

JULIANA MONTÁ LAGE

ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA DOMINÂNCIA
NUCLEOLAR EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS
OBTIDOS DE CRUZAMENTOS ENTRE
Drosophila mulleri E *D. arizonae*

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2005



1910001398



JULIANA MONTÁ LAGE

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA DOMINÂNCIA
NUCLEOLAR EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS
OBTIDOS DE CRUZAMENTOS ENTRE**

Drosophila mulleri* E *D. arizonae



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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2005

Agradecimentos

Várias pessoas passaram por mim durante esses dois anos de trabalho e deixaram suas marcas e contribuições para que tudo tivesse o melhor final possível. É a essas pessoas a quem dedico este trabalho e por quem sinto enorme gratidão. A todas elas, e meu verdadeiro obrigado!

✓ Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron por quem guardo grande admiração, por

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

✓ A amiga Letiane Silva Corrêa pelo grande auxílio na obtenção de híbridos,

pela disposição em ajudar a qualquer momento e, principalmente, pela amizade.

✓ Ao Luis Gustavo Araújo Gardinassi pelo grande apoio com a técnica, por ter

me acompanhado sem se incomodar, disponibilizando seu tempo.

Agradecimentos

Várias pessoas passaram por mim durante esses dois anos de trabalho e deixaram suas marcas e contribuições para que tudo tivesse o melhor final possível. É a essas pessoas a quem dedico este trabalho e por quem sinto enorme gratidão. A todas elas, o meu verdadeiro obrigado!

✓ Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron por quem guardo grande admiração, por ter me aceito como sua aluna e por todo auxílio e boa vontade que sempre teve comigo. Pelo seu exemplo de profissionalismo, pelo incentivo constante a vencer os obstáculos. Um verdadeiro amigo que entendeu e ajudou a superar os momentos mais difíceis desses últimos anos.

✓ À Profa. Dra. Paula Rahal pela grande ajuda no projeto, por permitir o uso de seu laboratório, dispensando para isso, tanto espaço como grande atenção e interesse. Pelas palavras de estímulo e pela boa vontade em me ajudar a solucionar as dúvidas.

✓ À Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto pelo incentivo e boas idéias tanto na disciplina, como nas reuniões dos laboratórios e até mesmo nos corredores do departamento.

✓ À Profa. Dra. Hermione E. M. C. Bicudo pelo grande incentivo e tudo o que já fez pela pesquisa, principalmente na área estudada.

✓ À amiga Leliane Silva Commar pelo grande auxílio na obtenção de híbridos, pela disposição em ajudar a qualquer momento e, principalmente, pela amizade.

✓ Ao Luiz Gustavo Araújo Gardinassi pela grande ajuda com a técnica, por ter me acompanhado sem se incomodar, disponibilizando seu tempo.

- ✓ Ao Marcos de Lucca Júnior pela grande ajuda principalmente nos momentos de maiores dúvidas, a quem eu sempre recorri e sempre me incentivou da melhor maneira possível.
- ✓ À Paola J. Scarin Provazzi pela grande ajuda com a técnica nos momentos em que tudo parecia que não daria certo
- ✓ Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar e à Profa. Dra. Priscila Bellintani e demais estagiários que sempre me atenderam muito bem, disponibilizando tempo e atenção com as fotos.
- ✓ À Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral que disponibilizou seu laboratório e pela sua simpatia.
- ✓ À Melissa Nunes Mizziara e à Nedênia Stafuzza, alunas do Laboratório de Genômica Comparativa, pela grande atenção e disponibilidade nas revelações das fotos.
- ✓ À Luciane Madureira, pela ajuda e disponibilidade em relação à técnica.
- ✓ À Profa. Dra. Claudia R. Bonini Domingos que também disponibilizou seu laboratório para as revelações das fotos, e pela atenção e simpatia.
- ✓ Ao Carlos Fabián Mendiburu e à Paula Juliana Antoniazzi Zamaro que também disponibilizaram atenção em revelações de fotos.
- ✓ À Profa. Dra. Gisèle Manganelli Fernandes, do Departamento de Letras Modernas deste Instituto, pelo auxílio na tradução do Abstract.
- ✓ Ao amigo Luis Gustavo da Conceição Galego, pela sua amizade, atenção, conselhos e todo tipo de ajuda que sempre veio com carinho e boa vontade.
- ✓ Ao Hamilton, pela ajuda em todos os momentos, e pela constante preocupação.
- ✓ Ao Vitor e ao Rafael, pela companhia, discussões pertinentes e muitos risos que alegram a nossa vida.

✓ À Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira, técnica do laboratório, pela grande ajuda, incentivo e idéias.

✓ À Elisabeth, mais conhecida como D. Betinha, que tão gentilmente e com tanto carinho me atendeu e colaborou para que tudo desse certo.

✓ Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética, que direta ou indiretamente ajudaram para que esse trabalho tivesse êxito, minha admiração e respeito por todos.

✓ Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, que sempre me receberam com atenção e carinho.

✓ Às companheiras de mestrado Francine, Márcia, Marília, Nathália e Tatiana, pela companhia e amizade. Desejo a vocês boa sorte!

✓ Aos técnicos Sebastião e Paulo, que preparavam os meios de cultura, pela disponibilidade de ajudar no momento em que mais precisei.

✓ À Direção do IBILCE pelo apoio ao Programa.

✓ A CAPES pelo auxílio financeiro.

✓ À minha prima, Profª. Dra. Ana Lúcia Marsílio, pelo incentivo que sempre recebi da sua parte, e por ser um exemplo na minha vida.

✓ Aos meus pais que sempre me incentivaram, principalmente nos momentos em que tudo parecia dar errado, e jamais me deixaram desistir.

✓ Ao meu irmão, Gabriel, pelo incentivo e por seu carinho.

✓ Ao meu namorado, Rafael, pelo seu carinho, atenção e paciência tanto na minha ausência quanto para me escutar nos momentos de maiores dificuldades.

✓ A Deus, pela vida e pelo dom do conhecimento. Agradeço por tudo o que Ele me ajudou durante esse período.

A todos, o meu sincero e mais concreto muito obrigada!

Somário

I. Introdução	08
1.1. Origem do grupo regêla	09
1.2. DNA e RNA ribossômica	11
1.3. Regiões organizadoras nucleolares	14
1.4. Dominância nuclear	17
II. Objetivos	20
2.1. Objetivos	21
III. Resultados	22
IV. Conclusões	47
4.1. Conclusões gerais	48
V. Referências Bibliográficas Gerais	50
5.1. Referências Bibliográficas Gerais	51
VI. Resumo	63
6.1. Resumo	64
VII. Abstract	65
7.1. Abstract	66

“Não sei como o mundo me vê, mas me sinto como um menino andando pela praia, achando aqui e ali uma pedrinha mais lisa e uma concha mais bonita, tendo ainda pela frente o grande oceano da Verdade.”

Isaac Newton (1643-1727)

Sumário

I. Introdução	08
1.1. Origem do grupo repleta	09
1.2. DNA e RNA ribossômicos	11
1.3. Regiões organizadoras nucleolares	14
1.4. Dominância nucleolar	17
II. Objetivos	20
2.1. Objetivos	21
III. Resultados	22
IV. Conclusões	47
4.1. Conclusões gerais	48
V. Referências Bibliográficas Gerais	50
5.1. Referências Bibliográficas Gerais	51
VI. Resumo	63
6.1. Resumo	64
VII. Abstract	65
7.1. Abstract	66

1.1. O GRUPO REPLETA DO GÊNERO *Drosophila* L. MÜLLER E *D. ARIZONA*

Os dados da literatura indicam que a família Drosophilidae sofreu várias radiações durante a período Eoceno, uma das quais deu origem ao gênero *Drosophila*, há aproximadamente 50 milhões de anos. A intensa diversificação de grupos dentro desse gênero, observada atualmente, é resultado de derivações sucessivas em períodos posteriores. Uma dessas radiações, denominada radiação virilis-repleta, originou o grupo repleta no continente americano (THROCKMORTON, 1973). Esse grupo é constituído atualmente por no mínimo 96 espécies, que ocupam diferentes habitats. Quase a maioria dessas espécies são cariofilas na natureza, isto é, realizam o ciclo de vida utilizando-se de carios em decomposição e por esta razão sua distribuição depende da distribuição dessas vegetais, característica que tem permitido a várias espécies do grupo repleta ocuparem os desertos e zonas semi-áridas do Novo Mundo (WASSERMAN, 1982, 1990; EIGES et al., 2001; TIDON-SKLORZ & SENE, 2001). O grupo repleta atualmente é dividido em 6 subgrupos: *mulleri*, *repleta*, *mercurialis*, *hydei*, *lisa* e *facicola* (VILELA, 1983; RAFAEL & ARCOS, 1989). O subgrupo *mulleri*, por sua vez, apresenta 44 espécies e subdivide-se em 5 subgrupos: *huxleyi*, *crenophila*, *meridiana* e *arizonae*. O complexo *mulleri* está subdividido em quatro clusters (*majuscula*, *mulleri*, *longicornis* e *richi*). No cluster *majuscula*, encontramos as espécies *Drosophila majuscula*, *D. arizonae* e *D. novae*. No cluster *mulleri* estão as espécies *D. mulleri*, *D. aldrichi*, *D. wheeleri*, *D. nigrodumosa*, *D. huxleyi*, *D. mayaguana*, *D. strabus* e *D. parvifera* (DURANDO et al., 2006).

I. INTRODUÇÃO

1.1. O GRUPO REPLETA DO GÊNERO *DROSOPHILA*, *D. MULLERI* E *D. ARIZONAE*

Os dados da literatura indicam que a família Drosophilidae sofreu várias radiações durante o período Eoceno, uma das quais deu origem ao gênero *Drosophila*, há aproximadamente 60 milhões de anos. A extensa diversificação de grupos dentro desse gênero, observada atualmente, é resultante de derivações sucessivas em períodos posteriores. Uma dessas radiações, denominada radiação virilis-repleta, originou o grupo repleta no continente americano (THROCKMORTON, 1975). Esse grupo é constituído atualmente por no mínimo 96 espécies, que ocupam diferentes habitats. Quase a metade dessas espécies são cactofílicas na natureza, isto é, realizam o ciclo de vida utilizando-se de cactos em decomposição e por esta razão sua distribuição depende da distribuição desses vegetais, característica que tem permitido a várias espécies do grupo repleta ocuparem os desertos e zonas semi-áridas do Novo Mundo (WASSERMAN, 1982; 1992; ETGES *et al.*, 2001; TIDON-SKLORZ & SENE, 2001). O grupo repleta atualmente é dividido em 6 subgrupos: *mulleri*, *repleta*, *mercatorum*, *hydey*, *inca* e *fasciola* (VILELA, 1983; RAFAEL & ARCOS, 1989). O subgrupo *mulleri*, por sua vez, apresenta 44 espécies e subdivide-se em cinco complexos (*mulleri*, *buzzatii*, *eremophila*, *meridiana* e *anceps*). O complexo *mulleri* está subdividido em quatro clusters (*mojavensis*, *mulleri*, *longicornis* e *ritae*). No cluster *mojavensis*, encontram-se as espécies *Drosophila mojavensis*, *D. arizonae* e *D. navojoa*. No cluster *mulleri* estão as espécies *D. mulleri*, *D. aldrich*, *D. whelleri*, *D. nigrodumosa*, *D. huaylasi*, *D. mayaguana*, *D. straubae* e *D. parisiena* (DURANDO *et al.*, 2000).



As espécies utilizadas neste trabalho, *D. mulleri* e *D. arizonae*, pertencem ao complexo *mulleri* do subgrupo *mulleri* do grupo repleta. São consideradas espécies crípticas, simpátricas, adaptadas a regiões áridas, onde se utilizam de várias espécies de cactos e que apresentam isolamento reprodutivo na natureza. *D. mulleri* ocorre nos Estados do Texas e Flórida nos Estados Unidos, nos desertos do México, Jamaica e em Cuba. A área de distribuição de *D. arizonae* abrange os Estados do Arizona e Novo México, Estados Unidos, e o Estado de Sonora no México (PATTERSON & STONE, 1952). Experimentos iniciais de hibridização em laboratório entre essas espécies utilizando-se cruzamentos em massa descreveram a obtenção de híbridos entre fêmeas *D. mulleri* e machos de *D. arizonae*, sendo incompatível o cruzamento recíproco. CROW (1942) e PATTERSON (1947) obtiveram apenas machos híbridos estéreis nesses cruzamentos, enquanto BICUDO & RICHARDSON (1978) obtiveram machos híbridos estéreis e fêmeas híbridas férteis. Em estudos mais recentes utilizando-se as mesmas linhagens de laboratório para *D. mulleri* e *D. arizonae* estudadas por BICUDO & RICHARDSON (1978), BAFFI & CERON (2002) relataram a produção de híbridos entre essas espécies nos dois sentidos de cruzamento, sem entretanto, investigar a fertilidade desses híbridos. A divergência no desenvolvimento entre *D. mulleri* e *D. arizonae* pode ser devido a utilização de substratos em diferentes períodos de vida de uma geração. No laboratório verificou-se que *D. mulleri* e *D. arizonae* diferem no tempo de desenvolvimento por cerca de dois dias. Híbridos resultantes do cruzamento entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae* apresentam período de desenvolvimento mais rápido do que *D. mulleri* e mais lento do que *D. arizonae*. Algumas modificações observadas em híbridos interespecíficos desse sentido de cruzamento, como características no sistema reprodutivo em machos, refletem o grau de divergência entre as espécies (BICUDO & RICHARDSON, 1978). A seleção do habitat foi proposta



como um fator potencial no isolamento reprodutivo entre essas espécies, possivelmente como um fator crucial na especiação simpátrica (MAYNARD-SMITH, 1966; RICHARDSON, 1974; RICHARDSON & SMOUSE, 1975; BUSH, 1974, 1975 *apud* BICUDO & RICHARDSON, 1978).

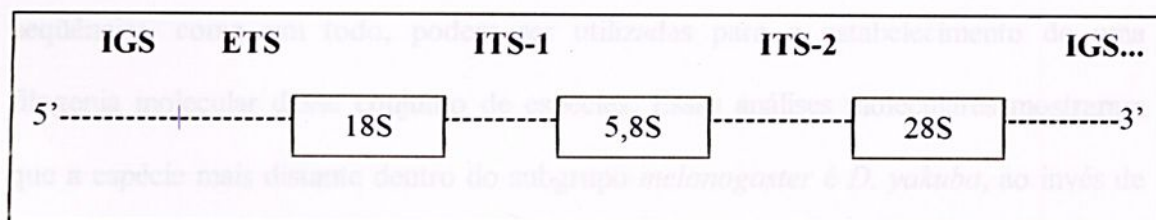
Uma característica envolvendo as espécies do complexo *mulleri* é o fenômeno de dominância interespecífica quanto à atividade organizadora nucleolar (BICUDO, 1979; 1981 a, b). Dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri* foi inicialmente descrita em híbridos obtidos de cruzamentos entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, com base em análises citogenéticas dos cromossomos politênicos de glândulas salivares em larvas híbridas (BICUDO & RICHARDSON, 1977; 1981). Esse assunto será retomado nesse trabalho com uma abordagem a nível da transcrição do rDNA.

1.2. DNA E RNA RIBOSSÔMICOS

O ribossomo é uma organela formada pela união de duas subunidades presentes no citosol a partir de diversas proteínas e alguns ácidos ribonucleicos, que pode ser encontrada tanto livre no citoplasma como aderida ao retículo endoplasmático, e tem a função de dirigir a tradução de um RNA mensageiro em uma sequência de aminoácidos das proteínas. A biossíntese dos ribossomos envolve a produção altamente regulada de quatro tipos de RNAs ribossômicos e aproximadamente 120 diferentes tipos de proteínas. A regulação apropriada dos genes codificadores dos vários tipos de RNA e das proteínas ribossômicas é fundamental para a fisiologia celular.



O DNA ribossômico (rDNA), com sua estrutura básica conservada entre eucariotos, é arranjado nas regiões organizadoras nucleolares como uma família multigênica (NIERRAS *et al.*, 1997). Cada unidade repetitiva (RU) consiste de seqüências conservadas maduras dos rRNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas com regiões espaçadoras que serão processadas, sendo essas regiões pouco conservadas entre as espécies. Nos insetos, incluindo o gênero *Drosophila*, as regiões intercalantes entre as unidades repetitivas podem ser sítios de inserção de elementos transponíveis do tipo I (JAKUBCZAK *et al.*, 1990). O tamanho médio da unidade repetitiva varia entre 13,5 a 14 kb em *D. arizonae* (TOVAR *et al.*, 2000). As unidades repetitivas ou unidade de transcrição do rDNA são compostas de uma região ETS (External Transcribed Spacer), uma região madura do rRNA 18S, a região interna transcrita para ser processada, ITS-1 (Internal non Coding Transcribed Spacer), a região madura do rRNA 5,8S, uma segunda região interna transcrita para ser processada, denominada ITS-2, a região madura do rRNA 28S e, finalmente, a região intergênica não transcrita, IGS (Intergenic non transcribed Spacer), que separa uma unidade repetitiva de outra. O esquema 1, abaixo, apresenta a organização do rDNA em eucariotos (TAUTZ *et al.* 1988; HILLIS & DIXON, 1991; POLANCO *et al.* 1998).



Esquema 1: Organização do rDNA em eucariotos.

A unidade repetitiva como um todo é transcrita pela RNA polimerase I, como uma única molécula precursora de 45S. A maturação dos rRNAs ocorre por uma

clivagem ordenada e remoção das seqüências espaçadoras internas (GERBI, 1985, SCHÖTTERER *et al.*, 1994). Embora os espaçadores apresentem divergência evolutiva rápida e não tenham funções consideradas (SCHLÖTTERER *et al.*, 1994), a análise funcional das regiões ITS-1 e ITS-2 em leveduras e outros organismos mostrou clara evidência de papel desses espaçadores no processamento do RNA 45S primário. O espaçador ITS-1 é requerido para o processamento das extremidades 3' do rDNA 18S e 5' da molécula de 5,8S, enquanto ITS-2 é requerido para o processamento da terminação 3' do 5,8S e 5' da molécula de 28S. Além disso, estudos em levedura indicam que a estrutura secundária desses espaçadores é importante para o processamento (van der SANDE *et al.*, 1992). POLANCO *et al.* (2000) consideram que a região IGS pode estar sofrendo o mesmo processo evolutivo como os espaçadores ITSs com mudanças intracromossômicas mais freqüentes do que intercromossômicas.

Vários trabalhos indicam que há uma grande variabilidade das regiões intergênicas transcritas ITS-1 e ITS-2, mesmo entre espécies relacionadas. Uma análise comparativa de seqüências das regiões ITSs, utilizando-se primers que se associam às regiões altamente conservadas 18S e 28S de cinco espécies de *Drosophila* do subgrupo *melanogaster*, mostrou um padrão distinto de divergência e conservação, indicando que alguns trechos nessas seqüências são mais conservados do que outros, e que as seqüências, como um todo, podem ser utilizadas para o estabelecimento de uma filogenia molecular desse conjunto de espécies. Essas análises moleculares mostraram que a espécie mais distante dentro do subgrupo *melanogaster* é *D. yakuba*, ao invés de *D. orena* como outros estudos indicavam (SCHÖTTERER *et al.*, 1994).

Vários trabalhos têm mostrado variações de tamanho para as regiões ITS-1 e ITS-2 em *Drosophila*, sendo que para algumas espécies, essas diferenças podem ser atribuídas a inserção de elementos transponíveis (JAKUBCZAK *et al.*, 1990; TOVAR



et al., 2000). Transposons R1 e R2, encontrados freqüentemente no rDNA 28S de artrópodes, são filogeneticamente estáveis em linhagens de insetos e são herdados por transmissão vertical há aproximadamente mais de 600 milhões de anos (GENTILE *et al.* 2001; PEREZ-GONZÁLEZ, 2003). Diversos estudos sugerem que a abundância e persistência de R1 e R2 são afetadas por mecanismos de recombinação, sendo a taxa de eliminação maior do que a observada em outros elementos transponíveis inseridos no genoma (PÉREZ-GONZÁLEZ, 2003).

Entre as espécies do complexo *mulleri* do subgrupo *mulleri* do grupo *repleta*, uma diferença de tamanho na região ITS-1 foi observada entre *D. mulleri* e *D. arizonae*. Em *D. mulleri*, essa região intergênica transcrita apresenta um comprimento de 600 pares de base (pb) ao passo que em *D. arizonae* essa região corresponde a 500 pb (BAFFI & CERON, 2002).

1.3. REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES

Nos eucariotos, as regiões organizadoras nucleolares (NORs) são *loci* cromossômicos em que centenas ou milhares de genes para os RNAs ribossômicos estão arranjados em “*tandem*” e aos quais os nucléolos se associam. Em cromossomos metafásicos corados, as regiões organizadoras nucleolares podem ser identificadas porque se coram menos e, por isso, são chamadas de constrições secundárias. As constrições secundárias surgem devido à transcrição contínua dos genes do RNA, interferindo na condensação cromossômica. O tamanho e o número de NORs variam enormemente em diferentes tipos de células e podem mudar em uma única célula,



ocupando até 25% do volume nuclear total em células que produzem grande quantidade de proteínas. A organização das seqüências do DNA ribossômico e os mecanismos envolvidos na regulação da atividade dos cistrons ribossômicos também podem variar entre as espécies nos diferentes tipos celulares.

Os genes ribossômicos formam seqüências repetidas em cada região organizadora nucleolar, constituindo o que se chama de família multigênica, a qual consiste de um conjunto de genes presentes em um mesmo cromossomo ou dispersos pelo genoma e que tiveram a mesma origem evolutiva. Mesmo aquelas famílias gênicas que possuem milhares de membros, são altamente homogêneas em seqüências nucleotídicas. Seria esperado que genes múltiplos de uma família evoluíssem independentemente, de modo que comparações entre cópias diferentes dentro de uma espécie fossem tão divergentes quanto à divergência encontrada entre *loci* homólogos em espécies diferentes. No entanto, a homogeneidade encontrada em comparações parálogas implica que os membros de uma família gênica dentro de uma espécie não evoluem independentemente. Isto pode ser explicado pressupondo-se que todos os membros de uma família gênica descenderam de uma seqüência nucleotídica ancestral comum, depois que as várias espécies divergiram uma das outras. Sendo assim, devem existir mecanismos que homogeneizam os membros de famílias gênicas. Esses mecanismos de homogeneização são determinados através de um fenômeno conhecido como evolução combinada ou evolução coincidental (HOOD *et al.*, 1975; LINARES *et al.*, 1994; LUCCHINI *et al.*, 1997; POLANCO *et al.*, 1998; TOVAR *et al.*, 2000).

Em alguns eucariontes, como o milho, há um único par de organizadores nucleolares, presente no cromossomo 6. No sapo da África do Sul, *Xenopus laevis*, as NORs estão presentes nos cromossomos sexuais. Já em humanos são encontrados 5

pares de organizadores nucleolares situados nos braços curtos dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22.

Em *Drosophila* e outros drosofilídeos, vários padrões caracterizam a localização das regiões organizadoras nucleolares (NORs), podendo ser encontradas nos cromossomos sexuais X e Y, como observado em *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. hydei* (SPEAR, 1974; MOHAN, 1977; HENNIG *et al*, 1975; LOHE & ROBERTS, 1990; SEMIONOV & MARKOVA, 1997), NORs restritas ao cromossomo X, como em *D. virilis* (ENDOW & GALL, 1975; McKEE & KARPEN, 1990), NORs presentes no cromossomo X e no microcromossomo, observado em espécies do complexo *mulleri* do grupo repleta, como *D. mulleri*, *D. arizonae*, *D. aldrichi*, *D. navojoa*, *D. mojavenensis* e *D. wheeleri* (BICUDO, 1985; BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981) e em *Zaprionus indianus* (GUPTA & KUMAR, 1987), NORs localizadas no cromossomo Y e no microcromossomo como em *D. nasuta nasuta* e *D. nasuta albomicans* (McKEE, 1996; HAGELE & RANGANATH, 1983) e, finalmente, NORs restritas ao microcromossomo, representado por *D. tumiditarsus* (SINIBALDI & CUMMINGS, 1981; LINARES *et al*, 1991). Em *D. melanogaster*, os genes ribossômicos se agrupam em dois organizadores nucleolares, sendo um localizado no meio da heterocromatina proximal do cromossomo X e outro no braço curto do cromossomo Y, o qual aparece heterocromático na metáfase. Já *D. hydei* apresenta três NORs, entre as quais uma localiza-se no braço heterocromático do cromossomo X e duas no Y, sendo uma no braço curto e uma próxima da ponta do braço longo. Nas espécies do complexo *mulleri*, a NOR principal do cromossomo X localiza-se na região proximal, nas imediações do centrômero. A NOR localizada no microcromossomo atua como NOR secundária. Em *D. tumiditarsus* o microcromossomo é transcricionalmente ativo, sendo que não se



replica tardiamente e não se cora com as técnicas características da heterocromatina (BICUDO, 1985).

Variações nos níveis de redundância dos cistrons ribossômicos (rDNA) levam a variações no tamanho do nucléolo. Algumas vezes, a variação do tamanho do nucléolo é decorrente de mecanismos reguladores que ativam um número maior ou menor de cistrons presentes na NOR. Em fêmeas híbridas do complexo *mulleri*, observa-se uma relação de dominância entre as NORs dos cromossomos X de diferentes origens, onde é relativamente freqüente um pequeno nucléolo associado ao X recessivo e um nucléolo de tamanho normal ao X dominante. A variabilidade quanto aos mecanismos de controle das NORs é especialmente visível através de estudos de híbridos interespecíficos. Essa variabilidade pode se manifestar pela dominância nucleolar, que, morfológicamente, é detectada pela ausência de constrição secundária ou pela ausência da produção do nucléolo ou ainda, pela produção de um nucléolo menor que o normal (BICUDO, 1985).

1.4. DOMINÂNCIA NUCLEOLAR

Dominância nucleolar é um fenômeno epigenético que descreve a formação do nucléolo, resultando em ativação preferencial de um conjunto de genes de rRNA de um parental dominante, em um cruzamento interespecífico, silenciando o não dominante (CHEN *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2004). É observado em diversos organismos, como plantas, insetos, anfíbios e mamíferos, mas foi descrito pela primeira vez em plantas do gênero *Crepis* (NAVASHIN, 1934 *apud* REEDER, 1985). Também é bem conhecida



em híbridos interespecíficos, onde a NOR de uma espécie parental suprime a atividade das NORs de outra espécie. Pode ser detectada, morfológicamente, pela ausência de constrição secundária, ou pela ausência de nucléolo, ou pela produção de nucléolo menor do que o normal. Em *Drosophila*, a dominância nucleolar foi descrita em híbridos interespecíficos entre *D. melanogaster* e *D. simulans* (DURICA & KRIDER, 1977, 1978) e em híbridos de espécies do complexo *mulleri* do grupo repleta (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981). No primeiro caso, *D. melanogaster* é dominante independente da direção do cruzamento, e os genes são suprimidos reversivelmente (GRANADINO *et al.*, 1996). No segundo caso, a dominância nucleolar foi observada em híbridos provenientes de cruzamentos entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, analisando-se os cromossomos politênicos de células de glândula salivar de larvas híbridas de 3º estágio. Nesses híbridos, o organizador nucleolar do cromossomo X ou do microcromossomo de *D. arizonae* suprime o organizador nucleolar presente no cromossomo X de *D. mulleri*. (BICUDO, 1982; BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981).

Posteriormente, a dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri* foi molecularmente confirmada com base na análise dos padrões de restrição do rDNA em machos e fêmeas das espécies parentais e dos híbridos. Essa análise demonstrou que o microcromossomo que se liga ao nucléolo nos machos híbridos obtidos de cruzamentos entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri* provém de *D. arizonae* (LEONCINI *et al.*, 1996).

Neste trabalho, a dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri* foi reestudada com base na análise transcricional do rDNA em híbridos entre *D. mulleri* e *D. arizonae* no sentido já descrito anteriormente, utilizando-se a região espaçadora transcrita ITS-1 como marcador de transcrição. Também investigamos a ocorrência do



fenômeno de dominância nucleolar em híbridos obtidos em cruzamentos no sentido inverso, ou seja, envolvendo fêmeas *D. arizonae* e machos *D. mulleri*.

II. OBJETIVOS



2.1. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal analisar o fenômeno da dominância materna entre *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*, com base em análises da transcrição da região intergênica parental (ITS 1 do rDNA em híbridos obtidos de cruzamentos entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, bem como no sentido inverso de cruzamento, fêmeas *D. arizonae* e machos *D. mulleri*.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal analisar o fenômeno da dominância nucleolar entre *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*, com base em análises da transcrição da região intergênica transcrita ITS-1 do rDNA em híbridos obtidos de cruzamentos entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, bem como no sentido inverso de cruzamento, fêmeas *D. arizonae* e machos *D. mulleri*.

III. RESULTADOS



ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA DOMINÂNCIA NUCLEOLAR EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS OBTIDOS DE CRUZAMENTOS ENTRE

Drosophila mulleri E *D. arizonae*

Lage, J. M.⁽¹⁾; Rahal, P.⁽¹⁾; Ceron, C. R.⁽²⁾

UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto,
Departamento de Biologia⁽¹⁾ e Departamento de Química e Ciências Ambientais⁽²⁾

Resumo

Drosophila mulleri e *D. arizonae* são espécies críplicas pertencentes ao complexo *mulleri* do subgrupo *mulleri* do grupo repleta cujas isolíngens cruzam-se em laboratório, em ambos os sentidos. Este trabalho teve como principal objetivo a análise da dominância nucleolar em híbridos interespecíficos provenientes dos cruzamentos entre *Drosophila mulleri* e *D. arizonae*, baseado na amplificação da região intergênica não codificada transcrita ITS-1 como marcador molecular da transcrição dos rístrons de rDNA. *D. mulleri* e *D. arizonae* podem ser diferenciadas quanto ao comprimento da região ITS-1. Em *D. mulleri* o fragmento amplificado para essa região tem 600 pb enquanto em *D. arizonae* corresponde a 500 pb. A amplificação do cDNA por RT-PCR do RNA total extraído das espécies parentais e híbridos seguiu as etapas de PCR para a obtenção da região correspondente ao ITS-1, mostrou que os rístrons ribossômicos presentes no cromossomo X e no microcromossomo de *D. arizonae* são preferencialmente ativados nos machos e fêmeas híbridos em ambos os sentidos de cruzamento. Esses resultados confirmam, a nível molecular, o fenômeno de dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*.

III. RESULTADOS

ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA DOMINÂNCIA NUCLEOLAR EM
HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS OBTIDOS DE CRUZAMENTOS ENTRE
Drosophila mulleri E *D. arizonae*

Lage, J. M.⁽¹⁾; Rahal, P.⁽¹⁾; Ceron, C. R.⁽²⁾

UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto,
Departamento de Biologia ⁽¹⁾ e Departamento de Química e Ciências Ambientais ⁽²⁾.

Resumo

Drosophila mulleri e *D. arizonae* são espécies crípticas pertencentes ao complexo *mulleri* do subgrupo *mulleri* do grupo repleta cujas isolinhagens cruzam-se em laboratório, em ambos os sentidos. Este trabalho teve como principal objetivo a análise da dominância nucleolar em híbridos interespecíficos provenientes dos cruzamentos entre *Drosophila mulleri* e *D. arizonae*, baseado na amplificação da região intergênica não codificadora transcrita ITS-1 como marcador molecular da transcrição dos cistrons de rDNA. *D. mulleri* e *D. arizonae* podem ser diferenciadas quanto ao comprimento da região ITS-1. Em *D. mulleri* o fragmento amplificado para essa região tem 600 pb enquanto em *D. arizonae* corresponde a 500 pb. A amplificação do cDNA por RT-PCR do RNA total extraído das espécies parentais e híbridos seguida de reação de PCR para a obtenção da região correspondente ao ITS-1, mostrou que os cistrons ribossômicos presentes no cromossomo X e no microcromossomo de *D. arizonae* são preferencialmente ativados nos machos e fêmeas híbridos em ambos os sentidos de cruzamento. Esses resultados confirmam, a nível molecular, o fenômeno de dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*.

Introdução

Drosophila mulleri e *D. arizonae* são espécies crípticas, simpátricas, pertencentes ao complexo *mulleri* do subgrupo *mulleri* do grupo *repleta*. São consideradas espécies cactofílicas que, na natureza, utilizam-se de cactos em decomposição para alimentação e ovoposição. Experimentos iniciais de hibridização em laboratório entre essas espécies, através de cruzamentos em massa, descreveram a obtenção de híbridos entre fêmeas *D. mulleri* e machos de *D. arizonae*, sendo incompatível o cruzamento recíproco. CROW (1942) e PATTERSON (1947) obtiveram apenas machos híbridos estéreis nesses cruzamentos, enquanto BICUDO & RICHARDSON (1978) obtiveram machos híbridos estéreis e fêmeas híbridas férteis. Em estudos mais recentes, utilizando-se as mesmas isolinhagens de laboratório para *D. mulleri* e *D. arizonae* estudadas por BICUDO & RICHARDSON (1978), BAFFI & CERON (2002) relataram a produção de híbridos entre essas espécies nos dois sentidos de cruzamento, sem entretanto, investigar a fertilidade desses indivíduos. Outra característica envolvendo *D. mulleri* e *D. arizonae* é a ocorrência do fenômeno de dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*, inicialmente observada nos híbridos obtidos de cruzamentos entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae* (BICUDO & RICHARDSON, 1977; 1981).

A dominância nucleolar é um fenômeno epigenético no qual um conjunto de genes para o rRNA é silenciado nos híbridos interespecíficos. A região organizadora nucleolar (NOR) de uma espécie parental suprime a atividade da outra espécie. Sua ocorrência foi primeiramente observada entre plantas do gênero *Crepis* (NAVASHIN, 1934, *apud* REEDER, 1985). Outros relatos de dominância nucleolar em plantas incluem híbridos no gênero *Brassica* (CHEN & PIKAARD, 1997; FRIEMAN *et al.*,



1999), *Arabidopsis* (CHEN *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2004) e em milho (McMURPHY & RAYBURN, 1994). Em animais a dominância nucleolar já foi observada em híbridos de *Xenopus laevis* e *X. borealis* (CASSIDY & BLACKLER, 1974; REEDER & ROAN, 1984), em células somáticas híbridas de camundongos e humanos (SOPRANO & BASERGA, 1980; ONISHI *et al.*, 1984), e em híbridos de cruzamentos entre *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* (DURICA & KRIEDER, 1977; 1978) e entre *D. arizonae* e *D. mulleri* (BICUDO & RICHARDSON, 1977; 1981), e em híbridos de outras espécies do complexo *mulleri* (BICUDO, 1979).

No presente trabalho, analisamos em nível molecular a dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*, com base em experimentos de transcrição preferencial dos cistrons de rRNA em híbridos interespecíficos dessas espécies obtidos nos dois sentidos de cruzamento.

Materiais e Métodos

- Linhagens:

Os estoques de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri* foram originariamente coletados em Guayalejo (México) e trazidos para o Brasil, em 1976, pela Profa. Dra. Hermione E. M. C. Bicudo. No presente trabalho, duas isolinhagens derivadas dos estoques iniciais foram utilizadas, a isolinhagem Est-5^r de *D. arizonae* e Est-5^s de *D. mulleri*, que são homozigotas para as variantes “fast” e “slow” da esterase-5, uma das principais esterases das moscas adultas dessas espécies, o que permite a distinção dos híbridos. As culturas foram mantidas em garrafas de vidro com meio de banana-água enriquecido com gérmen de trigo, em estufa a 25°C no Departamento de Biologia, UNESP, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, com repiques a cada 25



dias. Cruzamentos interespecíficos em massa foram realizados em aproximadamente 50 tubos, com 28 casais em cada tubo, mantidos com o meio utilizado para a manutenção das espécies, segundo o método utilizado por BAFFI & CERON (2002). Os cruzamentos foram realizados entre fêmeas virgens *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, e no sentido inverso, fêmeas virgens *D. arizonae* e machos *D. mulleri*.

- Extração de RNA total

Indivíduos adultos das espécies parentais e híbridos foram coletados e mantidos a -70°C e em seguida, utilizados para extração do RNA total com o reagente de TRIZOL (GIBCO – BRL Technologies). O RNA foi diluído em H_2O DEPC, quantificado por leituras de absorbância em espectrofotômetro a 260/280 nm, seguido de eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE 1x com H_2O DEPC para verificação da qualidade do material extraído.

- Padrão de esterases das espécies parentais e híbridos

Os padrões de esterases das espécies parentais e híbridos foram analisados em géis de poliacrilamida em placas a 10% de concentração ($C=2,6\%$) em condições não desnaturantes, preparados em tampão Tris-HCl 0,375M pH 8,8. A eletroforese foi conduzida por 4 horas a 180V, com Tris-Glicina 0,1M pH 8,3 como tampão de corrida. Após a eletroforese, os géis eram pré-incubados em tampão fosfato 0,1M pH 6,2 por 45 minutos e corados por 1 hora em 50 mL da solução do tampão acima contendo 30 mg de beta-naftil acetato, 20 mg de alfa-naftil acetato, 60 mg de Fast Blue RR salt e 5 mL de álcool n-propílico. O alfa e beta naftil acetatos eram previamente dissolvidos em 1 mL de acetona. Após a coloração, os géis eram descorados em etanol/ácido acético/água (3:1:3) e em seguida desidratados em celofane de acordo com CERON *et al.* (1992).



- Primers

A sequência completa da região intergênica transcrita, ITS-1, foi amplificada utilizando-se o primer F (5' CGTAACAAGGTTTCCGTAGG 3') que se associam à extremidade 3' do gene rRNA 18S o primer R (5' GCTGCGTTCTTCATGCAC 3') que se associa ao início da sequência 5' do gene rRNA 5,8S. Esses primers foram inicialmente desenhados pelo Prof. Dr. Jonathan B. Clark do Departamento de Biologia Evolutiva da Universidade do Arizona em Tucson, Estados Unidos, com base na organização do rDNA de *Drosophila melanogaster*.

- Síntese de cDNA

Amostra contendo 1 µg de RNA total foi submetida a tratamento com a enzima DNase (RQ 1 RNase-Free DNase - PROMEGA). Uma alíquota de 10 µL desse material foi utilizada para ensaios de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com a enzima transcriptase reversa). Essa reação utilizou 0,5 µL do primer R (33 ng/µL) descrito acima, 1 µL da enzima ImProm II Reverse Transcriptase (PROMEGA), 4 µL de tampão de reação ImProm-II 5x, 2,4 µL de cloreto de magnésio 25 mM (2,6 mM de concentração final), 1µL de mix de dNTP 10 mM (0,43 mM de concentração final) e H₂O DEPC para um volume final de 23 µL. A reação para síntese da cadeia complementar à fita de RNA ocorreu segundo especificações da enzima, correspondendo a 5 minutos a 25°C para associação das cadeias, 60 minutos a 42°C para extensão da primeira fita e 15 minutos finais a 70°C para inativação da enzima. Nessa reação obteve-se uma fita simples de cDNA que engloba a região espaçadora ITS-1, a qual foi utilizada para uma reação de PCR nas seguintes condições: 5 U de Taq polimerase, 33 ng/µL dos primers R e F para a região ITS-1, 2,5µL de tampão para PCR



1x, 0,5µL de mix de dNTP 10 mM, 2,0 µL de cloreto de magnésio a 25 mM de concentração, em volume final de 25 µL. Essa reação foi iniciada com aquecimento a 95°C por 1 minuto para desnaturação prévia do DNA, seguindo 35 ciclos de 1 minuto a 95°C para fusão, 1 minuto a 50°C para associação dos primers e 1 minuto a 72°C para polimerização da cadeia, finalizando com extensão final a 72°C por 2 minutos. Os fragmentos amplificados, correspondentes à região intergênica ITS-1, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1x corado com brometo de etídeo e posterior visualização sob luz ultravioleta.

Como controle, amostras de RNA total tratados com a enzima DNase e amostra de DNA genômico dos parentais e híbridos foram submetidas a reações de PCR utilizando-se os mesmos primers para a região ITS-1 e, em seguida, analisadas por eletroforese nas condições já descritas acima.

Resultados

- Híbridos Interespecíficos e padrão de esterases

Cruzamentos interespecíficos utilizando-se 28 casais em cada tubo contendo meio de cultura de banana-ágar enriquecidos com gérmen de trigo foram realizados em ambos sentidos de cruzamento. No cruzamento entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri*, em 35 tubos com 28 casais cada, foram obtidos 51 machos e 16 fêmeas híbridos. No sentido inverso de cruzamento, entre machos *D. mulleri* e fêmeas *D. arizonae*, foram obtidos 11 machos e 09 fêmeas híbridos a partir de 57 tubos com 28 casais cada. A produção de híbridos utilizando as fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae* foi maior do que a obtida no sentido inverso. Esses resultados confirmam



dados anteriores de cruzamentos entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae* já relatados por CROW (1942), PATTERSON (1947), BICUDO & RICHARDSON (1978), bem como os resultados de BAFFI & CERON (2002) envolvendo cruzamentos nos dois sentidos. Esses últimos autores também relataram maior produção de híbridos em cruzamentos envolvendo fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*.

Machos e fêmeas híbridos e das espécies parentais foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida quanto ao padrão da esterase Est-5, uma enzima dimérica, que tem especificidade pelo β -naftil acetato. As linhagens parentais são homozigotas para os alelos que codificam as enzimas Est-5^s (em *D. mulleri*) e Est-5^r (*D. arizonae*). Já nos híbridos obtidos em ambos sentidos de cruzamento, são observadas 3 bandas para a Est-5 (Figura 1 A e B). A banda intermediária dos híbridos corresponde à formação de um heterodímero intraloco interespecífico derivado da associação de uma cadeia “slow” codificada pelo alelo Est-5^s de *D. mulleri*, e uma cadeia “fast” codificada pelo alelo Est-5^r proveniente de *D. arizonae*. Esses resultados suportam fortemente a obtenção dos híbridos nos dois sentidos de cruzamento.

- Integridade e pureza do RNA total

Uma alíquota contendo 1 μ g do RNA total obtido pelo método do TRIZOL foi inicialmente utilizada para verificação da integridade do material extraído. Uma banda bem definida foi observada em eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Esses resultados são mostrados na figura 2 para machos *D. arizonae*, fêmeas *D. mulleri* e machos e fêmeas híbridos nesse sentido de cruzamento. Os mesmos resultados foram obtidos para o sentido inverso (não apresentados). Esses dados são similares aos de BROCHETTO-BRAGA (2004) para a extração do RNA total de formigas lava-pés, *Solenopsis saevissima*, em que apenas uma banda do rRNA foi observada.

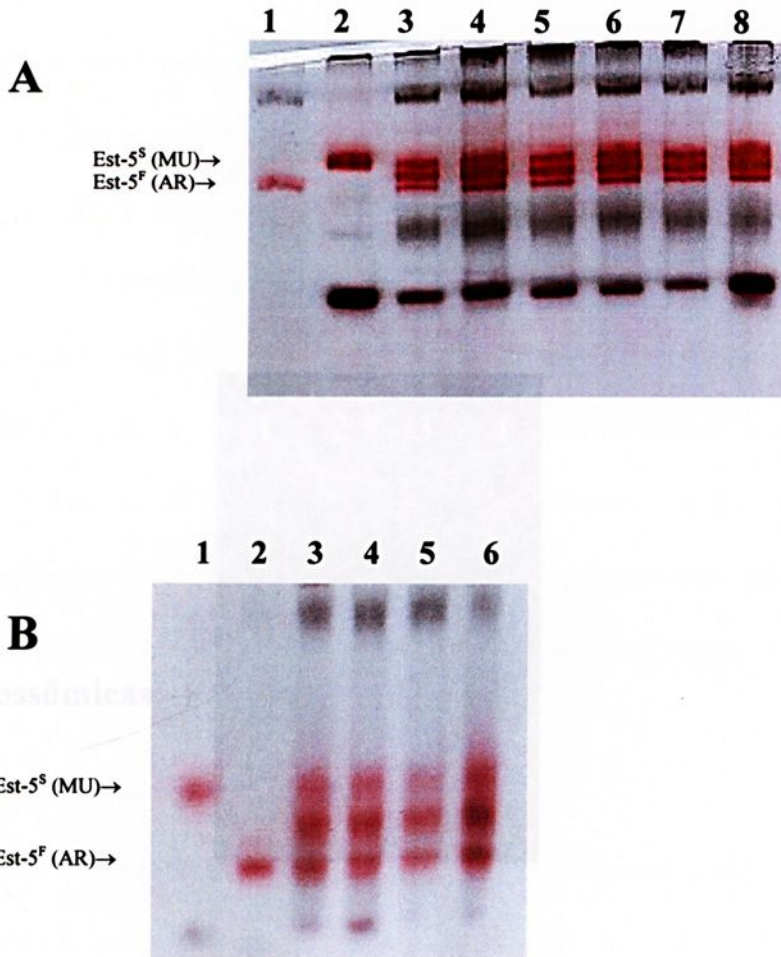


Figura 1: Gel de esterase a 10% em buffer TBE 1x corado com brometo de etídio e visualizado sob transiluminador de ultravioleta. A) Cruzamentos entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri*. B) Cruzamentos entre machos *D. mulleri* e fêmeas *D. arizonae*.

Figura 1: Padrão de esterases em híbridos interespecíficos entre *D. mulleri* e *D. arizonae* visualizados em géis nativos de poliacrilamida a 10%. (A) Cruzamentos envolvendo machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri*: 1) Macho parental *D. arizonae*; 2) Fêmea parental *D. mulleri*; 3 a 5) Machos híbridos; 6 a 8) Fêmeas híbridas. (B) Cruzamentos envolvendo machos *D. mulleri* e fêmeas *D. arizonae*: 1) Macho parental *D. mulleri*; 2) Fêmea parental *D. arizonae*; 3 e 4) Machos híbridos; 5 e 6) Fêmeas híbridas.

Na figura 1, observa-se que amostras de RNA total (amostras de espécies parentais como híbridos tratados com DNase) não produziram quaisquer fragmentos amplificáveis após a reação de PCR utilizando-se os primers específicos para a região ITS-1, indicando que o RNA extraído não contém vestígios de DNA. Por outro lado, amostras de DNA genômico das espécies parentais e híbridos produziram fragmentos amplificáveis para a região ITS-1. No caso de *D. arizonae*, o DNA de 2.012 pb ou 500 pb no caso de *D. mulleri*. Já no caso de híbridos, independentemente do sentido de cruzamento, a amostra apresentou dois fragmentos de 500 e 600 pb, o que confirma a presença de DNA de ambos os híbridos.

Bandas ribossômicas →



Figura 2: Gel de agarose a 1,0% em tampão TAE 1x corado com brometo de etídeo e visualizado sob transluminador de ultravioleta. Bandas ribossômicas a partir de material de extração de RNA. Parentais e híbridos provenientes do cruzamento entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri*. 1) Macho parental *D. arizonae*; 2) Fêmea parental *D. mulleri*; 3) Macho híbrido; 4) Fêmea híbrida.

Observa-se na figura 2A que o cDNA correspondente à região ITS-1 obtido a partir do RNA total dos machos *D. arizonae* apresenta um tamanho em torno de 500 pb. Para as fêmeas *D. mulleri*, o fragmento amplificado nas mesmas condições tem um comprimento de 600 pb. No cruzamento entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri*, tanto em machos como em fêmeas híbridos, observa-se um fragmento amplificado

Na figura 3, observa-se que amostras de RNA total tanto de espécies parentais como híbridos tratados com DNase não produziram quaisquer fragmentos amplificados após a reação de PCR utilizando-se os primers específicos para a região ITS-1, indicando que o RNA extraído não contém vestígios de DNA. Por outro lado, amostras de DNA genômico das espécies parentais e híbridos originaram fragmentos amplificados para a região ITS-1 de 500 pb utilizando-se o DNA de *D. arizonae* ou 600 pb no caso de *D. mulleri*. Já para os machos e fêmeas híbridos, independentemente do sentido de cruzamento, a amplificação do DNA genômico apresentou dois fragmentos de 500 e 600 pb, o que confirma, mais uma vez, a identidade dos híbridos.

- Amplificação do cDNA para região ITS-1

O RNA total, tratado com DNase, foi submetido a uma reação de RT-PCR utilizando o primer R que se associa à extremidade da região do rDNA 5,8S, originando uma fita simples de cDNA que engloba a região ITS-1. Após um segundo ciclo de PCR, os cDNAs correspondentes à região ITS-1 obtidos a partir da amplificação do RNA total de híbridos e das espécies parentais foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (Figuras 4 A e B).

Observa-se na figura 4A que o cDNA correspondente à região ITS-1 obtido a partir do RNA total dos machos *D. arizonae* apresenta um tamanho em torno de 500 pb. Para as fêmeas *D. mulleri*, o fragmento amplificado nas mesmas condições tem um comprimento de 600 pb. No cruzamento entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri*, tanto em machos como em fêmeas híbridos, observa-se um fragmento amplificado

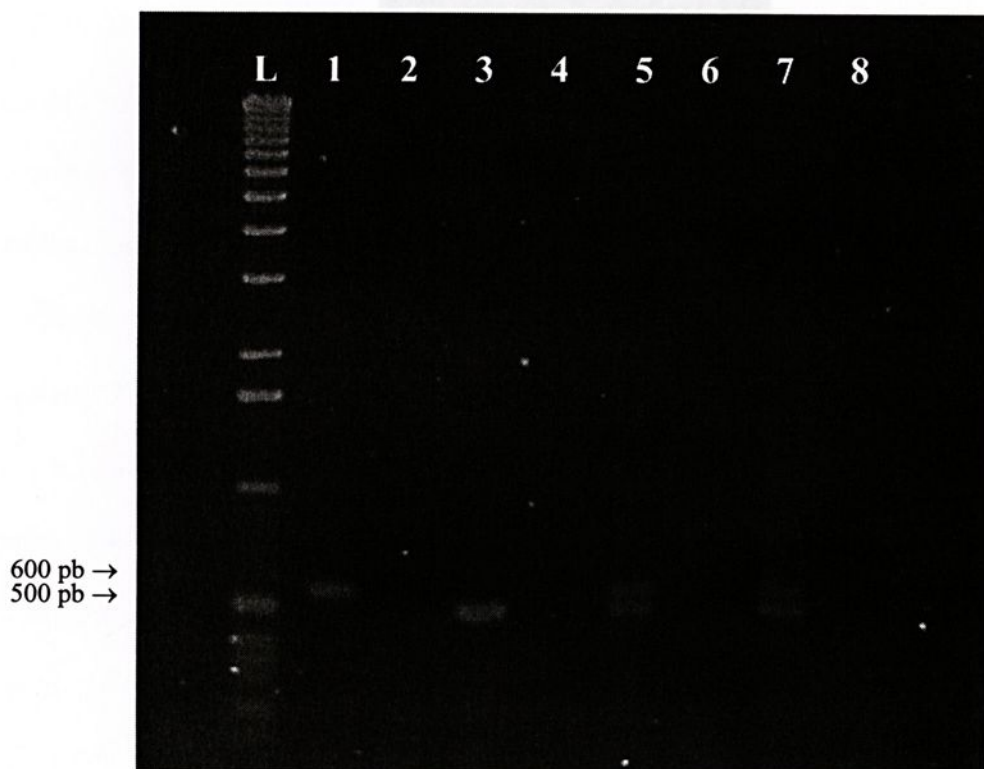


Figura 3: Amplificação da região ITS-1 em *D. mulleri*, *D. arizonae* e seus híbridos obtidos dos cruzamentos entre machos *D. mulleri* e fêmeas *D. arizonae* visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1x corado com brometo de etídeo. L) Ladder (marcador de peso molecular); 1) DNA de macho parental *D. mulleri*; 2) RNA total de macho parental *D. mulleri* tratado com DNase; 3) DNA de fêmea parental *D. arizonae*; 4) RNA total de fêmea parental *D. arizonae* tratado com DNase; 5) DNA de macho híbrido; 6) RNA total de macho híbrido tratado com DNase; 7) DNA de fêmea híbrida; 8) RNA total de fêmea híbrida tratado com DNase.

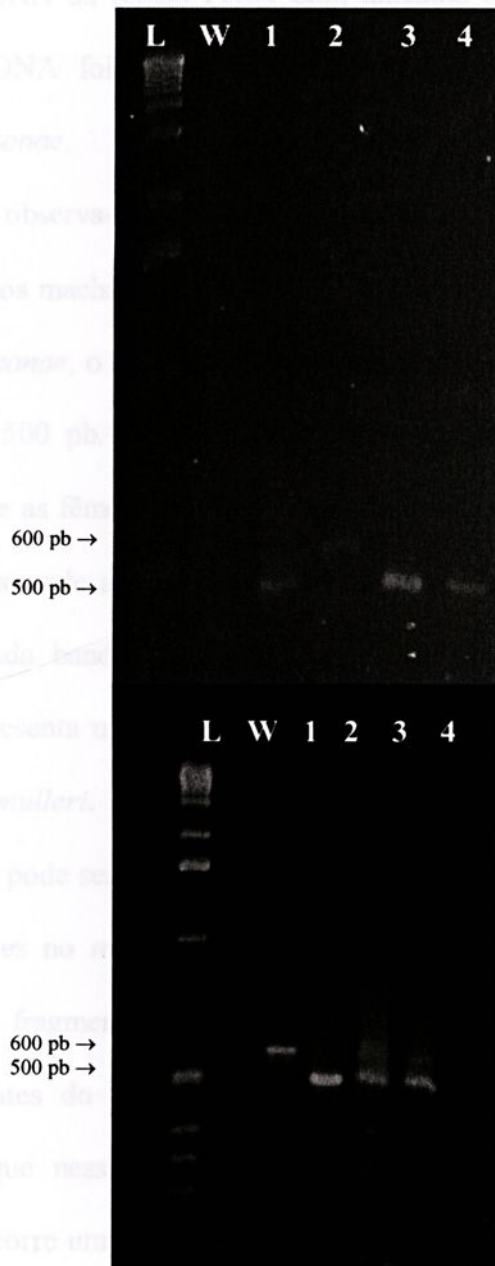
B

Figura 4: Gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1x corado com brometo de etídeo de cDNAs obtidos a partir do RNA total de *D. mulleri*, *D. arizonae* e de seus híbridos. L) Ladder (marcador de peso molecular); W) Controle negativo (água). (A) Cruzamentos no sentido macho *D. arizonae* e fêmea *D. mulleri*: 1) Macho parental *D. arizonae*; 2) Fêmea parental *D. mulleri*; 3) Macho híbrido; 4) Fêmea híbrida. (B) Cruzamentos no sentido macho *D. mulleri* e fêmea *D. arizonae*: 1) Macho parental *D. mulleri*; 2) Fêmea parental *D. arizonae*; 3) Macho híbrido; 4) Fêmea híbrida.

correspondente ao cDNA da região ITS-1 com tamanho de 500 pb. Esses resultados indicam que esse cDNA foi obtido a partir de um transcrito primário de RNA proveniente de *D. arizonae*.

Na figura 4B, observa-se que o cDNA correspondente à região ITS-1 obtido a partir do RNA total dos machos *D. mulleri* apresenta um tamanho em torno de 600 pb. Para as fêmeas *D. arizonae*, o fragmento obtido a partir do RNA total por RT-PCR tem um comprimento de 500 pb. No cruzamento entre machos *D. mulleri* e fêmeas *D. arizonae*, os machos e as fêmeas híbridos apresentam uma banda intensamente corada, de 500 pb, que corresponde ao fragmento amplificado referente à região ITS-1 de *D. arizonae*. Uma segunda banda, de menor intensidade, também pode ser observada nesses híbridos e apresenta um tamanho de 600 pb que corresponde ao fragmento da região ITS-1 de *D. mulleri*. Nos machos híbridos destes cruzamentos, o fragmento amplificado de 600 pb pode ser atribuído à uma pequena taxa de transcrição dos cistrons para o rRNA presentes no microcromossomo do macho parental *D. mulleri*. Já nas fêmeas híbridas, este fragmento amplificado corresponde à transcrição dos cistrons ribossomais provenientes do cromossomo X do macho parental *D. mulleri*. Esses resultados sugerem que nesse sentido de cruzamento (fêmeas *D. arizonae* versus machos *D. mulleri*) ocorre uma ativação preferencial do conjunto dos genes dominantes para o rRNA que, nesse caso, provém da fêmea parental *D. arizonae*.

Discussão

Em *Drosophila* e outros drosofilídeos, a localização das NORs, às quais o nucléolo se associa, é caracterizada por vários padrões: NORs presentes nos cromossomos sexuais X e Y, como observado em *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D.*



hydei (SPEAR, 1974; MOHAN, 1977; HENNIG *et al.*, 1975; LOHE & ROBERTS, 1990; SEMIONOV & MARKOVA, 1997), NORs restritas ao cromossomo X, como em *D. virilis* (ENDOW & GALL, 1975; McKEE & KARPEN, 1990), NORs presentes no cromossomo X e ao microcromossomo, observado em espécies do complexo *mulleri* do grupo repleta, como *D. mulleri*, *D. arizonae*, *D. aldrichi*, *D. navojoa*, *D. mojaviensis* e *D. wheeleri* (BICUDO, 1981; BICUDO & RICHARDSON, 1977) e em *Zaprionus indianus* (GUPTA & KUMAR, 1987), NORs localizadas no cromossomo Y e no microcromossomo em *D. nasuta nasuta* e *D. nasuta albomicans* (McKEE, 1996; HAGELE & RANGANATH, 1983) e NORs restritas ao microcromossomo, representado por *D. tumiditarsus* (SINIBALDI & CUMMINGS, 1981; LINARES *et al.*, 1991).

Nas espécies do complexo *mulleri*, os genes ribossômicos se agrupam tanto na NOR principal do cromossomo X, como na NOR secundária do microcromossomo (BICUDO, 1985; BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981; BAFFI & CERON, 2002). A NOR localizada no microcromossomo é ativada em condições especiais como, por exemplo, nos híbridos interespecíficos (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981).

A heterogeneidade da estrutura do rDNA é principalmente devida à diferença de tamanho dos espaçadores internos transcritos ITS-1 e ITS-2. Nos insetos, a variabilidade de tamanho desses espaçadores que em algumas situações se deve à inserção de elementos transponíveis (TOVAR *et al.*, 2000), tem permitido a identificação de várias espécies crípticas, como por exemplo entre espécies de mosquitos do complexo *maculipennis* do gênero *Anopheles* (MARINUCCI *et al.*, 1999). Nas espécies do complexo *mulleri* do grupo repleta, *D. arizonae* e *D. mulleri* podem ser diferenciadas pelo tamanho da região intergênica ITS-1 (BAFFI & CERON, 2002). Essa diferença de tamanho permitiu a utilização da região ITS-1 como um marcador

molecular de transcrição em híbridos interespecíficos entre *D. mulleri* e *D. arizonae*, e com isso, a possibilidade de se avaliar a dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri* em nível de transcrição dos cistrons ribossômicos. Análises da transcrição do rDNA também foram realizadas em plantas, como por exemplo em híbridos entre espécies do gênero *Brassica* (CHEN & PIKAARD, 1997) e em híbridos de *Arabidopsis thaliana* (LEWIS *et al.*, 2004).

A dominância nucleolar é um fenômeno epigenético que resulta na ativação preferencial de um conjunto de genes para o rRNA de um parental dominante, em cruzamentos interespecíficos (CHEN *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2004). Os dados da figura 4A indicam que os machos híbridos obtidos do cruzamento entre machos *D. arizonae* e fêmeas *D. mulleri* apresentam um fragmento de 500 pb amplificado por RT-PCR a partir do RNA total, o qual corresponde ao cDNA da região ITS-1 de *D. arizonae*, indicando que, nesse caso, a formação da NOR foi determinada por genes herdados do microcromossomo proveniente do macho *D. arizonae* parental que suprimiu a atividade da NOR do cromossomo X proveniente da fêmea parental *D. mulleri*. Em fêmeas híbridas, o cromossomo X da fêmea parental *D. mulleri* teve sua atividade suprimida em relação ao cromossomo X proveniente do macho parental *D. arizonae*. Em ambos os casos, não foram detectados vestígios de expressão do rDNA proveniente da fêmea parental *D. mulleri*.

Na figura 4B, que mostra os resultados do cruzamento de sentido inverso (machos *D. mulleri* versus fêmeas *D. arizonae*), observa-se tanto em machos como em fêmeas híbridas uma taxa de transcrição maior dos cistrons para o rRNA derivados do parental *D. arizonae*, indicando que, nesse caso, ocorra uma dominância nucleolar parcial. Em híbridos entre trigo e centeio ocorre uma mudança de dominância nucleolar do trigo sobre o centeio para codominância, dependendo de alterações na localização da

NOR originária do centeio (VIEIRA, 1990). Outros estudos indicam que embora seja bem estabelecida a dominância nucleolar em híbridos entre linhagens de *A. thaliana*, esse fenômeno não ocorre em todas as células na situação recíproca, indicando, nesse caso, a existência de um processo estocástico na ativação de cistrons para o rRNA (LEWIS *et al.*, 2004).

Várias hipóteses tentam explicar o fenômeno da dominância nucleolar. Uma delas é que genes dominantes possuem mais ativadores transcricionais, resultando em uma competição entre genes ribossômicos. Outro fator pressupõe que a maquinaria de transcrição dos genes ribossômicos pela RNA polimerase I evolui mais rapidamente entre as espécies do que a maquinaria para as outras duas classes de polimerases. Isso leva a efeitos de dominância baseados na inabilidade aparente de um fator de transcrição chave de uma espécie reconhecer o promotor do gene ribossomal da outra espécie, denominado “fator espécie-específico”.

Outra hipótese para explicar a dominância nucleolar é do acentuador não balanceado (“enhancer imbalance hypothesis”) no qual elementos repetitivos no DNA adjacentes ao promotor da RNA polimerase I atuam como acentuadores independentes de posição e orientação em oócitos e embriões iniciais. Esses acentuadores ligam-se a um ou mais fatores de transcrição que interagiriam com a sequência promotora para ligação da enzima (PIKAARD, 2000 a; b; PIKAARD *et al.*, 1990).

Em vertebrados e plantas, a metilação de citosinas é frequentemente correlacionada com o silenciamento gênico. Evidências em trigo e centeio mostraram que os genes de rRNA de NORs dominantes são menos metilados do que genes de rRNA das NORs reprimidas (NEVES *et al.*, 1995), embora isso não tenha sido observado em híbridos de *Xenopus*, fazendo com que o papel da metilação no processo de dominância nucleolar seja controverso (PIKAARD, 2000 a; b).



LITERA Modificações em histonas que envolvem o DNA também podem desempenhar funções de regulação na dominância nucleolar. A acetilação ou a desacetilação de lisinas na região amino-terminal de várias histonas, principalmente histonas H3 e H4, parecem controlar a atividade gênica, alterando o acesso de fatores de transcrição aos sítios de ligação na superfície do nucleossomo (PIKAARD, 1999). A hiperacetilação de histonas está associada à maior atividade dos genes. Estudos bioquímicos recentes têm sugerido uma combinação entre o padrão de metilação de citosinas e o de acetilação de histonas no processo de dominância nucleolar. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para se determinar se o fenômeno da dominância nucleolar pode, pelo menos em alguns organismos, estar associado à submetilação de citosinas, acetilação de histonas, ou a ambos os processos.

BIOCI Como salientado, a dominância nucleolar pode ser atribuída a diversos fatores cujos efeitos se refletem em nível transcricional. O presente trabalho abre a perspectiva de se analisar quais dos mecanismos de regulação estariam atuando neste processo em *Drosophila*. Contudo, como ressaltado por LEWIS *et al.* (2004), a dominância nucleolar corresponde a um fenômeno complexo no qual as NORs, e não apenas os genes individuais para o rRNA, sejam provavelmente as unidades de regulação.

RICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila melanogaster*, *D. arizonensis*, and their hybrids: The nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 8, p. 3498-3502, 1977.

RICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Morphological and Developmental Studies of *Drosophila melanogaster*, *D. arizonensis* and their Hybrids. *Biological Zool. J. Mar.*, v. 97, p. 195-203, 1978.

Literatura citada

- BAFFI, M.; CERON, C. R. Molecular Analysis of the rDNA ITS-1 Intergenic Spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and Their Hybrids. *Biochemical Genetics*, v. 40, p. 411-421, 2002.
- BICUDO, H. E. M. C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (Grupo Repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. *Tese de livre docência, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, 1979.*
- BICUDO, H. E. M. C. Nucleolar Organizer Activity and Its Regulatory Mechanisms in *Drosophila* species of the "mulleri" complex and their hybrids. *Caryologia*, v. 34, n. 2, p. 231-253, 1981.
- BICUDO, H. E. M. C. Organizadores de Nucléolos em Insetos. *Ciência e Cultura*, v. 37, p. 440-448, 1985.
- BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis*, and their hybrids: The nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 8, p. 3498-3502, 1977.
- BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Morphological and Developmental Studies of *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their Hybrids. *Biologisches Zentralblatt*, v. 97, p. 195-203, 1978.



BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Location of ribosomal cistrons in the salivary gland cells of *D. mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids. *Rev. Brasil. Genet.* IV, v. 3, p. 477-481, 1981.

BROCHETTO-BRAGA, M. R. Determinação das seqüências de cDNA dos alérgenos 2 e 3 do veneno de *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera, Formicidae). *Tese apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Livre Docente na Disciplina Genética*. Rio Claro – Est. São Paulo – Brasil. 2004.

CASSIDY, D. M.; BLACKLER, A. W. Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus *Xenopus*. *Dev. Biol.*, v. 41, p. 84-96, 1974.

CERON, C. R.; DOS SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroiderin hoop. *Rev. Bras. Genet.* v. 15, p. 201-203, 1992.

CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Transcriptional Analysis of Nucleolar Dominante in Polyploid Plants: Biased Expression/Silencing of progenitor rRNA genes is Developmentally regulated in *Brassica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 94, p. 3442-3447, 1997.

CHEN, Z. J.; COMAI, L.; PIKAARD, C. S. Gene Dosage and Stochastic Effects Determine the Severity and Direction of Uniparental Ribosomal RNA Gene



- Silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 14891-14896, 1998.
- CROW, J. F. Cross fertility and isolating mechanisms in the *Drosophila mulleri* groups. *University of Texas Publication*, n. 4228, p. 52, 1942.
- DURICA, D. S.; KRIDER, H. M. Studies on the ribosomal RNA cistrons in interspecific *Drosophila* hybrids. *Dev. Biol.*, v. 59, p. 62-74, 1977.
- DURICA, D. S.; KRIDER, H. M. Studies on the ribosomal RNA cistrons in *Drosophila* hybrids II. Heterochromatic regions mediating nucleolar dominance. *Genetics*, v. 89, p. 37-64, 1978.
- ENDOW, S. A.; GALL, J. C. Differential replication of satellite DN in ploid tissue of *Drosophila virilis*. *Chromosoma*, v. 50, p. 175-195, 1975.
- FRIEMAN, M.; CHEN, Z. J.; SAEZ-VASQUEZ, J.; SHEN, L. A.; PIKAARD, C. S. RNA Polymerase I Transcription in a Brassica Interspecific Hybrid and Its Progenitors: Tests of Transcription Factor Involvement in Nucleolar Dominance. *Genetics*, v. 152, p. 451-460, 1999.
- GUPTA, J. P.; KUMAR, A. Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera, Drosophilidae): nucleolar organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. *Genetica*, v. 74, p. 19-25, 1987.

- HAGELE, K.; RANGANATH, H. A. The chromosomes of two *Drosophila* races: *Drosophila nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicans*. III. Localization of nucleolar organizer regions. *Genetica*, v. 60, p. 123-128, 1983.
- HENNIG, W.; LINK, B.; LEONCINI, O. The location of nucleolus organizer regions in *Drosophila hydei*. *Chromosoma*, v. 51, p. 57-63, 1975.
- LEWIS, M. S.; CHEVERUD, J. M.; PIKAARD, C. S. Evidence for Nucleolus Organizer Regions as the Units of Regulation in Nucleolar Dominance in *Arabidopsis thaliana* Interecotype Hybrids. *Genetics*, v. 167, p. 931-939, 2004.
- LINARES, A. R.; HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Secondary structure constraints in the evolution of *Drosophila* ribosomal RNA expansion segments. *J. Mol. Biol.*, v. 219, p. 381-390, 1991.
- LOHE, A. R.; ROBERTS, P. A. An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. *Genetics*, v. 125, p. 399-406, 1990.
- MARINUCCI, M.; ROMI, R.; MANCINI, P.; DI LUCA, M.; SEVERINI, C. Philogenetic relationships of seven palearctic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS-2 sequence analysis. *Insect Mol. Biol.*, v. 8, n. 4, p. 469, 1999.
- McKEE, B. D. The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. *Chromosoma*, v. 105, p. 135-141, 1996.

McKEE, B. D.; KARPEN, *Drosophila* ribosomal genes function as an X-Y pairing site during males meiosis. *Cell*, v. 61(1), p. 61-72, 1990.

McMURPHY, L. M.; RAYBURN, A. L. Cytological evidence for nucleolar competition in a maize hybrid. *J. Hered.*, v. 85, p. 407-410, 1994.

MOHAN, J. Ribosomal DNA and its expression in *Drosophila melanogaster* during growth and development. *Mol. Gen. Genet.*, v. 147, p. 217-223, 1977.

NEVES, N.; HESLOP-HARRISON, J. S.; VIEGAS, W. rRNA gene activity and control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo developmente im wheat x rye hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, v. 91, p. 529-533, 1995.

ONISHI, T.; BERGLUND, C.; REEDER, R. H. On the mechanism of nucleolar dominance in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 81, p. 484-487, 1984.

PATTERSON, J. T. Sexual isolation in the mulleri subgroup. In: Studies in the genetics of *Drosophila*. V. isolating mechanisms. *University of Texas Publication*, n. 4729, p. 32, 1947.

PIKAARD, C. S. Nucleolar Dominance and Silencing of Transcription. *Trends in plant science*, v. 4, nº 12, p. 478-483, 1999.

PIKAARD, C. S. The Epigenetics of Nucleolar Dominance. *Trends In Genetics*, v. 16, nº 11, p. 495-500, 2000 a.

PIKAARD, C. S. Nucleolar Dominance: Uniparental Gene Silencing on a Multi-Megabase Scale in Genetic Hybrids. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p. 163-177, 2000 b.

PIKAARD, C. S.; PAPE, L. K.; HENDERSON, S. L.; RYAN, K.; PAALMAN, M. H.; LOPATA, M. A.; REEDER, R. H.; SOLLNER-WEBB, B. Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 10, p., 4816-4825, 1990.

REEDER, R. H. Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants. *The Journal of Cell Biology*, v. 101, p. 213-216, 1985.

REEDER, R. H.; ROAN, J. G. The mechanism of nucleolar dominance in *Xenopus* hybrids. *Cell*, v. 38, p. 39-44, 1984.

SEMIONOV, E. P.; MARKOVA, B. A. Direct alterations of the X-chromosomal ribosomal gene repeats in mutant *sc*^o of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 101, p. 35-40, 1997.

SINIBALDI, R. M.; CUMMINGS, M. R. Localization and characterization of rDNA in *D. tumiditarsus*. *Chromosoma*, v. 81, p. 655-671, 1981.

SOPRANO, K. J.; BASERGA, R. Reactivation of ribosomal RNA genes in human-mouse hybrid cells by 12-O-tetradenoylphorbol 13-acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 77, p. 1566-1569, 1980.

SPEAR, B. The genes for ribosomal RNA in diploid and polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*, *Chromosoma*, v. 48, p. 159-179, 1974.

TOVAR, F. J.; SILVA, L. A. F.; RODARTE, R. S.; LEONCINI, O. Characterization of ribosomal DNA (rDNA) in *Drosophila arizonae*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 331-333, 2000.

VIEIRA, A.; MORAIS, L.; BARAO, A.; MELLO-SAMPAYO, T.; VIEGAS, W. S. 1R chromosome nucleolus organizer region activation by 5-azacytidine in wheat x rye hybrids. *Genome*, vol. 33, p. 707-712, 1990.

IV. CONCLUSÕES

4.1. CONCLUSÕES GERAIS

1. Este trabalho permitiu analisar em nível da transcrição e tradução, a dominância nuclear entre *D. arizonae* e *D. mulleri* avaliadas nos híbridos obtidos em ambos os sentidos do cruzamento.
2. Análise da transcrição da região 3' da região transcrita, ITS-1, mostrou que os clones do rRNA presentes no cromossomo X e no microcromossomo de *D. arizonae* são preferencialmente transcritos nos híbridos.
3. Nas fêmeas híbridas provenientes do cruzamento entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, os clones do rRNA presentes no microcromossomo derivado de *D. arizonae* suprimem totalmente a atividade transcricional dos clones oriundos do cromossomo X de *D. mulleri*.
4. Nas fêmeas híbridas provenientes do cruzamento entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, os clones do rRNA de *D. arizonae* é ativado enquanto o conjunto dos clones do rRNA presente no cromossomo X de *D. mulleri* permanece totalmente silenciado.
5. Os híbridos do cruzamento recíproco, envolvendo fêmeas *D. arizonae* versus machos *D. mulleri*, mantiveram uma dominância nuclear por parte de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*. Neste caso, tanto os machos quanto as fêmeas

IV. CONCLUSÕES

4.1. CONCLUSÕES GERAIS

1. Este trabalho permitiu analisar em nível de transcrição o fenômeno da dominância nucleolar entre *D. arizonae* e *D. mulleri* avaliadas nos híbridos obtidos em ambos os sentidos de cruzamentos.
2. Análise da transcrição da região intergênica transcrita, ITS-1, mostrou que os cistrons do rRNA presentes no cromossomo X e no microcromossomo de *D. arizonae* são preferencialmente transcritos nos híbridos.
3. Nos machos híbridos provenientes do cruzamento entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, os cistrons do rRNA presentes no microcromossomo derivado de *D. arizonae* suprime totalmente a atividade transcricional dos cistrons oriundos do cromossomo X de *D. mulleri*.
4. Nas fêmeas híbridas provenientes do cruzamento entre fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonae*, os cistrons do rRNA do cromossomo X originário de *D. arizonae* é ativado enquanto o conjunto dos cistrons do rRNA presente no cromossomo X de *D. mulleri* permanece totalmente silenciado.
5. Os híbridos do cruzamento recíproco, envolvendo fêmeas *D. arizonae* versus machos *D. mulleri*, mostraram uma dominância nucleolar parcial de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*. Nesse caso, tanto os machos quanto as fêmeas



híbridos apresentam uma baixa taxa de transcrição dos cistrons oriundos ou do cromossomo X de *D. mulleri* (nas fêmeas híbridas) ou do microcromossomo desta espécie (nos machos híbridos).

6. Este estudo abre perspectiva de se estabelecer os mecanismos de regulação envolvidos no fenômeno de dominância nucleolar em híbridos das espécies pertencentes ao complexo *mulleri* do grupo repleta, especialmente entre *D. arizonae* e *D. mulleri*.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GERAIS



5.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

BAFFI, M.; CERON, C. R. Molecular Analysis of the rDNA ITS-1 Intergenic Spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and Their Hybrids. *Biochemical Genetics*, v. 40, p. 411-421, 2002.

BICUDO, H. E. M. C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (Grupo *Pipiens*), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. *Tratado de Insetos da USP*. IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, 1979.

BICUDO, H. E. M. C. Nucleolar Organizer Activity and Its Regulatory Mechanisms in *Drosophila* species of the "mulleri" complex and their hybrids. *Caryologia*, v. 34, n. 2, p. 231-253, 1981 a.

BICUDO, H. E. M. C. Is there dosage compensation in *Drosophila* nucleolar organizing

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GERAIS

BICUDO, H. E. M. C. Regulação da atividade organizadora nucleolar. *Ciência e Cultura*, v. 34, p. 465-469, 1982.

BICUDO, H. E. M. C. Organizadores de Núcleolos em insetos. *Ciência e Cultura*, v. 37, p. 440-448, 1985.



T. 1398/05



5.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- BAFFI, M.; CERON, C. R. Molecular Analysis of the rDNA ITS-1 Intergenic Spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and Their Hybrids. *Biochemical Genetics*, v. 40, p. 411-421, 2002.
- BICUDO, H. E. M. C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (Grupo Repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. *Tese de livre docência, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, 1979.*
- BICUDO, H. E. M. C. Nucleolar Organizer Activity and Its Regulatory Mechanisms in *Drosophila* species of the “mulleri” complex and their hybrids. *Caryologia*, v. 34, n. 2, p. 231-253, 1981-a.
- BICUDO, H. E. M. C. Is there dosage compensation in *Drosophila* nucleolar organizing activity? *Rev. Brasil. Genet.* IV, v. 3, p. 347-355, 1981-b.
- BICUDO, H. E. M. C. Regulação da atividade organizadora nucleolar em *Drosophila*. *Ciência e Cultura*, v. 34, p. 465-469, 1982.
- BICUDO, H. E. M. C. Organizadores de Nucléolos em Insetos. *Ciência e Cultura*, v. 37, p. 440-448, 1985.



BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis*, and their hybrids: The nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 8, p. 3498-3502, 1977.

BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Morphological and Developmental Studies of *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their Hybrids. *Biologisches Zentralblatt*, v. 97, p. 195-203, 1978.

BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Location of ribosomic cistrons in the salivary gland cells of *D. mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids. *Rev. Brasil. Genet.* IV, v. 3, p. 477-481, 1981.

BROCHETTO-BRAGA, M. R. Determinação das seqüências de cDNA dos alérgenos 2 e 3 do veneno de *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera, Formicidae). *Tese apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Livre Docente na Disciplina Genética*. Rio Claro – Est. São Paulo – Brasil. 2004.

CASSIDY, D. M.; BLACKLER, A. W. Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus *Xenopus*. *Dev. Biol.*, v. 41, p. 84-96, 1974.

CERON, C. R.; DOS SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroiderin hoop. *Rev. Bras. Genet.* v. 15, p. 201-203, 1992.



- CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Transcriptional Analysis of Nucleolar Dominance in Polyploid Plants: Biased Expression/Silencing of progenitor rRNA genes is Developmentally regulated in *Brassica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 94, p. 3442-3447, 1997.
- CHEN, Z. J.; COMAI, L.; PIKAARD, C. S. Gene Dosage and Stochastic Effects Determine the Severity and Direction of Uniparental Ribosomal RNA Gene Silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 14891-14896, 1998.
- CROW, J. F. Cross fertility and isolating mechanisms in the *Drosophila mulleri* groups. *University of Texas Publication*, n. 4228, p. 52, 1942.
- DURANDO, C. M.; BAKER, R. H.; ETGES, W. J.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M.; DeSALLE, R. Phylogenetic Analysis of the *repleta* Species Group of the Genus *Drosophila* Using Multiple Sources of Characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 16, nº 2, p. 296-307, 2000.
- DURICA, D. S.; KRIDER, H. M. Studies on the ribosomal RNA cistrons in interespecific *Drosophila* hybrids. *Dev. Biol.*, v. 59, p. 62-74, 1977.
- DURICA, D. S.; KRIDER, H. M. Studies on the ribosomal RNA cistrons in *Drosophila* hybrids II. Heterochromatic regions mediating nucleolar dominance. *Genetics*, v. 89, p. 37-64, 1978.

ENDOW, S. A.; GALL, J. C. Differential replication of satellite DN in ploid tissue of *Drosophila virilis*. *Chromosoma*, v. 50, p. 175-195, 1975.

ETGES, W. J.; ARMELLA, M. A.; O'GRADY, P. M.; HEED, W. B. Two new species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the *repleta* group from Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 94, p. 16-20, 2001.

FRIEMAN, M.; CHEN, Z. J.; SAEZ-VASQUEZ, J.; SHEN, L. A.; PIKAARD, C. S. RNA Polymerase I Transcription in a Brassica Interspecific Hybrid and Its Progenitors: Tests of Transcription Factor Involvement in Nucleolar Dominance. *Genetics*, v. 152, p. 451-460, 1999.

GENTILE, K. L.; BURKE, W. D.; EICKBUSH, T. H. Multiple Lineages of R1 Retrotransposable Elements Can Coexist in the rDNA Loci of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 18, p. 235-245, 2001.

GERBI, S. A. Evolution of ribosomal DNA. In: R. S. McIntyre (Ed.) *Molecular Evolutionary Genetics*, Plenum Press, New York, p. 419-517, 1985.

GRANADINO, B.; PENALVA, L. O. F.; SANCHEZ, L. Indirect evidence of alteration in the expression of the rDNA genes in interspecific hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 250, n. 1, p. 89-96, 1996.



GUPTA, J. P.; KUMAR, A. Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Díptera, Drosophilidae): nucleolar organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. *Genetica*, v. 74, p. 19-25, 1987.

LEWIS, M. S.; CHEVREUD, J. M.; PIKAARD, C. S. Evidence for Nucleolar

HAGELE, K.; RANGANATH, H. A. The chromosomes of two *Drosophila* races: *Drosophila nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicans*. III. Localization of nucleolar organizer regions. *Genetica*, v. 60, p. 123-128, 1983.

LINARES, A. R.; RANCOOK, E. M.; DWYER, G. A. Secondary structure constraints

HENNIG, W.; LINK, B.; LEONCINI, O. The location of nucleolus organizer regions in *Drosophila hydei*. *Chromosoma*, v. 51, p. 57-63, 1975.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* V. 66, p. 411-453, 1991.

HOOD, L.; CAMPBELL, J. H.; ELGIN, S. C. R. The organization, expression, and

evolution of antibody genes and other multigene families. *Annu. Rev. Genet.*, v. 9, p. 304-354, 1975.

JAKUBCZAK, J.; XIONG, Y.; EICKBUSH, T. H. Type I (R1) and type II (R2)

ribosomal DNA insertions of *Drosophila melanogaster* are retrotransposable elements closely related to those of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, v. 212, p. 37-52, 1990.

LEONCINI, O.; TOVAR, F. J.; BICUDO, H. E. M. C. Molecular Evidence of Ribosomal DNA (rDNA) Amplification of a Minichromosome Derived from

- Drosophila arizonae* in *D. mulleri*-*D. arizonae* Hybrid males. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, p. 43-45, 1996.
- LEWIS, M. S.; CHEVERUD, J. M.; PIKAARD, C. S. Evidence for Nucleolus Organizer Regions as the Units of Regulation in Nucleolar Dominance in *Arabidopsis thaliana* Interecotype Hybrids. *Genetics*, v. 167, p. 931-939, 2004.
- LINARES, A. R.; HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Secondary structure constraints in the evolution of *Drosophila* ribosomal RNA expansion segments. *J. Mol. Biol.*, v. 219, p. 381-390, 1991.
- LINARES, A. R.; BOWEN, T.; DOVER, G. Aspects of nonrandom turnover involved in the concerted evolution of intergênico spacers within the ribosomal DNA of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Evolution*, v. 39, p. 151-159, 1994.
- LOHE, A. R.; ROBERTS, P. A. An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. *Genetics*, v. 125, p. 399-406, 1990.
- LUCCHINI, S. D.; ANDRONICO, F.; NARDI, I. Molecular structure of the rDNA intergenic spacer (IGS) in *Triturus*; implications for the hipervariability of rDNA loci. *Chromosoma*, v. 106, p. 315-326, 1997.



MARINUCCI, M.; ROMI, R.; MANCINI, P.; DI LUCA, M.; SEVERINI, C.

Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS-2 sequence analysis. *Insect Mol. Biol.*, v. 8, n. 4, p. 469, 1999.

McKEE, B. D. The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*.

Chromosoma, v. 105, p. 135-141, 1996.

McKEE, B. D.; KARPEN, *Drosophila* ribosomal genes function as an X-Y pairing site

during males meiosis. *Cell*, v. 61(1), p. 61-72, 1990.

McMURPHY, L. M.; RAYBURN, A. L. Cytological evidence for nucleolar

competition in a maize hybrid. *J. Hered.*, v. 85, p. 407-410, 1994.

MOHAN, J. Ribosomal DNA and its expression in *Drosophila melanogaster* during

growth and development. *Mol. Gen. Genet.*, v. 147, p. 217-223, 1977.

NEVES, N.; HESLOP-HARRISON, J. S.; VIEGAS, W. rRNA gene activity and

control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo

development in wheat x rye hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, v. 91, p. 529-533, 1995.

NIERRAS, C. R.; LIEBMAN, S. W.; WARNER, J. R. Does *Saccharomyces* need an

organized nucleolus? *Cromosoma*, v. 105, p. 444-451, 1997.

ONISHI, T.; BERGLUND, C.; REEDER, R. H. On the mechanism of nucleolar dominance in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 81, p. 484-487, 1984.

PATTERSON, J. T. Sexual isolation in the mulleri subgroup. In: *Studies in the genetics of Drosophila. V. isolating mechanisms. University of Texas Publication*, n. 4729, p. 32, 1947.

PATTERSON, J. T., STONE, W. S. Evolution in the genus *Drosophila*. *The MacMillan Company*, N. York, 1952.

PEREZ-GONZALEZ, C. E.; BURKE, W. D.; EICKBUSH, T. H. R1 and R2 Retrotransposition and Deletion in the rDNA Loci on the X and Y Chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 165, p. 675-685, 2003.

PIKAARD, C. S. Nucleolar Dominance and Silencing of Transcription. *Trends in plant science*, v. 4, n° 12, p. 478-483, 1999.

PIKAARD, C. S. The Epigenetics of Nucleolar Dominance. *Trends In Genetics*, v. 16, n° 11, p. 495-500, 2000 a.

PIKAARD, C. S. Nucleolar Dominance: Uniparental Gene Silencing on a Multi-Megabase Scale in Genetic Hybrids. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p. 163-177, 2000 b.



PIKAARD, C. S.; PAPE, L. K.; HENDERSON, S. L.; RYAN, K.; PAALMAN, M. H.; LOPATA, M. A.; REEDER, R. H.; SOLLNER-WEBB, B. Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 10, p., 4816-4825, 1990.

POLANCO, C.; GONZALEZ, A. I.; la FUENTE, A.; DOVER, G. A. Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox. *Genetics*, v. 149, p. 243-256, 1998.

POLANCO, C.; GONZALEZ, A. I.; DOVER, G. A. Patterns of Variation in the Intergenic Spacers of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Support a Model for Genetic Exchanges During X-Y Pairing. *Genetics*, v. 155, p. 1221-1229, 2000.

RAFAEL, V., ARCOS, G. Subgrupo *inca*, um nuevo subgrupo del grupo *repleta*, com descricao de *Drosophila huancavilcae* N.sp. (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica*, v. 3, p. 233-243, 1989.

REEDER, R. H. Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants. *The Journal of Cell Biology*, v. 101, p. 213-216, 1985.

REEDER, R. H.; ROAN, J. G. The mechanism of nucleolar dominance in *Xenopus* hybrids. *Cell*, v. 38, p. 39-44, 1984.

SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M.T.; von HAESELER, A.; TAUTZ, D. Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 11, p. 513-522, 1994.

SEMIONOV, E. P.; MARKOVA, B. A. Direct alterations of the X-chromosomal ribosomal gene repeats in mutant *sc^o* of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 101, p. 35-40, 1997.

SINIBALDI, R. M.; CUMMINGS, M. R. Localization and characterization of rDNA in *D. tumiditarsus*. *Chromosoma*, v. 81, p. 655-671, 1981.

SOPRANO, K. J.; BASERGA, R. Reactivation of ribosomal RNA genes in human-mouse hybrid cells by 12-O-tetradenoylphorbol 13-acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 77, p. 1566-1569, 1980.

SPEAR, B. The genes for ribosomal RNA in diploid and polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*, *Chromosoma*, v. 48, p. 159-179, 1974.

TAUTZ, D.; HANCOCK, J. M.; WEBB, D. A.; TAUTZ, C.; DOVER, G. A. Complete Sequence of the rRNA Genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 5, p. 366-376, 1988.

TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Two new species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia Sér. Zool.*, v. 90, p. 141-146, 2001.

- THROCKMORTON, L.H., The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In R.C. King, ed. Handbook of genetics. *Plenum Press*, New York, p. 421-469, 1975.
- TOVAR, F. J.; SILVA, L. A. F.; RODARTE, R. S.; LEONCINI, O. Characterization of ribosomal DNA (rDNA) in *Drosophila arizonae*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 331-333, 2000.
- VAN DER SANDE, C. A.; KWA, M.; VAN NUES, R. W.; VAN HEERI-KHUIZEN, H.; RAUE, H. A.; PLANTA, R. J. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *J. Mol. Biol.*, v. 223(4), p. 899-910, 1992.
- VIEIRA, A.; MORAIS, L.; BARAO, A.; MELLO-SAMPAYO, T.; VIEGAS, W. S. 1R chromosome nucleolus organizer region activation by 5-azacytidine in wheat x rye hybrids. *Genome*, vol. 33, p. 707-712, 1990.
- VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 27, 114 p., 1983.
- WASSERMAN, M. Evolution of the replete Group. In: Ashburner, M.; Carson, H. I.; Thompson, J. N. (eds). The Genetics and Biology of *Drosophila*. *Academic Press*, London, p. 61-139, 1982. 1982.



WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila replete* species group. In: Krimbas, C. B. and Powell, J. R. (eds.), *Drosophila inversions polymorphism*, CRC, Boca Raton, p. 455-552, 1992.



VI. RESUMO



6.1. RESUMO

Drosophila mulleri e *D. arizonae* são espécies crípticas pertencentes ao complexo *mulleri* do subgrupo *mulleri* do grupo repleta cujas isolinhagens cruzam-se em laboratório, em ambos os sentidos. Este trabalho teve como principal objetivo a análise da dominância nucleolar em híbridos interespecíficos provenientes dos cruzamentos entre *Drosophila mulleri* e *D. arizonae*, baseado na amplificação da região intergênica não codificadora transcrita ITS-1 como marcador molecular da transcrição dos cistrons de rDNA. *D. mulleri* e *D. arizonae* podem ser diferenciadas quanto ao comprimento da região ITS-1. Em *D. mulleri* o fragmento amplificado para essa região tem 600 pb enquanto em *D. arizonae* corresponde a 500 pb. A amplificação do cDNA por RT-PCR do RNA total extraído das espécies parentais e híbridos seguida de reação de PCR para a obtenção da região correspondente ao ITS-1, mostrou que os cistrons ribossômicos presentes no cromossomo X e no microcromossomo de *D. arizonae* são preferencialmente ativados nos machos e fêmeas híbridos em ambos os sentidos de cruzamento. Esses resultados confirmam, a nível molecular, o fenômeno de dominância nucleolar de *D. arizonae* sobre *D. mulleri*.

VII ABSTRACT



VII. ABSTRACT



7.1. ABSTRACT

D. mulleri and *D. arizonae* are sibling species belonging to the *mulleri* complex of the *mulleri* subgroup of repleta group. These species can be intercrossed in laboratory on both direction. This work analyzes the nucleolar dominance in interspecific hybrids from crosses between *D. mulleri* and *D. arizonae*, based on the amplification of the intergenic noncoding transcribed spacer, ITS-1, as molecular marker of the rDNA cistrons transcription. *D. mulleri* and *D. arizonae* can be distinguished from the length of the ITS-1 region. In *D. mulleri* the ITS-1 spacer is 600 bp in length, whereas in *D. arizonae* this spacer is 500 bp in length. The amplification by RT-PCR of the total RNA isolated from adult flies of the parental species and hybrids followed by PCR reaction in order obtain the correspondent ITS-1 cDNA, showed that the ribosomal DNA cistrons in the X chromosome and microchromosome from *D. arizonae* are preferentially activated in the hybrid males and females in both directions of crosses. These results confirm the phenomenon of nucleolar dominance of *D. arizonae* over *D. mulleri* at the molecular level.



