari-1* nos experimentos de hibridização em membranas como será descrito no item seguinte.

Para os 2 conjuntos de oligonucleotídeos as condições da reação de PCR foram as seguintes: 13,4 µL de água deionizada, 2,5 µL de Tampão 10X; 2 µL de dNTPs 10 mM; 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 1,25 µL dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense* 5 pmol/µL; 50ng do DNA genômico e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. A mistura era coberta com uma gota de óleo mineral e submetida a 35 ciclos da reação, consistindo cada um de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento dos *primers* a 60 °C e 5 minutos de extensão final a 72°C (Moschetti *et al.*, 1998).

Os segmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% e visualizados sob transiluminação UV.

II.4. Sonda para o elemento *Bari-1*

Uma sonda para análise de *Southern* foi obtida através da amplificação de um fragmento interno de 703 pares de bases do elemento transponível *Bari-1*, inserido no plasmídeo pUC8. O plasmídeo pUC8, que contém a seqüência completa do elemento *Bari-1* nos foi cedido pelo Dr. Ruggiero Caizzi da Universidade de Bari, Itália.

A amplificação do fragmento-sonda foi feita através de reação em cadeia da polimerase, já descrita no item anterior.

Em seguida, a sonda foi purificada através do Kit ConcertTM Rapid PCR Purification System da Gibco BRL, de acordo com as recomendações do fabricante, e estocado a -20°C.

A região de homologia da sonda com o elemento *Bari-1* está esquematizada na figura 1 abaixo.

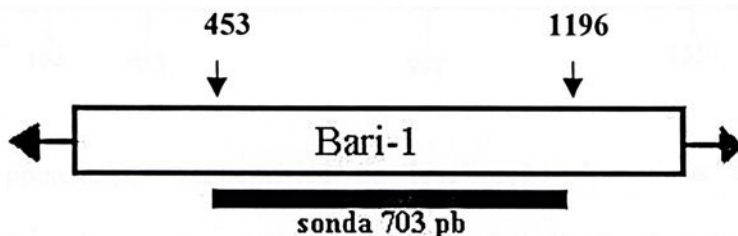


Figura 1. Representação esquemática da região de homologia da sonda de 703 pb com o elemento transponível *Bari-1*.

II.5. Digestão enzimática do DNA genômico das linhagens

O DNA genômico extraído das linhagens de *D. melanogaster*, *D. simulans* e linhagens híbridas foi digerido *overnight*, com a endonuclease de restrição *Hind III*, a qual reconhece um único sítio de clivagem no elemento transponível *Bari-1*. Este e outros sítios de restrição presentes no elemento *Bari-1* podem ser visualizados na Figura 2 abaixo.

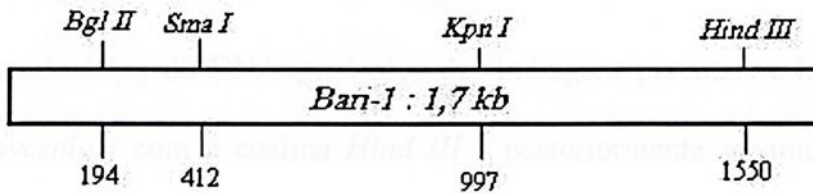


Figura 2. Representação esquemática da localização dos sítios de clivagem das endonucleases de restrição *Hind III*, *Bgl II*, *Sma I* e *Kpn I* no elemento transponível *Bari-1*.

II.6. Hibridização em membrana

A detecção dos elementos transponíveis *Bari-1* nos genomas das linhagens de *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* e das linhagens híbridas foi realizada através do método de *Southern*. Para a realização do método foi utilizado o ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham LIFE SCIENCE), sistema de hibridação quimioluminescente que utiliza a peroxidase como base da reação de marcação.

As análises envolveram várias etapas: digestão enzimática do DNA das linhagens com a enzima *Hind III*, preparação da sonda, eletroforese em gel de agarose, transferência do DNA para a membrana, hibridação e observação em luz ultravioleta do padrão de corrida obtido no gel.

Cerca de 10µg do DNA genômico das linhagens parentais e híbridas foram, digeridos *overnight* com a enzima *Hind III* e posteriormente separados em gel de agarose 1,5% com tampão TAE (Tris base 2M; ácido acético glacial 0,05 M e EDTA 0,5 M pH 8,0), com um tempo de corrida de aproximadamente 6 horas. O gel era então depurinado (HCl 250mM), desnaturado (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5M) e neutralizado (NaCl 1,5 M e Tris HCl 0,5 M, pH 7,5) à temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante do sistema ECL.

A transferência do DNA do gel para a membrana de nylon (Hybond N⁺ Amersham) foi feita em um pirex de vidro com 20XSSC (citrato trissódico 0,3M e NaCl 3M), durante aproximadamente 15 horas. Em seguida a membrana era lavada e fixada sob luz ultravioleta, e submetida ao processo de hibridização *overnight* à 42° C com a sonda de 703 pb, que apresenta homologia com parte da seqüência interna do elemento *Bari-1*.

Após a hibridização a membrana era submetida à lavagem com tampão primário (uréia 6M, SDS 4% e 0,5x SSC) por 20 minutos, duas vezes consecutivas, à 42° C. Ao término da segunda lavagem a membrana era então banhada em tampão secundário (2x SSC) por 5 minutos, à temperatura ambiente.

Para a detecção da hibridação, a membrana foi banhada em volumes iguais dos reagentes ECL 1 e 2 e, em seguida, exposta a um filme autorradiográfico (Hyperfilm-ECL), durante 40 minutos. A revelação e fixação do filme foram realizadas com o revelador Kodak KGBX Developer and Replenisher e o fixador Kodak KGBX Fixer and Replenisher, de acordo com o procedimento padrão.

III - RESULTADOS

III.1. Identificação do elemento transponível *Bari-1*

As análises iniciais por PCR tiveram como objetivo verificar a presença do elemento *Bari-1* nas linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster*, C167.4 de *D. simulans*, nas linhagens híbridas obtidas de cruzamentos interespecíficos entre as linhagens acima citadas, e nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e de *D. simulans*, provenientes de diversas localidades.

A presença deste elemento nas linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster* e C167.4 de *D. simulans* foi verificada utilizando-se *primers* que permitem a amplificação de um fragmento de 1,7kb correspondente à sequência completa do elemento *Bari-1*. Esses resultados são apresentados na figura 3.

O uso desses *primers* nas linhagens brasileiras e nas linhagens híbridas originou fragmentos fracamente amplificados. Por outro lado, a utilização de um outro conjunto de *primers* (BR₁ e BR₂), que amplificam um fragmento interno de 703 pb, originou bandas bem definidas quando o produto da reação de PCR foi analisado em gel de agarose a 1,5%. As figuras 4 e 5 apresentam esses dados para as linhagens híbridas e linhagens brasileiras, respectivamente.



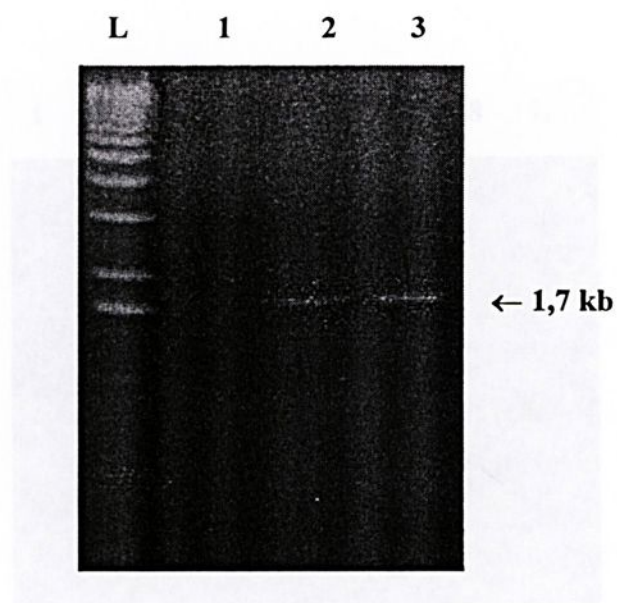


Figura 3. Resultado da reação de PCR para a amplificação da seqüência completa do elemento transponível *Bari-1* após eletroforese em gel de agarose à 1,5%. À esquerda (L): marcadores de tamanho (1 kb *Ladder* - Gibco); coluna 1: o controle negativo com água; 2: refere-se ao amplificado de 1,7 kb na linhagem C167.4 de *D. simulans* e 3: ao amplificado de 1,7kb na linhagem IN(1)AB de *D. melanogaster*.

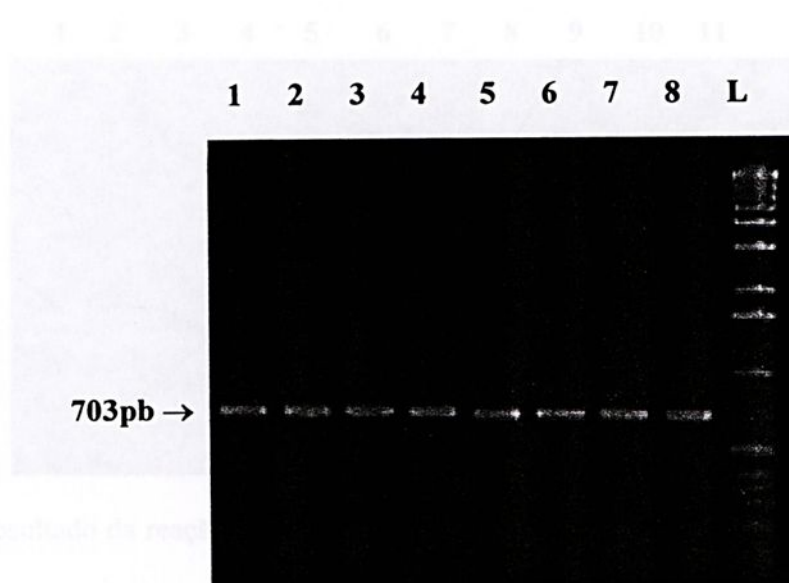


Figura 4. Resultado da reação de PCR para a amplificação do fragmento interno de 703 pb do elemento *Bari-1* após eletroforese em gel de agarose à 1,5%, utilizando-se os primers Br₁ e Br₂. Colunas 1 – 8: linhagens híbridas SM₁ à SM₈, respectivamente. À direita(L): marcadores de tamanho molecular (1kb *Ladder* - Gibco)

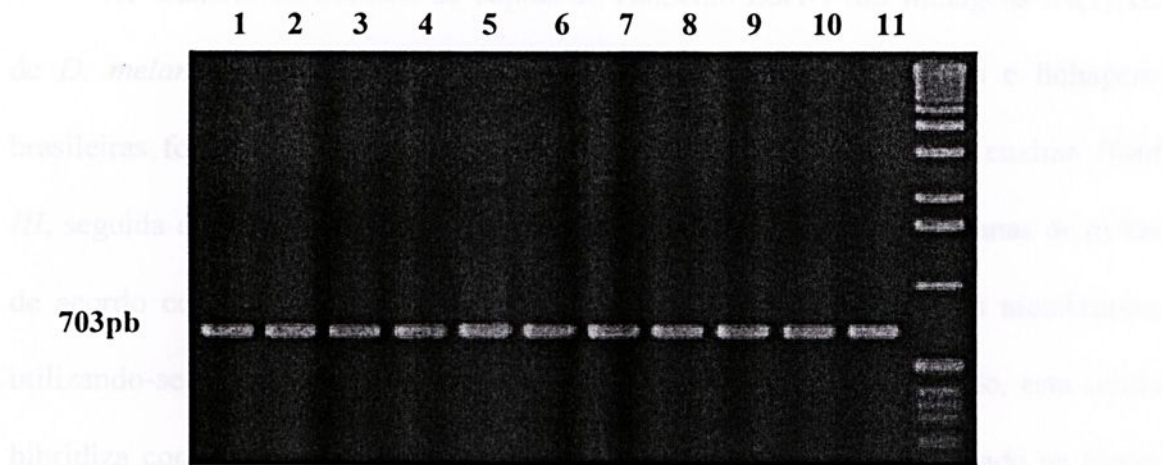


Figura 5. Resultado da reação de PCR para a amplificação do fragmento interno de 703bp, obtida nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans*, após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se os *primers* Br₁ e Br₂. Coluna 1 à 6, *D. melanogaster*: 1:TE, Teresina (PI); 2, São Luís (MA); 3: SR, Santana do Riacho (MG); 4: MA, Maringá (PR); 5: SM, Santa Maria (RS); e 6: NH, Novo Horizonte (SP). Colunas de 7 à 11, *D. simulans*: 7: BG, Bento Gonçalves (RS); 8: MA, Maringá (PR); 9: NH, Novo Horizonte (SP); 10: GO, Goiânia (GO); 11: MN, Manaus (AM). À direita(L): marcadores de tamanho molecular (1kb *Ladder* - Gibco)

III.2. Análises do número de cópias do elemento *Bari-1*

III.2. Análises do número de cópias do elemento *Bari-1*

As análises do número de cópias do elemento *Bari-1* nas linhagens IN(1)AB de *D. melanogaster*, C167.4 de *D. simulans*, nas linhagens híbridas e linhagens brasileiras foram realizadas clivando-se seus DNA genômicos com a enzima *Hind III*, seguida da separação em gel de agarose, transferência para membranas de nylon de acordo com a técnica de Southern, e posterior hibridização dessas membranas, utilizando-se como sonda o amplificado de 703 pb. Como já salientado, esta sonda hibridiza com parte da região interna do elemento *Bari-1*, como mostrado na figura 2 (item II.4 de material e métodos).

Esses experimentos tiveram a finalidade de comparar as linhagens parentais IN(1)AB de *D. melanogaster* e C167.4 de *D. simulans* com as linhagens híbridas, bem como determinar o número de cópias do *Bari-1* em linhagens brasileiras dessas espécies.

III.2.1. Análise das linhagens híbridas

A figura 6 apresenta o resultado de um blotting onde é possível comparar o número de cópias do *Bari-1* nas linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster*, C167.4 de *D. simulans* e nas 8 linhagens híbridas. Na linhagem IN(1)AB de *D. melanogaster*, em particular, é observada uma ampla distribuição genômica do elemento *Bari-1*, destacando-se um singular arranjo *em tandem*, indicado pela banda mais espessa de 1,7kb (figura 6, coluna 1). Já para a linhagem C167.4 de *D. simulans*, observa-se um número menor de cópias e a ausência da banda de 1,7 kb (Figura 6, coluna S). Esses resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Caggese *et al.*(1995) quanto à distribuição do elemento *Bari-1*, abrangendo um grande número de linhagens de *D. melanogaster* e de *D. simulans*.

Ainda na figura 6, pode-se verificar que nenhuma das linhagens híbridas analisadas apresentou a banda mais espessa, a qual representa o arranjo *em tandem* de muitas repetições do elemento *Bari-1*, característico de *D. melanogaster*. Entretanto, algumas linhagens híbridas apresentaram outras bandas provenientes de *D. melanogaster*. Assim, além das bandas que foram herdadas do parental *D. simulans*, as linhagens híbridas SM₅ e SM₆ (figura 6, colunas 5 e 6) apresentaram uma banda e as linhagens SM₂ e SM₃ (figura 6, colunas 2 e 3) apresentaram,

respectivamente, duas bandas que correspondem a cópias do elemento *Bari-1* originalmente presentes em *D. melanogaster*. Por outro lado, as linhagens SM₄ e SM₈ (figura 6, colunas 4 e 8) apresentaram quatro bandas que correspondem a cópias do elemento *Bari-1* originalmente presentes em *D. simulans*. Essas linhagens perderam uma das cópias do *Bari-1* desta espécie. Nas linhagens SM₁ e SM₇ (figura 6, colunas 1 e 7), observa-se três cópias para o elemento *Bari-1*, todas oriundas de *D. simulans*. Nesse caso houve a deleção de duas cópias do *Bari-1* de *D. simulans*.

A figura 7 refere-se a uma representação esquemática do padrão de bandamento das linhagens IN(1)AB de *D. melanogaster*, C167.4 de *D. simulans* e das 8 linhagens híbridas, obtida a partir da figura 6.



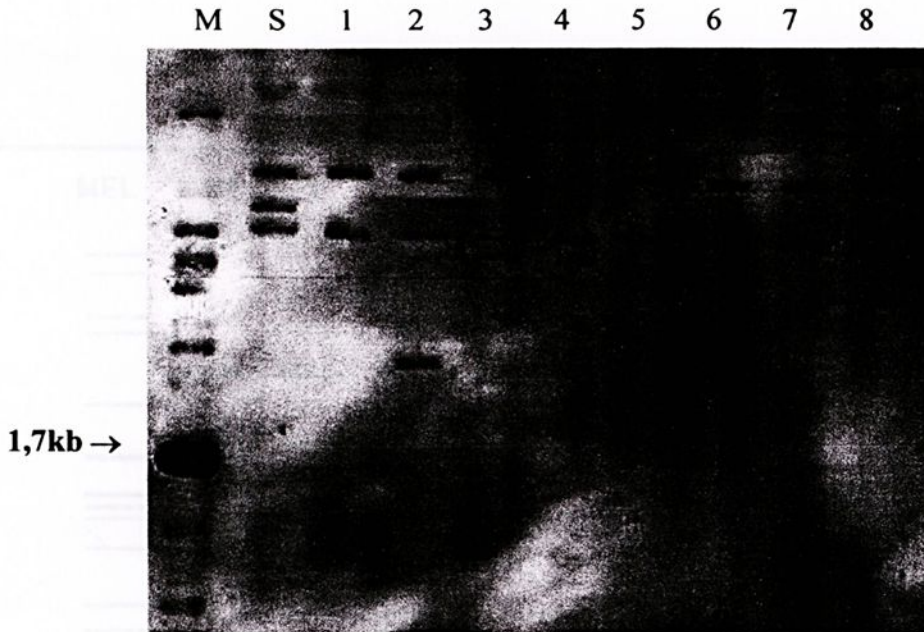


Figura 6. Southern blot do DNA genômico, digeridos com a endonuclease de restrição *Hind III* e hibridizados com o amplificado de 703 pb da sequência *Bari-1* em *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* e linhagens interespecíficas. M: *D. melanogaster* IN(1)AB; S: *D.simulans* C167.4. De 1 a 8 são as linhagens híbridas SM₁ à SM₈, respectivamente.

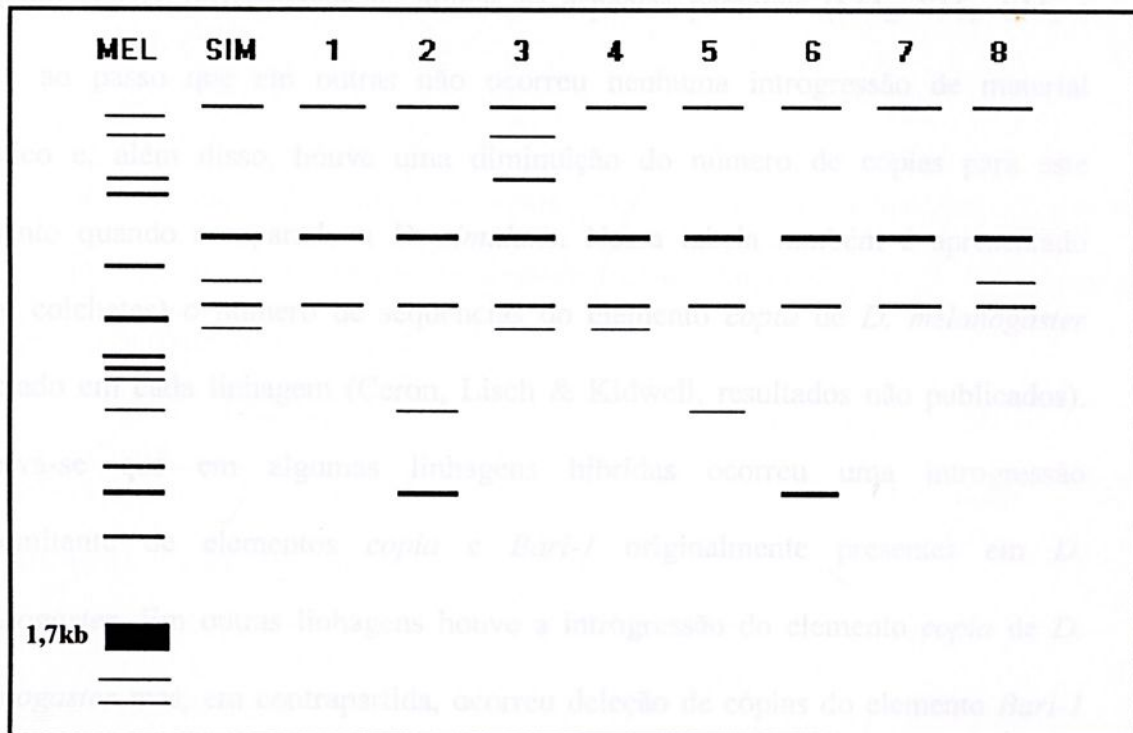


Figura 7. Representação esquemática do padrão de bandamento para o elemento *Bari-1* das linhagens parentais de *D. melanogaster*, *D. simulans* e das linhagens híbridas após a digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição *Hind III* e hibridização com a sonda de 703 pb. MEL: *D. melanogaster* IN(1)AB; SIM: *D. simulans* C167.4; de 1 a 8 linhagens híbridas SM₁ à SM₈, respectivamente.

A tabela 3 descreve o número de cópias para o elemento *Bari-1*, das linhagens parentais e das 8 linhagens híbridas, inferido a partir dos dados das figuras 6 e 7. Nessa tabela pode-se observar que algumas linhagens apresentam cópias do elemento *Bari-1* provenientes de ambas as espécies parentais (SM₂, SM₃, SM₅ e SM₆), ao passo que em outras não ocorreu nenhuma introgressão de material genético e, além disso, houve uma diminuição do número de cópias para este elemento quando comparado a *D. simulans*. Nessa tabela também é apresentado (entre colchetes) o número de seqüências do elemento *copia* de *D. melanogaster* detectado em cada linhagem (Ceron, Lisch & Kidwell, resultados não publicados). Observa-se que em algumas linhagens híbridas ocorreu uma introgressão concomitante de elementos *copia* e *Bari-1* originalmente presentes em *D. melanogaster*. Em outras linhagens houve a introgressão do elemento *copia* de *D. melanogaster* mas, em contrapartida, ocorreu deleção de cópias do elemento *Bari-1* de *D. simulans*. Pode-se observar também que uma das linhagens híbridas não apresenta seqüências do elemento *copia* de *D. melanogaster*, tendo inclusive ocorrido deleção da seqüência do elemento *Bari-1* de *D. simulans* (linhagem SM₇).

Tabela 3. Linhagens parentais de *D. melanogaster* e *D. simulans* e linhagens híbridas com respectivos números de cópias do elemento *copia* introgrididas de *D. melanogaster* e número de cópias do elemento *Bari-1*.

Linhagens	Número de Cópias*()
IN(1)AB de <i>D. melanogaster</i>	13 + arranjo em tandem
C167.4 de <i>D. simulans</i>	5
SM ₁ [6 copia (mel)]	3 (sim)*
SM ₂ [6 copia (mel)]	5 [3(sim) e 2(mel)]
SM ₃ [1 copia (mel)]	6 [4(sim) e 2 (mel)]
SM ₄ [1 copia (mel)]	4 (sim)
SM ₅ [6 copia (mel)]	4 [3(sim) e 1(mel)]
SM ₆ [6 copia (mel)]	4 [3(sim) e 1(mel)]
SM ₇ [0 copia (mel)]	3 (sim)
SM ₈ [6 copia (mel)]	4 (sim)

*(sim) = banda proveniente da espécie parental *D. simulans*

*(mel) = banda proveniente da espécie parental *D. melanogaster*

Com relação a análise realizada nas linhagens brasileiras pode-se verificar que o padrão e a distribuição do elemento *Bari-1* se deu de forma distinta, tanto nas linhagens de *D. melanogaster* como nas de *D. simulans*. De modo geral o elemento transponível *Bari-1* apresentou um maior número de cópias nas linhagens de *D. melanogaster* do que nas linhagens de *D. simulans*, em concordância com dados obtidos anteriormente por outros autores para essas espécies.

Nas figuras 8 e 9 pode ser observado que todas as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* analisadas neste trabalho apresentam uma banda de 1,7kb fortemente hibridizada, correspondente ao arranjo *em tandem* deste elemento, já mencionado. Além disso, observa-se que há uma variação no número de cópias do *Bari-1* comparando-se as linhagens brasileiras de *D. melanogaster*. Esse número variou de 3 para a linhagem de Santa Maria (RS) até 9 na linhagem de Novo Horizonte (SP), não considerando-se a banda de tamanho menor do que 1,7 kb, observada na primeira linhagem, provavelmente uma sequência deletada do elemento *Bari-1*.

Ainda nas figuras 8 e 9, podemos observar que as linhagens de *D. simulans* diferem daquelas de *D. melanogaster* quanto ao arranjo *em tandem* das seqüências do *Bari-1* e quanto ao número de cópias. Para *D. simulans* foram observados valores



nos números de cópias do *Bari-1* entre 1 nas linhagens de Bento Gonçalves (RS) e Novo Horizonte (SP); até 7 para a linhagem de Manaus (AM).



Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% do DNA de *Bari-1* em 12 lanes. Lane 1: marcador de peso molecular (DNA de *HindIII* digerido com *BamHI*). Lanes 2-12: DNA de *Bari-1* de diferentes linhagens. Lane 2: Bento Gonçalves (RS); Lane 3: Bento Gonçalves (RS); Lane 4: Bento Gonçalves (RS); Lane 5: Bento Gonçalves (RS); Lane 6: Bento Gonçalves (RS); Lane 7: Novo Horizonte (SP); Lane 8: Novo Horizonte (SP); Lane 9: Novo Horizonte (SP); Lane 10: Manaus (AM); Lane 11: Manaus (AM); Lane 12: Manaus (AM).

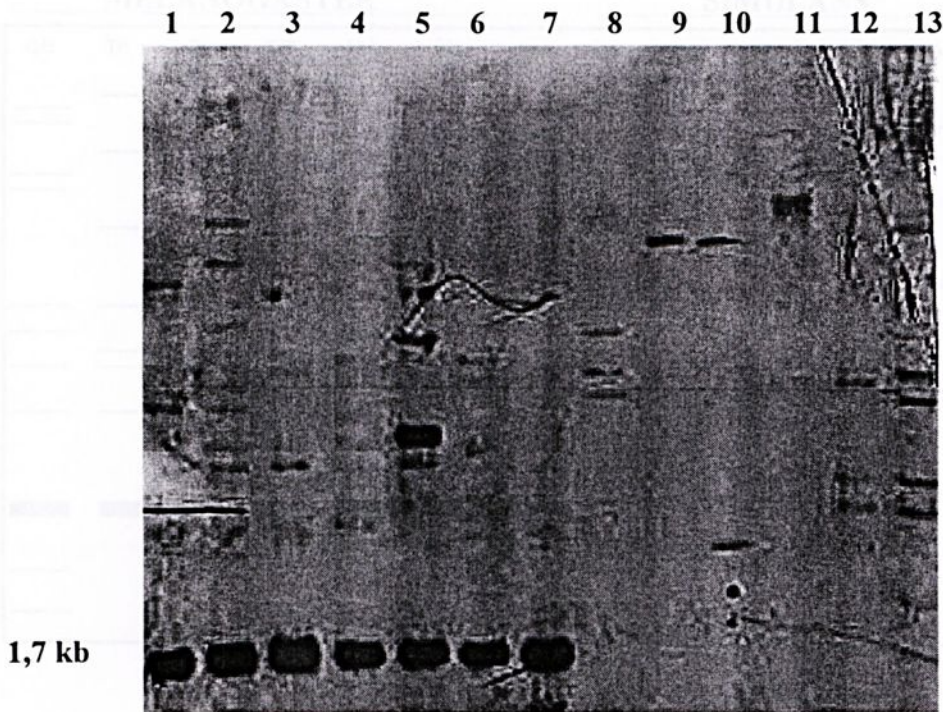
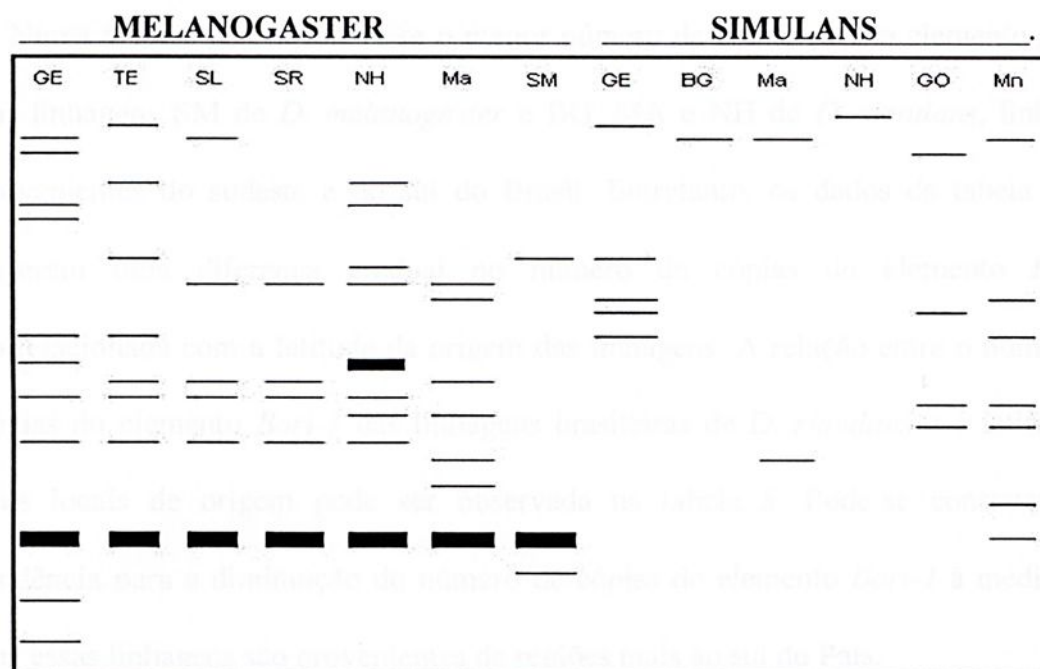


Figura 8. Southern blot do DNA genômico, digeridos com a endonuclease de restrição *Hind III* e hibridizados com o amplificado de 703 pb da sequência *Bari-1* em linhagens brasileiras de *Drosophila melanogaster* e *D. simulans*. Colunas 1 à 7: *D. melanogaster*; 1: IN(1)AB, 2: TE (Teresina, PI); 3: SL (São Luís, MA); 4: SR (Santana do Riacho, MG); 5: NH (Novo Horizonte, SP); 6: MA (Maringá, PR) e 7: SM (Santa Maria, RS). Colunas 8 à 13: *D. simulans*; 8: C167.4; 9: BG (Bento Gonçalves, RS); 10: MA (Maringá, PR); 11: NH (Novo Horizonte, SP); 12:GO (Goiânia, GO); 13: MN (Manaus, AM).



As tabelas 4 e 5 relacionam as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans*, as respectivas latitudes dos locais de coleta e o número de cópias do *Bari-1*. Numa análise geral observa-se o menor número de cópias para o elemento *Bari-1* nas linhagens SM de *D. melanogaster* e BG, MA e NH de *D. simulans*, linhagens provenientes do sudeste e do sul do Brasil. Entretanto, os dados da tabela 4 não sugerem uma diferença gradual no número de cópias do elemento *Bari-1*, correlacionada com a latitude da origem das linhagens. A relação entre o número de cópias do elemento *Bari-1* das linhagens brasileiras de *D. simulans* e a latitude de seus locais de origem pode ser observada na tabela 5. Pode-se constatar uma tendência para a diminuição do número de cópias do elemento *Bari-1* à medida em que essas linhagens são provenientes de regiões mais ao sul do País.

Tabela 5. Latitude dos locais de coleta das linhagens brasileiras de *D. simulans* e respectivos números de cópias do elemento *Bari-1*.

Linhagem	Latitude	<i>Bari-1</i>
MP	15° 37'	1
CU	20° 49'	2
MI	21° 29'	1
MA	21° 25'	2
BG	23° 18'	1

Tabela 4 . Latitude dos locais de coleta das linhagens brasileiras de *Drosophila melanogaster* e respectivos números de cópias do elemento transponível *Bari-1*.

Linhagem	Latitude	<i>Bari-1</i>
SL	2°32''	6
TE	5°09''	8
SR	18°20''	5
NH	21°29''	9
MA	23°25''	7
SM	30°02''	3

Tabela 5 . Latitude dos locais de coleta das linhagens brasileiras de *Drosophila simulans* e respectivos números de cópias do elemento transponível *Bari-1*.

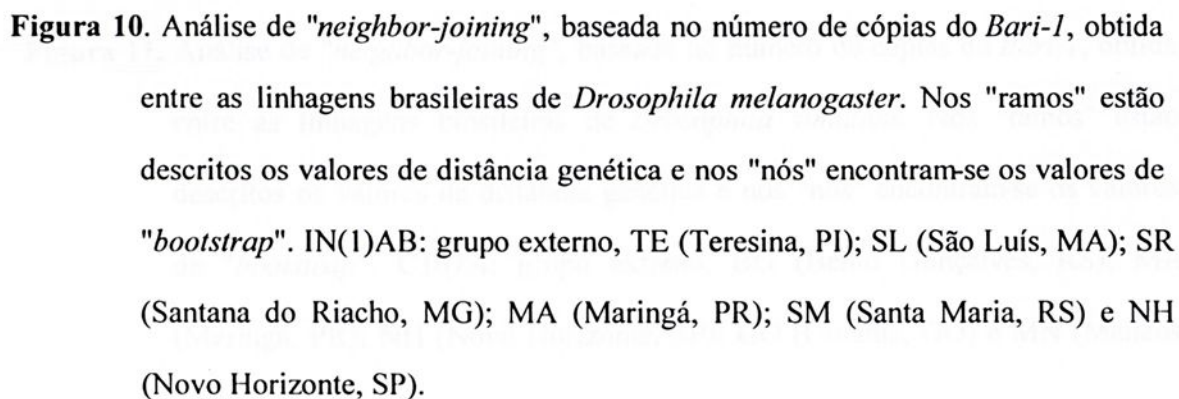
Linhagem	Latitude	<i>Bari-1</i>
MN	3°07''	7
GO	16°40''	4
NH	21°29''	1
MA	23°25''	2
BG	29°10''	1

As figuras 10 e 11 apresentam as relações de similaridade entre as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans*, respectivamente, baseadas na análise da distribuição das cópias do elemento *Bari-1*. Essas relações foram obtidas através da utilização do *software* PAUP versão 4.0 para *Windows* (Saitou & Nei, 1987).

Na figura 10 pode-se observar que as linhagens oriundas de localidades mais ao sul formam um grupo (linhagens de Maringá (MA) e Santa Maria (SM)), com exceção da linhagem proveniente de Novo Horizonte (NH) que, nessa análise, posicionou-se como um clado em separado. Nessa análise também, pode-se verificar que a linhagem SR, proveniente da região sudeste, mostrou maior grau de similaridade com a linhagem SL, originada do nordeste do país.

Na figura 11 está demonstrada uma outra análise de similaridade para as linhagens brasileiras de *D. simulans*. Nesse caso, podemos observar um agrupamento entre as linhagens oriundas de localidades mais ao sul e sudeste, correspondendo àquelas de Bento Gonçalves (BG), Maringá (MA) e Novo Horizonte (NH); e um segundo agrupamento, englobando aquelas de regiões do centro-oeste e norte, as linhagens de Goiânia (GO) e Manaus (MN).





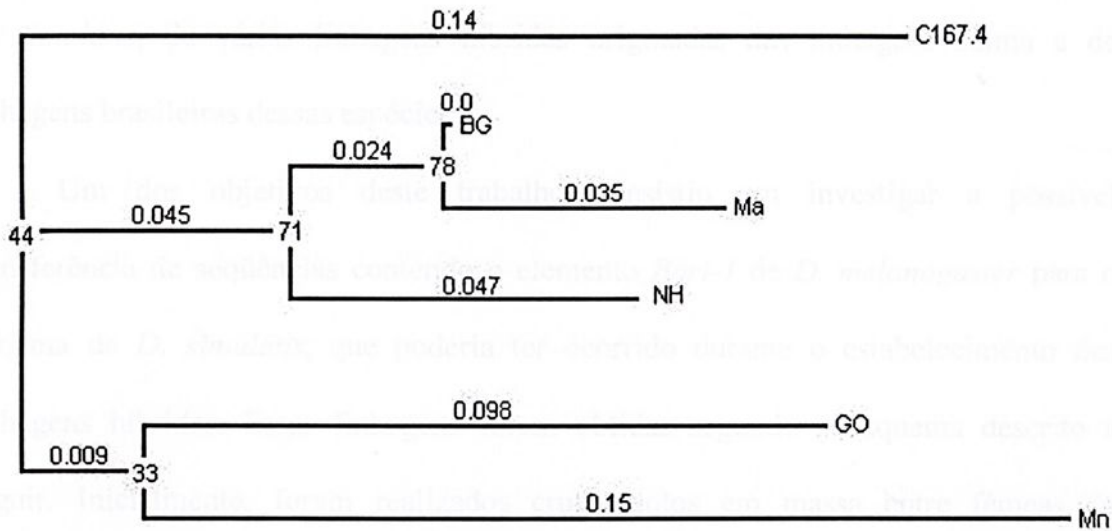


Figura 11. Análise de "neighbor-joining", baseada no número de cópias do *Bari-1*, obtida entre as linhagens brasileiras de *Drosophila simulans*. Nos "ramos" estão descritos os valores de distância genética e nos "nós" encontram-se os valores de "bootstrap". C167.4: grupo externo, BG (Bento Gonçalves, RS); MA (Maringá, PR); NH (Novo Horizonte, SP); GO (Goiânia, GO) e MN (Manaus, AM).

IV – DISCUSSÃO

Neste estudo realizamos uma análise da distribuição do elemento transponível *Bari-1* nos genomas das linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster*, C167.4 de *D. simulans*, de várias linhagens híbridas originadas das linhagens acima e de linhagens brasileiras dessas espécies.

Um dos objetivos deste trabalho consistiu em investigar a possível transferência de seqüências contendo o elemento *Bari-1* de *D. melanogaster* para o genoma de *D. simulans*, que poderia ter ocorrido durante o estabelecimento das linhagens híbridas. Essas linhagens foram obtidas segundo o esquema descrito a seguir. Inicialmente, foram realizados cruzamentos em massa entre fêmeas da linhagens C167.4 de *D. simulans* e machos da linhagem IN(1)AB de *D. melanogaster*. Algumas fêmeas parentais produziram larvas viáveis, dando origem a machos (estéreis) e fêmeas híbridas F₁. Estas foram retrocruzadas individualmente com machos *D. simulans* (o cruzamento no sentido oposto mostrou-se inviável), sendo que apenas uma produziu descendentes (novamente os machos eram estéreis). As fêmeas dessa segunda geração foram novamente retrocruzadas com machos *D. simulans*, dando origem, agora, a machos e fêmeas férteis. O cruzamento "entre irmãos" de uma dessas descendentes fêmea com um desses machos deu origem a todas as linhagens híbridas utilizadas neste trabalho. Essas linhagens apresentavam



inicialmente 7 cópias do elemento *copia* de *D. melanogaster*. Posteriormente foi verificado que 6 desses fragmentos permaneciam geneticamente ligados, enquanto que o sétimo tornara-se independente, indicando que a introgressão do material genético de *D. melanogaster* que deu origem às linhagens híbridas incluiu pelo menos 2 regiões não recombinantes (Ceron, Lisch & Kidwell, resultados não publicados).

Os resultados das figuras 6 e 7 mostram que as linhagens híbridas SM₂, SM₃, SM₅ e SM₆ apresentam seqüências do elemento transponível *Bari-1* que são originárias de *D. melanogaster*, indicando que a hibridização e a introgressão de material genético de fato ocorreu. Recentemente, Sawamura *et al.* (2000) demonstraram a introgressão de um complexo de seis genes de esterilidade para o genoma de *D. melanogaster* a partir de cruzamentos com determinadas linhagens de *D. simulans*. Introgressão de material genético também foi observada entre as *Drosophila buzzatii* e *D. koepferae*, originando linhagens híbridas estáveis, provavelmente devido ao fato de que fatores que impedem a instabilidade cromossômica são ocasionalmente introduzidos nos híbridos (Marin & Fontdevila, 1998).

De acordo com Capy *et al.* (1998), embora a transferência horizontal seja freqüentemente invocada, ao menos dois mecanismos operam com certeza na transferência de material genético entre espécies sexualmente isoladas: através de



vetores ou via produção de híbridos férteis que se retrocruzem com uma das espécies parentais. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram esta hipótese.

Ainda com base nos nossos resultados, poderíamos aventar a possibilidade de que a origem do elemento transponível *Bari-1* em *Drosophila simulans* teria ocorrido através de transferência horizontal via hibridização introgressiva com *D. melanogaster*. Nesse caso, o estabelecimento do *Bari-1* no genoma de *Drosophila simulans* poderia ter acontecido por transposição ou recombinação de seqüências inicialmente presentes no genoma de *D. melanogaster*. O fato de que essas duas espécies possuam linhagens que produzem híbridos férteis, tais como IN(1)AB de *D. melanogaster* e C167.4 de *D. simulans*, reforça essas observações. Além disso, vários estudos têm demonstrado a ocorrência de híbridos naturais entre essas duas espécies (Sperlich; 1962; Tracey *et al.*, 1973; Ménsua & Pérez, 1977; Kamping & van Delden, 1988; Carracedo *et al.*, 1998).

Estudos mais recentes têm demonstrado que a hibridização interespecífica entre *Drosophila buzzatii* e *D. koepferae* leva a um aumento na taxa de transposição do retroelemento *Osvaldo*, sem contudo causar esterelidade nos híbridos (Labrador *et al.*, 1999).

Como já mencionado, o elemento *Bari-1* possui cópias eucromáticas e heterocromáticas que são idênticas, tanto no tamanho quanto na seqüência, o que

sugere que sejam elementos ativos em ambas as porções do genoma nas quais estão localizados (Caizzi, 1993).

Embora não seja possível determinar se a passagem do elemento transponível *Bari-1* para o genoma de *D. simulans* tenha ocorrido por transposição ou recombinação pode-se fazer uma análise através de alguns indicativos. Pode-se sugerir que a transferência do elemento transponível *Bari-1* que ocorreu nas linhagens híbridas analisadas teria acontecido por um processo de transposição, pelo menos para as cópias que se fixaram na heterocromatina.

Segundo Montgomery, Charlesworth & Langley (1987) o acúmulo de elementos transponíveis na heterocromatina resulta de um efeito combinado da inércia genética e da pouca habilidade que esta parte do genoma tem de sofrer recombinação.

Adicionalmente, Brooks & Marks (1986) mostraram que variações na heterocromatina podem alterar a taxa de recombinação no mesmo e em outros cromossomos em *Drosophila melanogaster* diminuindo, dessa maneira, a possibilidade de *crossing-over* entre cromossomos homólogos.

Muitos estudos com elementos transponíveis têm apontado para a mutabilidade de genes heterocromáticos causada por eventos transposicionais. Por exemplo, um conjunto de treze genes vitais, mapeados na heterocromatina do



segundo cromossomo de *D. melanogaster* são altamente mutáveis devido a transposição do fator *I* na disgenesia híbrida I-R (Dimitri *et al.*, 1997).

A produção de linhagens híbridas férteis através de cruzamentos entre as linhagens IN(1)AB de *D. melanogaster* e C167.4 de *D. simulans* talvez possa ser resultante de mutações ou interferências em genes ou regiões genômicas que seriam responsáveis pela manutenção do isolamento sexual entre essas espécies. Em *Drosophila hydei* elementos transponíveis *micropia* foram descobertos como constituintes de genes de fertilidade tipo selvagem (Lankenau *et al.*, 1992).

Entretanto, estudos adicionais serão necessários para a elucidação dos prováveis efeitos transposicionais que poderiam afetar genes ou regiões cromossômicas relacionadas à viabilidade e/ou fertilidade dessas espécies, resultantes da localização e do arranjo do elemento transponível *Bari-I* nos genomas das linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster*, C167.4 de *D. simulans* e das linhagens híbridas férteis.

Os resultados das figuras 6 e 7 mostram também que para algumas linhagens híbridas ocorreu uma deleção de cópias inicialmente presentes no genoma de *D. simulans*, como por exemplo, para as linhagens SM₁, SM₄, SM₇ e SM₈. Nesses casos, talvez essas seqüências tenham sido deletadas por eventos de recombinação. Neste aspecto torna-se interessante a análise da linhagem SM₇, a qual não contém nenhuma seqüência do elemento *copia* de *D. melanogaster*. Esta linhagem é derivada



da linhagem SM₄ que apresenta apenas 1 seqüência deste retrotransposon, originária de *D. melanogaster*. A análise da linhagem SM₇, nos indica que também houve deleção para 2 cópias do elemento *Bari-1*, presente inicialmente em *D. simulans*. Assim, é possível levantarmos a hipótese de que a deleção das seqüências dos elementos *copia* e *Bari-1* nessa linhagem tenha ocorrido num único evento de recombinação.

Outro objetivo deste trabalho foi comparar linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans*, quanto à ocorrência e distribuição do elemento transponível *Bari-1*.

Os resultados das figuras 8 e 9 para as linhagens brasileiras mostram que o elemento transponível *Bari-1* tem uma distribuição peculiar para cada espécie, destacando-se particularmente a seqüência de 1,7 kb presente em todas as linhagens de *D. melanogaster*. Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos por Caggese *et al.* (1995) analisando outras linhagens. Esses autores demonstraram que a principal diferença entre essas duas espécies crípticas é a presença de um longo arranjo *em tandem* do *Bari-1* na heterocromatina do cromossomo 2 de *D. melanogaster*, com aproximadamente 80 cópias, com um comprimento de 1,7 kb por cópia. Tal arranjo não é observado em *D. simulans*, onde cópias do elemento *Bari-1* estão dispersas pelo genoma.



Outro aspecto a ser ressaltado ainda nas figuras 8 e 9 é o maior número de cópias para o *Bari-1* observado nas linhagens de *D. melanogaster*. Em nosso trabalho detectamos nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster* uma variação de 3 até 9 cópias deste elemento, ao passo que, para *D. simulans*, esses números correspondem de 1 a 7. Dados de Caggese *et al.* (1995) indicam de 2 a 29 cópias para *D. melanogaster* e de 3 a 11 para *D. simulans*. Uma possível explicação para o maior número de cópias do *Bari-1* em *D. melanogaster* pode ser fornecida pelas observações de Biemont & Cizeron (1999), os quais verificaram que existe um maior número de sítios de inserção para vários elementos transponíveis no genoma de *D. melanogaster* em comparação à *D. simulans*.

Boussy(1987) e Boussy & Kidwell (1987) observaram uma forte clina latitudinal de disgenesia gonadal em populações de *D. melanogaster* do leste da Austrália em relação ao elemento *P*. O padrão de clina englobava três regiões, nas quais as populações eram qualitativamente uniformes: região norte, com populações *P* (possuíam elementos *P* potencialmente ativos e forte habilidade repressora), região central com populações *Q* (não possuíam elementos *P* ativos mas podiam reprimir tais elementos em determinados cruzamentos), e região sul com populações predominantemente *M* (não demonstravam nenhuma atividade *P* e eram relativamente fracas na capacidade de reprimir elementos ativos introduzidos). Os trabalhos acima citados indicaram a existência de



clínima observaram que, mesmo não ocorrendo uma clina para a distribuição do elemento *P* entre as linhagens, algumas diferenças foram constatadas.

Nossos resultados da tabela 4, obtidos para as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* indicam que não há uma tendência para a diminuição do número de cópias do *Bari-1* correlacionada com a latitude dos locais de origem das linhagens, muito embora a linhagem SM (Santa Maria, RS) tenha apresentado o menor número de seqüências deste elemento. Os dados apresentados na figura 10 mostram agrupamentos que podem ser relacionados com a distribuição geográfica. Por exemplo, a linhagem NH, proveniente de Novo Horizonte, SP, apresentou-se como um grupo externo, muito distante da linhagem SR, proveniente de Santana do Riacho, MG; embora a latitude dos seus locais de origem sejam próximas.

Já, para as linhagens brasileiras de *D. simulans*, pode-se verificar que há uma diminuição do número de cópias do *Bari-1*, à medida em que essas linhagens são provenientes de localidades situadas mais ao sul (tabela 5). Pode-se também verificar na Figura 11 que as linhagens originadas de regiões de clima relativamente mais frio encontram-se agrupadas (SM, MA e NH); enquanto que aquelas coletadas em regiões mais quentes apresentam-se como um clado separado (GO e MN).

Daniels *et al.* (1990) especularam que o fato de ocorrer uma limitação do número de cópias de elementos *P* no genoma das linhagens de *D. melanogaster* oriundas de regiões de clima mais quente poderia de alguma maneira minimizar os



V. CONCLUSÕES

efeitos deletérios da disgenesia híbrida, uma vez que esta característica se manifesta em temperaturas superiores a 25° C. Entretanto, para o elemento *Bari-1*, ainda não é possível se estabelecer uma ligação entre efeitos fenotípicos relacionados ao número de cópias e atividade deste elemento em função da temperatura ambiente.

as espécies.

A comparação da presença e função de seqüências do elemento *Bari-1* oriundas de *D. melanogaster* em linhagens híbridas, mostram que ocorreu introgressão de material genético de *D. melanogaster* para o genoma de *D. simulans*.

Os resultados mostram que todas as linhagens locais de *D. melanogaster* apresentam um maior número de cópias do elemento transposível *Bari-1* do que as linhagens de *D. simulans*.

Não foi possível relacionar número de cópias do elemento transposível *Bari-1* com localidade geográfica para *D. melanogaster*, entretanto para *D. simulans* houve uma graduação de número de cópias em função da origem do local de coleta da linhagem. Neste gráfico de número de cópias observou-se que as linhagens provenientes do sul do país apresentam um menor número de cópias de *Bari-1* em relação às que são provenientes do norte.

V. CONCLUSÕES

O elemento transponível *Bari-1* está presente nas linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster*, C167.4 de *Drosophila simulans*, nas linhagens híbridas derivadas das linhagens acima e em todas linhagens brasileiras analisadas de ambas as espécies.

A constatação da presença e fixação de seqüências do elemento *Bari-1* originárias de *D. melanogaster* nas linhagens híbridas, mostram que ocorreu introgressão de material genético, de *D. melanogaster* para o genoma de *D. simulans*.

Os resultados mostram que todas as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* apresentam um maior número de cópias do elemento transponível *Bari-1* do que as linhagens de *D. simulans*.

Não foi possível relacionar número de cópias do elemento transponível *Bari-1* com localidade geográfica para *D. melanogaster*, entretanto para *D. simulans* houve uma gradação do número de cópias em função da origem do local de coleta da linhagem. Neste gradiente de número de cópias observou-se que as linhagens provenientes do sul do país apresentam um menor número de cópias do *Bari-1* em relação às que são provenientes do norte.



VI. RESUMO

Neste trabalho realizamos uma análise da ocorrência e distribuição do elemento transponível *Bari-1* nas linhagens IN(1)AB de *Drosophila melanogaster*, C167.4 de *D. simulans* e em oito linhagens híbridas originárias de cruzamentos envolvendo fêmeas *D. simulans* e machos *D. melanogaster* das linhagens acima citadas. Também foram analisadas linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* provenientes de diversas localidades brasileiras. Análises por PCR mostraram a presença do elemento *Bari-1* em todas as linhagens. Hibridização em membranas usando-se uma sonda de 703 pb, específica para o *Bari-1*, mostrou que quatro das linhagens híbridas apresentavam cópias deste elemento de ambas espécies parentais, indicando a ocorrência de introgressão de material genético de *D. melanogaster* em *D. simulans*. Entretanto, para as outras quatro linhagens híbridas foram observadas deleções de seqüências do elemento *Bari-1*, inicialmente presentes na linhagem parental *D. simulans*. O padrão de distribuição do elemento *Bari-1* nas linhagens brasileiras de ambas as espécies foi similar ao já descrito na literatura. Em geral, as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* apresentaram um número maior de cópias do *Bari-1* comparadas à *D. simulans*. As linhagens brasileiras de *D. melanogaster* não apresentaram uma gradação do número de cópias do elemento *Bari-1* em função

das suas localizações geográficas. As linhagens brasileiras de *D. simulans*, no entanto, apresentaram uma gradação do número de cópias do elemento *Bari-1*, sendo esse número menor para as linhagens do sul. Para *D. simulans* foi possível a construção de uma árvore filogenética baseada na distribuição das seqüências do *Bari-1*, na qual as linhagens do norte e centro-oeste do país formaram um grupo e aquelas do sudeste e sul um outro grupo.

Palavras-chaves: elementos transponíveis, *Bari-1*, híbridos, introgressão, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*



VII. SUMMARY

In this work we analysed the occurrence and distribution of the *Bari-1* transposable element in *Drosophila melanogaster* (strain IN(1)AB) and its sibling specie *D. simulans* (strain C167.4) and in eight hybrid lineages derived from initial crosses involving *D. simulans* females and *D. melanogaster* males of the above strains. It was also analysed several Brazilian strains of both species from different localities. Preliminary PCR data showed that *Bari-1* element was present among all strains or hybrid lineages. Membrane hybridization with a 703bp homologous *Bari-1* sequence probe showed that some hybrid lineages presented *Bari-1* sequences related to both parental species, suggesting an introgression of *D. melanogaster* genetic material in the background of *D. simulans*. However this was not true for other lineages which presented deletions of *D. simulans Bari-1* sequences. The distribution patterns of *Bari-1* element among Brazilian strains of both species followed the general distribution already found for them. *D. melanogaster* strains always presented a higher number of *Bari-1* element compared to *D. simulans* strains. For *D. melanogaster* Brazilian strains, it was not observed a correlation between the number of *Bari-1* sequences and their geographical origins. For *D. simulans* strains however there is a decreasing gradient in the number of *Bari-1*



VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

copies toward the South. Neighbor-joining analysis for distribution of *Bari-1* sequences in *D. simulans* Brazilian strains allowed a construction of a phylogenetic tree in which the strains from North and West were grouped, and those from Southeast and South were joined in another group.

HEIMONT, C. & CHAZOT, O. Distribution of transposable elements in *Drosophila species*. *Genetics*, v. 103, p. 41-53, 1993.

BINGHAM, P.M., KIDWELL, M.G., RICHARDS, G.M. The molecular basis of the P-M hybrid dysgenesis: the role of P elements as P strain transposon family. *Cell*, v. 29, p. 795-804, 1981.

BINGHAM, P.M., ZALLAR, Z. Reproductive and the P-M transposon. *Cell* *Drosophila melanogaster*. In: BIRCH, D.E., HOWE, M.M. (Eds.) *Molecular Drosophila*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1989. P. 485-502.

Keywords: transposable elements, *Bari-1*, hybrids, introgression, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*.

18, 1987.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELS, R. & PEACOCK, W.J. The arrangement and evolution of highly repeated (satellite) DNA sequences with special reference to *Drosophila*. *Int. Rev. Cytol. (Suppl.)*, v.8, p.69-126, 1978.
- BIÉMONT, C. & CIZERON, G. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. *Genetica*, v.105, p. 43-62, 1999.
- BINGHAN, P.M., KIDWELL, M.G., RUBIN, G.M. The molecular basis of the P-M hybrid dysgenesis: the role of *P* element, a *P* strain transposon family. *Cell*, v.29, p.995-1004, 1982.
- BINGHAN, P.M., ZAHAR, Z. Retrotransposons and the *FB* transposon from *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed.). *Mobile DNA*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1989. P. 485-502.
- 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.; KIDWEEL, 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.

BROOKS, L. D. & MARKS, R. W. The organization of genetic variation for recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 114, p. 525-547, 1986.

CAGGESE, C., PIMPINELLI, S., BARSANTI, P. & CAIZZI, R. The distribution of the transposable element *Bari-1* in the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* genomes. *Genetica*, v.96, p. 269-283, 1995.

CAIZZI, R., CAGGESE, C. & PIMPINELLI, S. *Bari-1*, a new transposon-like family in *Drosophila melanogaster* with a unique heterocromatic organization. *Genetics*, v.133, p.335-345, 1993.

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



CARRACEDO, M. C., ASENJO, A., CASARES, P. Inheritance mode of *Drosophila simulans* mating propensity with *D. melanogaster* males. *The Journal of Heredity*, v. 89, p. 101-104, 1998.

CROZATIER, M., VAURY, C., BUSSEAU, I., PÉLISSON, A. & BUCHETON, A. Structure and genomic organization of I elements involved in I-R hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.*, v.16, p.9199-9213, 1988.

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.

DAVIS, A W.; ROOTE, J.; MORLEY, T.; SAWAMURA, K.; HERRMAN, S. & ASHBURNER, M. Rescue of hybrid sterility in crosses between *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Nature*, v.380, p. 157-159, 1996.

DI NOCERA, P.P., GRAZIANI, F. & LAVORGNA, G. Genomic and structural organization of *D. melanogaster* G elements. *Nucleic Acid Res.*, v.14, p.675-691, 1986.



DIMITRI, P., ARCÀ, B., BERGHELLA, L., MEI, E. High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like *I* factor in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, v.94, p. 8052-8057, 1997.

DOOLITTLE, W.F., SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotypic paradigm and genomic evolution. *Nature*, v.284, p. 601-603, 1980.

ENGELS, W.R., JOHNSON-SCHLITZ, D.M., EGGLESTON, W.B. High frequency *P* element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell*, v.47, p.793-806, 1990.

FINNEGAN, D.J. Eucaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, v.5, p.103-107, 1989.

HICKEY, D.A. Selfish DNA: a sexually transmitted nuclear parasite. *Genetics*, v.106, p.519-531, 1982.

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. 1125-1129, 1991.

HUTTER, P. Genetics of Hybrid Inviability in *Drosophila*. *Advances in Genetics*, v.36, p.157-185, 1997.

HUTTER, P., ROOTE, J. & ASHBURNER, M. A genetic basis for the inviability of hybrids between sibling species of *Drosophila*. *Genetics*, v. 124, p.909-920, 1990.

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

KAMPING, A., VAN DELDEN, W. Hybridization between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* in nature. *DIS*, v. 67, p. 53, 1988.

LABRADOR, M., FARRE, M., UTZET, F. & FONTDEVILA, A. Interspecific hybridization increases transposition rates of *Osvaldo*. *Molecular Biology and Evolution*, n.16, v.7, p.931-937, 1999.

LANKENAU, D. H. The retrotransposon family *micropia* in *Drosophila* species. *Genetica*, v. 86, p. 230-239, 1992.



LEWIN, B. *Genes V*. New York: Oxford University Press, 1994. 1272 p.

MARIN, I., FONTDEVILA, A. Stable *Drosophila buzzatii* *Drosophila koepferae* hybrids. *Journal of Heredity*, n.89, v.4, p. 336-339, 1998.

MENSUA, J. L., PEREZ, M. Hybridization in nature of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *DIS*, v.52, p. 60, 1977.

MONTGOMERY, E. A, CHARLESWORTH, B., LANGLEY, C. H. A test for the role of natural selection in the stabilization of transposable element copy number in a population of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, v.49, p.31-41, 1987.

MOSCHETTI, R.; CAGGESE, C.; BARSANTI, P.; CAIZZU, R. Intra- and Interspecies Variation among *Bari-1* elements of the *Melanogaster* species group. *Genetics*, v.150, p-239-250, 1998.

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.



- ORR, H. A. The unexpected recovery of hybrids in a *Drosophila* species cross: a genetic analysis. *Genet. Res. Camb.*, v. 67, p 11-18, 1996.
- ORGEL, L.E. & CRICK, F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, v.284, p.604-607, 1980.
- ROZENZWEIG, B., LIAO, L.W. & HIRSH, D. Sequence of the *C.elegans* transposable element Tc1. *Nucleic Acids Res.*, v.11. p.4201-4209, 1983.
- SAITOU, N. & NEI, M. Neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetics trees. *Molecular Biology Evolution*, v.4, p.407-425, 1987.
- SAWAMURA, K., DAVIS, A. W., WU, C. Genetic analysis of speciation by means of introgression into *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, v. 97, n.6, p. 2652-2655, 2000.
- SPERLICH, D. Hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* in nature. *DIS*, v. 36, p. 118, 1962.

STRECK, R.D., MACGAFFEY, J.E. & BECKENDORF, S.K. The struture of hobo transposable elements and their insertion sires. *EMBO J*, v.5, 1986.

STURTEVANT, A. H. Genetic studies on *Drosophila simulans*. I. Introduction. Hybrids with *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.5,p. 488-500, 1920.

TRACEY, M. L., PAVLOSKY, O., GREEN, M. M. Hybridization of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *DIS*, v. 50, p. 77, 1973.

VAURY, C., BUCHETON, A. .& PÉLISSON, A. The β -heterochromatic sequences flanking the I elements are themselves defective transposable elements. *Chromosoma*, v.98, p. 215-224., 1989.p.3615-3623, 1986.

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

ZAHA, A. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336p.



