

Luciane Madureira de Almeida

**Distribuição Genômica do Elemento
Transponível P em Populações de
*Drosophila Sturtevanti***



1910000910



LUCIANE MADUREIRA DE ALMEIDA

**DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA DO ELEMENTO
TRANSPONÍVEL *P* EM POPULAÇÕES DE
Drosophila sturtevantii.**



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

São José do Rio Preto - SP

2000

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

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto



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 em especial à minha orientadora, Prof. Dra. Cláudia Márcia Ap. Carareto, pela amizade, pelo seu entusiasmo incansável, pela atenção e incentivo constantes. Sua dedicação neste, e em outros trabalhos, é um exemplo de profissionalismo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela amizade e por todos os momentos de auxílio, incluindo, em especial, a acurada análise da Pró-forma que aprimorou esta dissertação.

A Prof. Dra. Vera Lúcia Valente Galsky, pelo estágio realizado no Laboratório de *Drosophila*, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A bióloga Fabiana O. Herédia, e outros amigos do Laboratório de *Drosophila*.

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

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

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos pesquisadores que forneceram amostras das linhagens de *Drosophila sturtevantii*.

Ao amigo Felipe, pelo apoio, companheirismo, e pela doação das linhagens NHO e RP₂ de *Drosophila sturtevantii*.

Ao amigo Roberto, que possibilitou o aprendizado de algumas das técnicas moleculares utilizadas.

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 em especial à minha orientadora, **Prof. Dra. Cláudia Márcia Ap. Carareto**, pela amizade, pelo seu entusiasmo incansável, pela atenção e incentivo constantes. Sua dedicação neste, e em outros trabalhos, é um exemplo de profissionalismo a ser seguido.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron**, pela amizade e por todos os momentos de auxílio, incluindo, em especial, a acurada análise da Pró-forma que aprimorou esta dissertação.

À **Prof. Dra. Vera Lúcia Valente Gaisky**, pelo estágio realizado no Laboratório de *Drosophila*, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À bióloga **Fabiana O. Herédia**, e outros amigos do Laboratório de *Drosophila*, pela amizade, incentivo e ensinamentos adquiridos.

Ao **Prof. Dr. José Osmar Gaspar**, pelo apoio e pela cooperação, permitindo o uso de seus equipamentos.

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

Aos funcionários **Sebastião e Paulo**, pela colaboração e eficiência na realização de seus serviços.

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

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Aos pesquisadores que forneceram amostras das linhagens de *Drosophila sturtevantii*.

Ao amigo **Felipe**, pelo apoio, companheirismo, e pela doação das linhagens NHO e RP₂ de *Drosophila sturtevantii*.

Ao amigo **Roberto**, que possibilitou o aprendizado de algumas das técnicas moleculares utilizadas.

Às amigas **Juliana, Mariangela, Flávia Cristina, Luciana e Priscila**, pelo carinho, apoio e companheirismo.

À todos os amigos do Curso de Pós-Graduação, pelo incentivo.

Ao amigo **Arthur**, pelo carinho e incentivo.

Às queridas amigas **Tatiane e Daniela**, pelo carinho, companheirismo, incentivos constantes e dedicação. A amizade de vocês significa muito para mim.

Aos amados irmãos **Heloise, Rogério e Heliane**, que me incentivaram, me consolaram nas horas difíceis, e que aturaram meu constante mau humor. Nada teria sido possível sem o carinho e a ajuda de vocês.

Ao amado **Marcelo**, pela imensa compreensão, pelo estímulo e pelo amor dedicado.

Aos melhores pais do mundo, **Lázaro e Iraci**, pelo amor, pelo carinho, pelo exemplo de vida e pelos esforços realizados em minha formação. Sem vocês ao meu lado este trabalho não seria possível.

À **Deus**, pela vida.

IV. Resultados

1. Análises Fenotípicas

a. Disgenesia gonadal

b. Produtividade

2. Testes Moleculares

2.1 Transformação e produção da sonda

2.2 Identificação de sequências P

2.3 Análise do número de cópias do elemento P

2.4 Análise da integridade dos elementos P

V. Discussão

VI. Resumo e Conclusões

VII. Summary and Conclusions

VIII. Referências Bibliográficas

Índice

I. Introdução	01
II. Objetivos	13
III. Material e Métodos	14
A. Linhagens	14
B. Metodologia	15
1. Análises Fenotípicas	15
2. Análises Moleculares	16
2.1 Extração do DNA	16
2.2 PCR	17
2.3 Transformação rápida e clonagem da bactéria DH5 α para multiplicação do plasmídeo p π 25.1	18
2.4 Hibridação em membrana	19
3. Análises Estatísticas	22
IV. Resultados	23
1. Análises Fenotípicas	23
a. Disgenesia gonadal	23
b. Produtividade	28
2. Testes Moleculares	34
2.1 Transformação e produção da sonda	34
2.2 Identificação de seqüências <i>P</i>	36
2.3 Análise do número de cópias do elemento <i>P</i>	38
2.4 Análise da integridade dos elementos <i>P</i>	47
V. Discussão	64
VI. Resumo e Conclusões	77
VII. Summary and Conclusions	80
VIII. Referências Bibliográficas	83

I. INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis são segmentos de DNA capazes de se movimentarem de uma posição à outra no genoma de seus hospedeiros. Apesar de constituírem um grupo bem amplo e heterogêneo, os elementos transponíveis apresentam algumas características básicas que permitem sua identificação: possuem seqüências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades, denominadas repetições terminais; contém genes que codificam uma enzima responsável pela sua transposição; criam, ao se inserirem no DNA, pequenas duplicações no sítio alvo de inserção chamadas repetições diretas do DNA alvo e existem em múltiplas cópias no genoma (Capy *et al.*, 1998).

A relação entre os elementos transponíveis e o genoma de seus hospedeiros é altamente complexa e pouco entendida. Porém, é de concordância geral que sua presença pode gerar mutações ou rearranjos cromossômicos e, ainda, afetar a expressão gênica.

A propriedade especial de transposição tem propiciado muitas especulações sobre a possível função dos elementos transponíveis na evolução; fala-se tanto em parasitas genômicos (Hickey, 1982), como em agentes de reorganização gênica (Capy *et al.*, 1998), para designar o seu papel evolutivo. Devido à sua natureza invasiva, pela aparente ausência de manifestações fenotípicas benéficas relacionadas à sua presença, e considerando também que algumas das conseqüências da transposição são fracamente destrutivas, alguns pesquisadores passaram a propor que os elementos de transposição não precisam prover vantagens adaptativas aos organismos hospedeiros para justificar sua presença nos genomas. Esta hipótese ficou conhecida como hipótese do Gene Egoísta, onde o elemento é tratado como um parasita, cuja única função é sua própria sobrevivência (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). A outra hipótese propõe que estes elementos são fonte geradora inesgotável de variabilidade genética, pois causam mutações e rearranjos gênicos, fornecendo variantes genéticas para as populações, que servem como alternativas adaptativas sobre as quais a seleção pode atuar (Bingham *et al.*, 1982).

Elementos transponíveis podem afetar 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). Além disso, quando existem duas ou mais cópias em um mesmo cromossomo, a recombinação entre os dois elementos pode causar uma deleção ou inversão da região intermediária. Ainda, uma seqüência eliminada por meio deste mecanismo pode vir a ser inserida, junto com o elemento que a carrega, em outra parte do genoma (Lewin, 1994).

As inversões geradas pela recombinação entre dois elementos transponíveis podem ter conseqüências distintas, tais como a alteração da seqüência localizada no ponto de quebra, a segregação dos genes dentro da seqüência invertida e a modificação da expressão dos genes devido a alteração de suas posições nos cromossomos. Recentemente, tem sido ainda demonstrado que os elementos transponíveis podem ser recrutados pelo genoma de seus hospedeiros originando novos padrões de expressão gênica; este processo é denominado de domesticação (Capy *et al.*, 1998).

Os elementos transponíveis são agrupados em duas principais classes, de acordo com o mecanismo por eles utilizados para a transposição (Finnegan, 1989). Elementos da Classe I são aqueles que se transpõem por duplicação, via transcrição reversa de um RNA intermediário. As principais etapas do processo são: 1. a transcrição do elemento integrado, dando origem a um RNA, 2. a conversão do RNA em DNA de fita dupla, pela transcriptase reversa codificada pelo próprio transposon e 3. a integração desse cDNA em um novo sítio genômico pela ação da integrase, também codificada pelo próprio transposon. Este processo leva a uma pequena duplicação do sítio alvo da inserção (Bingham & Zachar, 1989).

Os elementos da Classe II movem-se principalmente por um mecanismo conservativo denominado *cut and paste* onde a excisão do elemento é seguida pela sua reinserção em outro lugar do genoma. Estes elementos possuem repetições terminais invertidas de 10 a 500 pb e, quando autônomos, codificam uma enzima denominada transposase, responsável pela transposição (Engels *et al.*, 1990).

De acordo com Capy *et al.* (1998), os elementos da Classe I são denominados de retrotransposons e incluem duas subclasses. A subclasse I contém elementos estruturalmente semelhantes aos retrovírus, com 5 a 9 Kb de comprimento e longas repetições terminais (do inglês: *Long Terminal Repeats*). Esta subclasse é subdividida nas superfamílias *Ty-copia* e *gypsy-Ty3*, com base no arranjo de seus domínios codificadores de proteínas. Ambas são amplamente distribuídas em fungos, plantas e animais, fato que

sugere terem estes retrotransposons uma origem muito antiga. Uma terceira superfamília, denominada *Tf1*, que foi encontrada em *Saccharomyces cerevisiae*, assemelha-se a superfamília *gypsy-Ty3* quanto aos domínios codificadores de proteínas, mas se diferencia desta por não possuir um RNA transportador iniciador. A subclasse II contém os elementos que não se assemelham aos retrovírus e não possuem LTRs. Esta subclasse é subdividida, de acordo com o comprimento dos elementos, nas superfamílias SINE (do inglês: *Short Interspersed Nuclear Element*), com aproximadamente 500 pb de comprimento, e LINE (do inglês: *Long Interspersed Nuclear Element*), com comprimento variando entre 5 a 8 Kb. Os SINES já foram encontrados em tartarugas, tabaco, salmões e mamíferos e os LINES em fungos, plantas, *Drosophila* e também mamíferos. Elementos dessas duas subfamílias têm recentemente sido relacionados a origem de doenças humanas (Miki, 1998) como por exemplo os elementos Alu (SINE) e L1 (LINE).

Os elementos da Classe II são mais heterogêneos que os da Classe I e também são subdivididos em duas subclasses, usando como critérios, principalmente, a seqüência, o comprimento e a composição das repetições terminais invertidas. Segundo Capy *et al.* (1998), os elementos da subclasse I são agrupados nas superfamílias *mariner-Tc1*, amplamente distribuída nos fungos, invertebrados e vertebrados, e *ISa*, freqüente em procariotos. Os elementos da subclasse II são agrupados em seis superfamílias: *ISb*, *MuDr*, *CACTA*, *Tx*, *hAT* e *P*. Os elementos pertencentes as quatro primeiras superfamílias já foram encontrados em bactérias (*ISb*), em milho (*MuDr* e *CACTA*) e na rã *Xenopus laevis* (*Tx*). Já os elementos da superfamília *hAT*, que subdivide-se nas famílias *hobo*, *Ac* e *Tam-3*, já foram encontrados em *Drosophila melanogaster* (*hobo*), milho, grama e arroz (*Ac*) e na dicotiledônea *Antirrhinum majus* (*Tam-3*).

* A superfamília *P* é característica de espécies de *Drosophila* do subgênero *Sophophora*, mas seus elementos já foram também encontrados em espécies dos subgêneros *Drosophila* (Loreto *et al.*, 1998), *Dorsilopha* e *Scaptodrosophila* (Daniels *et al.*, 1990). Também foram encontradas em espécies relacionadas ao gênero *Drosophila*, como é o caso de *Scaptomyza pallida* (Simonelig & Anxolabéhère, 1991) e *Liodrosophila aerea* (Daniels *et al.*, *op. cit.*), e na mosca varejeira *Lucillia cuprina* (Perkins & Howells, 1992).

Capy *et al.* (*op. cit.*) consideram ainda uma terceira classe de elementos transponíveis, onde estão agrupados todos aqueles que possuem características não-usuais



e mecanismos de transposição ainda incertos. A Classe III inclui as superfamílias *MITE* (do inglês: *Miniature Inverted Repeat Transposable Elements*) e *FB* (do inglês: *Foldback*), que podem ser diferenciadas pelo comprimento de seus invertidos terminais, os quais são curtos para *MITE* e longos para *FB*. Estes elementos ocorrem em *Oryza sativa* e *Zea mays*, e *Drosophila*, respectivamente.

De acordo com Lewin (1990), foram propostos dois modelos, o de transposição conservativa e o de transposição replicativa, que diferem quanto aos seus produtos finais, para explicar o processo de transposição via DNA. O primeiro é o mecanismo através do qual o elemento transponível é simplesmente removido de um dado local e inserido em outro. Por isso, o nome conservativa, pois conserva o mesmo elemento individual e não implica no aumento do número de cópias. O segundo é o mecanismo através do qual um elemento é duplicado antes de ser transportado para um novo local. Assim, uma cópia do mesmo permanece no local e outra é inserida em um novo sítio. Esse processo envolve a duplicação do elemento transponível e resulta em aumento do seu número de cópias no genoma.

Segundo Daniels *et al.* (1990), existem duas maneiras pelas quais os elementos transponíveis podem se originar em uma espécie: origem “de novo”, por mutações, ou eventos de recombinação, que alteram ou reorganizam as seqüências presentes no genoma, ou através de uma transferência interespecífica muito rara, denominada transmissão horizontal, que se realiza através de vetores, como os vírus, por exemplo. Esta origem é também possível através de hibridação interespecífica (Montchamp-Moreau *et al.*, 1993).

A partir da integração de elementos transponíveis no novo genoma, o modelo degenerativo de Kaplan *et al.* (1985) descreve a evolução de uma única população finita, onde os elementos completos e ativos invadem uma população que não os contém aumentam rapidamente em frequência até seu número auto-regulado. Concomitantemente, inicia-se o processo degenerativo, convertendo os elementos completos em defectivos, atingindo um estado de quase-equilíbrio. Eventualmente, o processo degenerativo leva à perda dos elementos completos da população e a sua eliminação através de deriva genética.

A regulação dos elementos transponíveis é variável entre as diferentes espécies, mas pode também variar entre indivíduos da mesma espécie, devido a efeitos maternos e a diferenças genômicas específicas da linhagem (Engels, 1989). Há evidências de que a

manutenção destes elementos nas populações é resultante de um equilíbrio entre o aumento transposicional em número de cópias e algumas forças opostas, tais como a auto-regulação, seleção contra inserções mutacionais e indução de rearranjos cromossômicos deletérios por recombinação desigual (Charlesworth & Charlesworth, 1983; Kaplan & Brookfield, 1983; Kaplan *et al.*, 1985; Langley *et al.*, 1988). Assim, a mobilização dos elementos transponíveis é regulada por mecanismos que controlam a sua mobilização indiscriminada a conseqüente interrupção do funcionamento de um número cada vez maior de genes, que são necessários à atividade celular.

Depois de sua descoberta no milho por Barbara MacClintock, durante a década de 40, os elementos transponíveis têm sido encontrados em uma grande variedade de organismos, desde bactérias até o mais complexo eucarioto, sendo o principal constituinte do DNA moderadamente repetido do genoma de seus hospedeiros (Capy *et al.*, 1998). Por exemplo, dois terços da fração do DNA moderadamente repetido ou 10% do genoma total de *Drosophila melanogaster* é constituído por estes elementos. Nesta espécie, diferenciam-se as seguintes famílias de elementos transponíveis: *I*, *copia*, *gypsy*, *Het-A*, *TART*, *P*, *hobo*, *mariner*, *foldback*, *pogo* e *jockey* (Capy *et al.*, *op. cit.*).

A família de elementos transponíveis *P* foi a primeira a ser caracterizada em *D. melanogaster* e vem sendo extensivamente estudada tanto no nível genético como molecular. Esta família é particularmente importante porque pode produzir, quando em seu estado ativo, um grupo de traços genéticos não-usuais, conhecidos como disgenesia híbrida (Kidwell *et al.*, 1977).

A disgenesia híbrida *P-M* é o nome dado ao grupo de traços genéticos correlacionados que são observados na progênie F1 de cruzamentos entre machos de um tipo de linhagem de *D. melanogaster*, chamada *P* (contribuinte paterno, que possui seqüências *P* ativas), e fêmeas de um segundo tipo chamado *M* (contribuinte materno, que não possui seqüências *P*, ou possui apenas seqüências *P* incompletas e, portanto, inativas). Os descendentes deste tipo de cruzamento que apresentam estes traços genéticos são referidos como híbridos disgênicos.

Os traços genéticos produzidos pela disgenesia *P-M* incluem vários tipos de mutações que freqüentemente são instáveis, esterilidade, recombinação em machos e rearranjos cromossômicos. Estes traços parecem ser restritos à linhagem germinativa de ambos os sexos (Kidwell *et al.*, *op. cit.*). Em um dos trabalhos clássicos sobre este assunto,

Schaefer *et al.* (1979), estudando os efeitos genotípicos da disgenesia em híbridos de *D. melanogaster*, produzidos através do cruzamento de uma linhagem *P* forte (Harwich) e fêmeas de uma linhagem *M* (Canton S), observaram que à temperatura de 27°C a 29°C todos os descendentes apresentavam ovários disgênicos, ou seja, com dimensões reduzidas a cerca de 25% do tamanho normal. A produtividade foi também bastante reduzida.

No sistema P-M, o potencial de atividade *P* refere-se à habilidade de mobilização do elemento *P* que está no seu estado regulado, enquanto que a capacidade de uma linhagem regular ou suprimir a atividade do elemento *P* é denominada como susceptibilidade ao fator *P*. Estas duas propriedades, que compreendem o conjunto de ações de todos os mecanismos que afetam a regulação do elemento *P* (Kidwell & Novy, 1983), podem ser avaliadas através de cruzamentos diagnósticos. O grau de atividade do fator *P* pode ser avaliado pela frequência de disgenesia gonadal em descendentes do cruzamento entre fêmeas de uma linhagem *M* e machos de uma linhagem que se queira classificar quanto ao sistema P-M (cruzamento diagnóstico A). A susceptibilidade ao elemento *P* que é introduzido em uma linhagem pode ser avaliada nos descendentes do cruzamento entre fêmeas da linhagem em estudo com machos de uma linhagem *P* forte (cruzamento diagnóstico A*).

De acordo com as propriedades definidas acima, as linhagens podem ser classificadas em quatro tipos. Linhagens *P* têm de baixos a altos níveis de potencial de atividade *P* e também apresentam baixos níveis de susceptibilidade ao fator *P*. Linhagens *Q* têm níveis extremamente baixos de atividade potencial e de susceptibilidade ao *P*. Indivíduos das linhagens *P* ou *Q* apresentam geralmente entre 25 a 60 cópias de seqüências *P* em seu genoma haplóide (Bingham *et al.*, 1982; Rubin *et al.*, 1983). Linhagens *M* e *M'*, raramente têm algum nível de atividade potencial *P*. Enquanto que as linhagens *M* são desprovidas de elementos *P* e têm um nível extremamente alto de susceptibilidade a este elemento, as linhagens *M'* têm a susceptibilidade ao *P* variável entre níveis extremamente altos e moderadamente baixos (Anxolabéhère *et al.*, 1985). Linhagens *M'* apresentam de poucas a cerca de 50 cópias *P* em seus genomas, sendo muitas, se não todas, cópias defectivas (Bingham *et al.*, 1982; Black *et al.*, 1987).

A análise molecular de seqüências *P* permitiu a identificação de dois tipos estruturais distintos destes elementos, os completos e os defectivos, ou incompletos (O'Hare & Rubin, 1983). O elemento *P* completo possui 2,9 kb em seu comprimento e é



estruturalmente composto por quatro *exons*, flanqueados por seqüências invertidas terminais de 31 pb, e três *introns*. Dependendo do padrão de processamento do pré-RNA mensageiro do elemento completo, dois polipeptídios conhecidos podem ser formados: um resultante da completa eliminação dos *introns*, produzindo uma transposase funcional de 87 KDa, e outro originado pela não eliminação do último *intron* (IVS3) produzindo um proteína menor, com aproximadamente 66 KDa, e que apresenta atividade repressora da transposição (Laski *et al.*, 1986). Este padrão de processamento diferencial do RNA mensageiro é tecido-específico e deve-se a fatores somáticos que inibem a retirada do terceiro *intron* (Siebel *et al.*, 1992). Sendo assim, a transposase é produzida apenas no tecido germinativo e a proteína repressora da transposição é produzida no tecido somático.

Elementos defectivos são derivados deletados de elementos completos, que perderam a capacidade de codificar a transposase por si próprios, mas podem se mobilizar se a transposase lhes for fornecida *in trans* (Spradling & Rubin, 1982).

A taxa de transposição do elemento *P* é controlada por uma série de mecanismos relacionados tanto com a estrutura do elemento como com sua interação com o genoma hospedeiro. Segundo Capy *et al.* (1998) foram descritos pelo menos seis tipos de regulação em *Drosophila*. O primeiro tipo, como qualquer seqüência codificadora, é a regulação devida a própria seqüência *cis*-regulatória do elemento transponível. O segundo é a auto-regulação através da titulação da transposase, que pode se ligar a região promotora de elementos, tanto completos, como incompletos, que passam a competir pela enzima. O terceiro tipo, citado anteriormente, é a regulação tecido-específica dependente da produção de uma proteína de 66 KDa em tecidos somáticos, que compete com a transposase pelo sítio promotor do elemento.

Um quarto tipo de regulação da transposase é devido a efeitos maternos, ou também chamada regulação pelo citotipo *P*. O acúmulo de uma pequena quantidade da proteína repressora de 66 KDa, maternalmente herdada durante a oogênese, pode ser suficiente para especificar e transmitir o citotipo *P*. Este repressor tem um *feedback* positivo interagindo em sua própria síntese, resultando em maior ou menor eficiência do retirada do IVS3, de acordo com a concentração do pré-RNA mensageiro *P*. Assim, quando a concentração do pré-RNA mensageiro *P* é baixa, a eficiência do seu processamento é baixa, e isto leva a produção da proteína repressora de 66 KDa e pouca ou nenhuma produção da transposase. Em contraste, quando a concentração do pré-RNA

mensageiro *P* é alta, o seu processamento é eficiente e produz a transposase ativa com 87 KDa, que permite a transposição dos elementos *P* herdados paternalmente.

Outro tipo de regulação é devido à presença de elementos *P* deletados internamente, da posição 807 a 2561, formando uma sequência de 1154 pb de comprimento. Estes elementos, denominados KP, competem, bloqueiam e em alguns casos, impedem a atividade da transposase produzida pelo elemento completo.

Finalmente, a regulação controlada por fatores produzidos pelos hospedeiros, como é o caso das proteínas IRBP (*Inverted Repeat Binding Protein*) e as PSI (*P element Somatic Inhibitor*), que interagem com 16 dos 31 pb das repetições terminais invertidas regulando a transposição do elemento *P*.

A variação geográfica e temporal das seqüências *P* em populações naturais de *D. melanogaster* tem sido amplamente investigada. Anxolabéhère *et al.* (1989), estudando amostras de 200 populações provenientes dos cinco continentes, coletadas até 1980, relataram uma profunda diferenciação na estrutura e na atividade das seqüências *P*, de acordo com a localização geográfica. Na América do Norte as populações eram praticamente todas *P* ou *Q*, havendo nos Estados Unidos uma variação gradual de uma para outra, sendo as populações da região sul *P* fortes. Na África Central também foram encontrados os tipos *P* e *Q*, e no sul da África foram encontradas linhagens *M'*. Na África do Norte, Europa e Ásia, a distribuição mudou consideravelmente: os tipos *P* e *Q* foram encontrados apenas nas extremidades do continente eurasiático (França, Japão e litoral chinês) e o restante das populações eram *M'*.

Vários estudos moleculares mostraram também a existência de um gradiente longitudinal de distribuição do número de cópias das seqüências *P*. O número de cópias decresceu da França até a Ásia Central e também da região de Pequim para o interior da China. Na Oceania, os tipos *P* e *Q* foram encontrados nas ilhas e uma variação latitudinal foi encontrada na Austrália, com populações *P* e *Q* ao norte e *M'* ao sul (Anxolabéhère *et al.*, 1990; Boussy, 1988; Boussy & Kidwell, 1987; Boussy *et al.*, 1998).

Os dados de distribuição geográfica são compatíveis com a hipótese formulada por Kidwell *et al.* (1979) de uma invasão recente dos elementos *P* na espécie *D. melanogaster*. Esta invasão teria ocorrido na América do Norte antes de 1950, sendo os epicentros possíveis o sul dos Estados Unidos ou América Central. Segundo Anxolabéhère *et al.* (1989), a invasão das populações da Europa, e dos outros continentes, pelos

elementos *P*, ocorreu após 1950 e foi decorrente do cruzamento de indivíduos provenientes do continente americano por um processo de invasão em cascata que ainda não estaria totalmente concluído.

Anxolabéhère *et al.* (*op. cit.*) propuseram que durante a fase inicial de invasão das populações americanas produziram-se elementos defectivos, cuja presença limita o potencial disgênico dos indivíduos. A invasão das populações francesas (tipo *M'*) por fontes contendo uma mistura de elementos completos e incompletos conduziu, pelo mesmo fenômeno de deleções internas, ao aumento da frequência relativa de elementos defectivos e à formação de populações com potencial disgênico *P* baixo. Estas novas populações passaram a propagar estes elementos *P* essencialmente defectivos e deram origem às fontes eurásianas que são atualmente *M'*. Este modelo também se sustenta ao nível molecular, devido à existência de um decréscimo gradual do número de cópias dos Estados Unidos para a Europa, e da existência do elemento deletado *KP*, freqüente na Europa e raro nos Estados Unidos.

O modelo de Kaplan (1985) pode ser tomado como uma descrição razoável da dinâmica da invasão de populações dos diferentes continentes pelos elementos *P*, nas quais, de acordo com o modelo, ocorre a progressão do estado *M* para *P*, *P* para *Q* e *Q* para *M'*, em populações que estão evoluindo quanto ao sistema *P-M*.

O gênero *Drosophila* surgiu durante o Eoceno (Cenozóico, Terciário), há aproximadamente 60 milhões de anos, a partir de várias radiações dentro da família *Drosophilidae*. De acordo com Throckmorton (1975), ao longo do tempo este grupo sofreu extensiva diversificação originando cinco grandes radiações, a mais precoce produziu o subgênero *Scaptodrosophila*, sendo seguida pelas radiações *Sophophora* e *Drosophila*, esta com três ramos: radiações *virilis-repleta*, *immigrans* e *hirtodrosophila*.

Elementos *P* parecem estar presentes no genoma de drosofilídeos há muito tempo (Simonelig & Anxolabéhère, 1994). Comparações de todos os tipos de elementos *P* sugerem que existam diversas subfamílias que divergem em cerca de 30% em suas seqüências de DNA. Estas subfamílias são chamadas *M*, *O* e *T*. A subfamília *M* foi primeiramente descrita nas espécies, *D. bifasciata* e *D. imaii* do grupo *obscura* (Haring *et al.*, 1995), mas também inclui os elementos *P* de *D. melanogaster* e aqueles dos grupos *saltans* e *willistoni*. A subfamília *O*, além de ser encontrada em *D. bifasciata* e em *D. imaii* foi também identificada em *Scaptomyza pallida* (Haring *et al.*, *op. cit.*; Hagemann *et al.*,



1996) e a subfamília T em *D. tritis*, *D. ambigua* e *D. obscura*, também espécies do grupo *obscura* (Hagemann *et al.*, 1996).

Mais de uma das três subfamílias de *P* podem ser encontradas em uma mesma espécie, como é o caso dos elementos dos tipos O e M encontrados em *D. bifasciata* e *S. pallida*. Em alguns casos, a divergência da sequência observada é compatível com a filogenia que envolve a espécie, e apóia a teoria de transmissão vertical do elemento. Entretanto, em outros casos, a divergência é incompatível com a filogenia, sendo melhor explicada por transmissão horizontal. Clark & Kidwell (1997), propuseram o mecanismo de transmissão horizontal como o mais plausível para explicar as quatro incongruências detectadas no subgênero *Sophophora* entre a filogenia da família *P* e a filogenia de seus hospedeiros.

Uma das incongruências filogenéticas foi observada nos grupos *saltans* e *willistoni* e na espécie *D. melanogaster*, do grupo *melanogaster*. Clark *et al.* (1995), consideraram ser óbvio, pelo grau de similaridade, que estes elementos sejam descendentes de um único elemento *P* ancestral e relataram quatro evidências a favor da proposição de transferência horizontal do elemento *P* de *D. willistoni* para *D. melanogaster*: 1ª) as linhagens antigas de *D. melanogaster* que foram coletadas antes de 1950 e mantidas em laboratório são M; 2ª) as sequências de *P* de *D. willistoni* e *D. melanogaster* diferem em apenas um nucleotídeo; 3ª) todas as espécies do grupo *melanogaster* não possuem o elemento *P* canônico, exceto da própria *D. melanogaster*; 4ª) foram amplificadas sequências *P* no ácaro *Proctolaelaps regalis* (Houck *et al.*, 1991), considerado como o vetor mais provável da transferência horizontal entre as espécies *D. willistoni* e *D. melanogaster*.

Em um estudo posterior, Clark & Kidwell (1997), propuseram três ocorrências adicionais de transferência horizontal do elemento *P*. A grande similaridade das sequências (apenas 7,8% de divergência) do elemento *P* do tipo M de *D. bifasciata*, do grupo *obscura*, com o elemento *P* de *Scaptomyza pallida*, sugere a transferência horizontal desta espécie para aquela. Também, a baixa divergência (cerca de 8,1%) das sequências *P* dos elementos do tipo O de *D. bifasciata* e de algumas espécies dos grupos *saltans* e *willistoni* sugerem a ocorrência de transferência horizontal. Finalmente, a transferência de sequências *P* de *D. sucinea*, do grupo *willistoni*, para espécies do grupo *obscura* do Novo Mundo, é sugerida pela taxa de divergência menor que 10,5%. Segundos os autores, explicações alternativas para estas incongruências da filogenia do elemento *P* e seus

hospedeiros podem ser consideradas, mas elas certamente não sugerirão explicações mais plausíveis que a de transferência horizontal.

Os autores acima citados discutiram ainda que existem evidências de que algumas subfamílias de *P* possam ter sido envolvidas em mais de um caso de transferência horizontal. Por exemplo, o elemento *P* canônico pode ter sido envolvido em pelo menos dois casos distintos de transferência, um seria de um doador não conhecido para as linhagens do grupo *saltans-willistoni* e outro seria de *D. willistoni* para *D. melanogaster*.

Em relação à possibilidade de ocorrência de múltiplas transferências horizontais, a que envolve o elemento *P* do tipo O de *D. bifasciata* é particularmente interessante. Enquanto a sequência *P* desta espécie difere em mais de 8% da sequência das espécies do grupo *saltans* e *willistoni*, difere em apenas cerca de 1% da sequência *P* de *S. pallida*. Clark & Kidwell (1997) sugeriram que este elemento tenha se envolvido em três casos distintos de transferência horizontal: de um doador não conhecido para as linhagens do grupo *saltans* e *willistoni*; destas linhagens para *S. pallida* e, posteriormente, de *S. pallida* para *D. bifasciata*. Esta hipótese parece ser mais plausível que a da transferência do elemento *P* do grupo *saltans* e *willistoni* para *D. bifasciata* e desta para *S. pallida*, isto porque, sendo *S. pallida* uma espécie cosmopolita, poderia transferir estas sequências dos grupos *saltans* e *willistoni*, no Novo Mundo, para *D. bifasciata*, no Velho Mundo.

Várias propriedades da biologia e da atividade dos elementos *P* são consistentes com a hipótese de transferência horizontal. Primeiro, eles possuem todas as propriedades necessárias para sua movimentação nos genomas apropriados. Segundo, estudos teóricos e laboratoriais demonstram a alta eficácia da transposição do elemento *P* nos genomas, superando qualquer efeito deletério associado com a transposição. Terceiro, durante a transposição, o elemento *P* geralmente, mas não sempre, duplica-se. Esta duplicação leva ao aumento do número de cópias no genoma ao longo do tempo. Devido a estas características, se o elemento *P* for introduzido em um genoma, que suporte a transposição, ele provavelmente irá se dispersar para toda a população. Embora o mecanismo exato da transferência horizontal seja desconhecido, o mínimo requerido para sua ocorrência é a concordância geológica, temporal e ecológica da espécie doadora e da receptora.

Além da diferenciação na sequência de nucleotídeos, há também variação do número de cópias de cada tipo de elemento de transposição entre as espécies. Mackay



(1989), ao analisar o número de cópias de seis famílias de elementos transponíveis (*cópia*, 297, 412, *roo*, *I*, *P*), em populações naturais de *D. melanogaster*, observou que há variação entre os indivíduos da mesma população, como também, entre diferentes famílias mas, a média de cópias por família em uma população é constante.

O conhecimento do polimorfismo de inserção e da mobilidade dos elementos transponíveis é de grande importância para o estudo da plasticidade e adaptabilidade do genoma. Em relação à *D. melanogaster*, o número de cópias do elemento *P* canônico pode variar de 30 a 50, sendo que as linhagens *P* possuem em média 41 cópias, as linhagens *Q* 34,8 e as linhagens *M'* 21,8 (Ronsseray *et al.*, 1989).

Ao contrário de *D. melanogaster*, estudos relacionados com a ocorrência de elementos transponíveis em outras espécies e grupos do gênero *Drosophila* são menos frequentes. Nos grupos *saltans* e *willistoni*, destacam-se os trabalhos de Kidwell e colaboradores (Daniels & Strausbaugh, 1986; Daniels *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1995; Clark & Kidwell, 1997; Clark *et al.*, 1998) e os de Valente-Gaiesky e colaboradores (Loreto *et al.*, 1998; Regner *et al.*, 1998; Regner *et al.*, 1999). Os estudos sobre as espécies do grupo *saltans* foram todos realizados com antigas linhagens de laboratório.

Sena & Carareto (1997), ao iniciarem um estudo sobre a distribuição de elementos *P* em populações naturais de *D. sturtevantii*, uma das espécies do grupo *saltans*, observaram a ocorrência de disgenesia gonadal em descendentes de intercruzamentos entre linhagens recém-coletadas e uma linhagem procedente da Colômbia. Esta linhagem, derivada dos estoques da Genetics Foundation (Universidade do Texas, Austin, EUA), tem sido mantida em laboratório por mais de 40 anos. Visto que os relatos da literatura indicam que os elementos *P* são residentes antigos do genoma das espécies do grupo *saltans*, não se esperaria encontrar elementos completos e ativos, capazes de induzirem traços disgênicos em descendentes de intercruzamentos, exceto se tivessem ocorrido alterações na composição genética das populações, como também, nos elementos *P* nelas residentes.

Dois tipos de modificações genéticas, decorrentes da dinâmica populacional do elemento *P*, discutidas em Daniels & Strausbaugh (1986), justificariam os resultados obtidos em *D. sturtevantii*. Na natureza, eventos de recombinação entre duas cópias incompletas poderiam ter regenerado elementos completos e funcionais, em algumas populações. Por outro lado, a linhagem COL, mantida durante longo tempo em laboratório, poderia ter perdido por deriva genética todas ou a maior parte de suas seqüências *P*, e se

tornado susceptível à mobilização de elementos ativos. Estas possibilidades incentivaram uma investigação mais detalhada sobre a estrutura e o grau de atividade dos elementos *P* existentes no genoma de *D. sturtevantii*.

II. OBJETIVOS

Neste trabalho foram estudadas nove linhagens de *Drosophila sturtevantii*, provenientes de diferentes regiões geográficas, do Brasil e de outros países, com os seguintes objetivos:

1. averiguar a ocorrência de elementos *P* no genoma das linhagens;
2. investigar a existência de elementos ativos através da indução de disgenesia híbrida;
3. avaliar o número de cópias e a integridade das seqüências *P* encontradas e
4. comparar o número de cópias de linhagens recém-coletadas e de antigas linhagens de laboratório.

COLO	Colômbia (Colômbia)	50	Universidade do Texas, Austin, EUA
AFA	Apaxapan (Veracruz, México)	1998	J.C. Silva (Universidade do Arizona, Tucson, EUA)
MAT	Matlapa (San Luis Potosí, México)	1998	J.C. Silva (Universidade do Arizona, Tucson, EUA)
127	Santana do Riacho (MG, Brasil)	1993	C.R. Vilela (USP, São Paulo, SP)
BRA	Mirassol (SP, Brasil)	1971	W.J. Taddei (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
RP1	São José do Rio Preto (SP, Brasil)	1997	L.M. Almeida (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
NHO	Novo Horizonte (SP, Brasil)	1998	F.R. Torres (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
RP2	São José do Rio Preto (SP, Brasil)	1998	F.R. Torres (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
MAO	Maquine (RS, Brasil)	1998	L. Giesky (UFRGS, Porto Alegre, RS)

A linhagem Harwich-w de *Drosophila melanogaster*, que possui cerca de 60 inserções da seqüência do elemento *P* em seu genoma, foi utilizada como controle positivo para análises moleculares. Esta linhagem foi cedida pela Dra. Margaret O. Kidwell, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (Universidade do Arizona, Tucson, AZ, EUA).

III. MATERIAL E MÉTODOS

A. Linhagens

Neste trabalho foram estudadas nove linhagens de *Drosophila sturtevantii* procedentes de diferentes regiões geográficas. A representação gráfica de cada linhagem, procedência, ano de coleta e respectivos coletores estão indicados no Quadro 1.

Quadro 1. Linhagens de *Drosophila sturtevantii* utilizadas para análises fenotípicas e moleculares.

Linha- gens	Procedências	Ano(s)	Coletores/ Instituições
COL	Vilavicêncio (Colômbia)	50	Universidade do Texas, Austin, EUA
APA	Apazapan (Veracruz, México)	1998	J.C. Silva (Universidade do Arizona, Tucson, EUA)
MAT	Matlapa (San Luis Potosi, México)	1998	J.C. Silva (Universidade do Arizona, Tucson, EUA)
I27	Santana do Riacho (MG, Brasil)	1995	C.R. Vilela (USP, São Paulo, SP)
BRA	Mirassol (SP, Brasil)	1971	W.J. Tadei (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
RP1	São José do Rio Preto (SP, Brasil)	1997	L.M. Almeida (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
NHO	Novo Horizonte (SP, Brasil)	1998	F.R. Torres (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
RP2	São José do Rio Preto (SP, Brasil)	1998	F.R. Torres (UNESP, São José do Rio Preto, SP)
MAQ	Maquiné (RS, Brasil)	1995	V.L.V. Gaiesky (UFRGS, Porto Alegre, RS)

A linhagem Harwich-w de *Drosophila melanogaster*, que possui cerca de 60 inserções da sequência do elemento *P* em seu genoma, foi utilizada como controle positivo para análises moleculares. Esta linhagem foi cedida pela Dra. Margaret G. Kidwell, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (Universidade do Arizona, Tucson, AZ, EUA).



B. Metodologia

1. Análises Fenotípicas

Foram feitos testes fenotípicos para avaliar o potencial de atividade P e a susceptibilidade das linhagens ao elemento P. Para isso, foram realizados cruzamentos à temperatura de 27°C entre as linhagens acima descritas e a linhagem COL, a mais antiga, em ambas as direções. Cruzamentos intralinhagens, realizados nas mesmas condições, foram utilizados como controle. No Quadro 2 estão representados os intracruzamentos e intercruzamentos realizados.

Quadro 2. Cruzamentos realizados entre linhagens de *D. sturtevantii* a 27°C.

<u>Intracruzamentos</u>			<u>Intercruzamentos I</u>			<u>Intercruzamentos II</u>		
fêmeas		machos	fêmeas		machos	fêmeas		machos
COL	vs	COL		*			*	
APA	vs	APA	COL	vs	APA	APA	vs	COL
MAT	vs	MAT	COL	vs	MAT	MAT	vs	COL
I ₂₇	vs	I ₂₇	COL	vs	I ₂₇	I ₂₇	vs	COL
BRA	vs	BRA	COL	vs	BRA	BRA	vs	COL
RP ₁	vs	RP ₁	COL	vs	RP ₁	RP ₁	vs	COL
NHO	vs	NHO	COL	vs	NHO	NHO	vs	COL
RP ₂	vs	RP ₂	COL	vs	RP ₂	RP ₂	vs	COL
MAQ	vs	MAQ	COL	vs	MAQ	MAQ	vs	COL

Moscas recém-emergidas de cada linhagem, foram coletadas dos estoques, separadas por sexo e mantidas isoladas em tubos com meio à base de banana-ágar durante sete dias, para que atingissem a maturidade sexual. Decorrido este período, 20 casais de cada tipo de cruzamento foram colocados em garrafas de 250 mL, contendo o mesmo tipo de meio e mantidos em câmara de temperatura constante, a 25°C, durante 24 horas. A seguir, as garrafas foram transferidas para uma incubadora à temperatura constante de 27°C, onde permaneceram durante sete dias. Após este período os casais foram descartados.

Após o início da emergência, os imagos foram transferidos para garrafas com meio de cultura fresco, que foram mantidas à temperatura de 25°C, durante aproximadamente 72 horas. Após este período, 70 casais de cada cruzamento foram transferidos separadamente para tubos com meio de cultura, onde permaneceram durante sete dias, tempo necessário para que completassem o amadurecimento sexual e ocorressem a cópula e a ovoposição. A seguir, cada casal foi dissecado para averiguação de possíveis anormalidades em suas gônadas e os tubos foram mantidos a 25°C para posterior análise da produtividade por casal.

Com os números de gônadas normais e anormais foram calculados os índices de disgenesia gonadal (Kidwell, 1986), segundo a equação

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

onde, 1N representa o número de indivíduos em que uma das gônadas era anormal, ON representa o número de indivíduos em que ambas as gônadas eram anormais e T indica o número total de indivíduos dissecados.

O meio de cultura utilizado tem a seguinte composição: 1L de água, 10 g de ágar, 500 g de banana, 15 g de fermento Fleishmann, 25 g de açúcar, 8 mL de solução alcoólica nipagin 7%, 2 mL de ácido propiônico.

2. Análises moleculares

2.1 Extração do DNA

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados diferentes métodos de extração de DNA para a realização dos testes moleculares. O protocolo que resultou em um DNA de melhor qualidade para análise de *Southern blot* foi o de Jowett (1996), com modificações, descrito abaixo:

Cerca de 50 indivíduos de cada linhagem foram macerados em tubos *ependorf* após terem sido brevemente mergulhados em nitrogênio líquido. Ao macerado foram adicionados 700µL de Tampão de Lise (NaCl 0,6 M; Tris 2M; EDTA 1M; SDS à 10%) e 4µL de proteinase K (10 mg/mL). A seguir, os tubos foram incubados a 65°C, durante 2 horas, sendo então adicionados 700 µL de Tampão de Extração (Fenol / Tris, pH 7,8).

Após 10 minutos de agitação cuidadosa, os tubos foram centrifugados (13 rpm, durante 10 minutos) e os sobrenadantes foram retirados e transferidos para novos tubos.

O procedimento acima descrito foi repetido três vezes, adicionando-se, a cada vez, um volume igual ao do sobrenadante de Tampão de Extração, na primeira, de solução fenol : clorofôrmio (1:1), na segunda, e de clorofôrmio : álcool isoamílico (24:1), na terceira vez. Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos adicionando-se 1/5 do volume 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 mantidos em geladeira. Na manhã seguinte, o DNA foi centrifugado (13 rpm, durante 15 minutos), desidratado com três banhos de álcool 70%, cada um com duração de 30 minutos, e o *pellet* foi seco em estufa, a 37°C, por aproximadamente 1 hora. A seguir, foram adicionados 30µL de Tampão de Estabilização (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), aguardando-se cerca de 12 horas para que ocorresse a completa eluição do DNA. Decorrido este período, acrescentou-se 1µL de RNase (10mg/mL) ao DNA eluído, mantendo-se o tubo em banho-maria, a 37°C, durante 1 hora. O DNA foi então estocado a -20°C até o seu uso.

A pureza do DNA obtido, necessária para a análise de *Southern*, foi avaliada através de um teste enzimático: 1 µL do DNA das linhagens foi tratado com 0,5 µL da enzima *Eco RI*, 1µL do tampão 10X apropriado e água para completar um volume final de 10 µL, durante 2 horas, a 37°C. Em seguida, este material foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose para avaliar a ocorrência de digestão enzimática.

2.2 PCR

A existência de seqüências *P* no genoma das nove linhagens de *D. sturtevantii* foi inicialmente investigada através da reação em cadeia da polimerase, usando-se como *primers* oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 764 pb. O oligonucleotídeo *sense* (829: 5'AACATAAGGTGGTCCCGTCG 3') é complementar aos nucleotídeos 12 a 31 do elemento *P* canônico e o oligonucleotídeo *antisense* (830: 5'CGACTGGGCAAAGGAAATCC 3') é complementar aos nucleotídeos 757 a 776.

A mistura da reação consistiu de 13,4µL de água deionizada, 2,5µL de tampão 10X; 2,0µL de dNTPS 10mM; 2,5µL de MgCl₂ 50mM; 1,25µL dos *primers sense* e *antisense* 5pmol/µL; 2,0µL do DNA genômico 200ng/µL e 1µL de Taq DNA polimerase 5



unidades/ μL . A mistura foi coberta com uma gota de óleo mineral e submetida a 31 ciclos de PCR, consistindo cada um de 1 minuto de desnaturação a 95°C , 1 minuto de anelamento dos *primers* a 50°C e 3 minutos de extensão a 72°C . O fragmento amplificado de 764 pb foi utilizado para comprovação da existência de elementos transponíveis *P* no genoma destas linhagens e também como sonda.

2.3 Transformação rápida e clonagem da bactéria DH5 α para multiplicação do plasmídeo p π 25.1.

O plasmídeo p π 25.1, utilizado para obtenção de sondas para seqüências *P*, foi multiplicado em bactérias da linhagem DH5 α de *Escherichia coli*. Este plasmídeo recombinante é originado do plasmídeo pBR322 que possui 4360 pb e sítios para várias enzimas de restrição; dentre estes, destaca-se o sítio para a enzima *Bam* HI, na posição 375, onde está inserida a seqüência de 2907pb do elemento *P* de *D. melanogaster*.

Para a transformação rápida (Sambrook *et al.*, 1989) da linhagem DH5 α de *E. coli* com o plasmídeo p π 25.1, algumas colônias foram incubadas em 50 mL de meio líquido SOB (2% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; NaCl 250mM; KCl 250mM; MgCl₂ 10mM e MgSO₄ 10mM).

Após a multiplicação das células e separação por centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em 10 ml de tampão de transformação TFB (KCl 100mM; MnCl₂.4 H₂O 45mM; CaCl₂.2H₂O 10mM; HAcOCl₃ 3mM e Mes 10mM, pH 6,3), incubado em gelo durante 10 minutos, centrifugado e novamente ressuscitado em 1mL de TFB gelado. Adicionou-se, a seguir, 35 μL de DnD^d (acetato de potássio 10mM, pH 7,5; DMSO 90%; DTT 1M). Após 15 minutos, mais 35 μL de DnD^d foram adicionados, mantendo-se a mistura em gelo por mais 10 minutos. A seguir, adicionou-se a esta solução cerca de 1ng do plasmídeo p π 25.1, deixando-se incubar por 30 minutos, submetendo-se, então, as células ao choque térmico, a 42°C , durante 90 segundos. Na seqüência, foram adicionados ao tubo 800 μL de meio SOC líquido (meio SOB mais glicose 200mM), que foi mantido durante 1h, a 37°C , sob agitação rápida, para a regeneração das bactérias.

As bactérias foram, então, plaqueadas em meio sólido seletivo (SOC e ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$) e, após o crescimento, as colônias isoladas foram inoculadas em tubos

individuais com 1,5 mL de meio líquido seletivo SOB (SOB e ampicilina 100 µg/mL), sob agitação e aeração constantes, a 37°C.

O plasmídeo p π 25.1 foi extraído através do Kit Flexi Prep da Pharmacia, segundo as recomendações do fabricante. A comprovação da integridade do plasmídeo assim multiplicado, e o sucesso da transformação, foi realizada pela análise do padrão de fragmentos produzidos pela digestão com a enzima de restrição *Bam* HI.

2.4 Hibridação em membrana

A detecção de seqüências *P* no genoma *D. sturtevanti* foi realizada através de análise de *dot blot*. A averiguação do número de cópias e a integridade das seqüências foi realizada através do método de *Southern* (Sambrook *et al.*, 1989). Para ambos os métodos 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, preparação da sonda, eletroforese em gel de agarose, transferência do DNA para a membrana, hibridação, detecção e revelação do filme autorradiográfico. Os protocolos utilizados foram seguidos conforme as recomendações do fabricante e encontram-se abaixo resumidos:

a. Digestão enzimática do DNA das linhagens

O DNA extraído das linhagens foi digerido durante aproximadamente 15 horas, com enzimas de restrição que reconhecem sítios no elemento *P* canônico (Figura 1), com os seguintes objetivos:

a1. Análise do número de cópias: utilizou-se a enzima *Sal* I, que reconhece um único sítio na seqüência *P*, produzindo fragmentos de comprimentos variáveis, definidos, à direita, pelo sítio *Sal* I (posição 2410) e, à esquerda, pelo primeiro sítio *Sal* I no DNA genômico.

a2. Análise da integridade: utilizaram-se as enzimas *Ava* II e *Acc* I. A enzima *Ava* II reconhece quatro sítios de restrição ao longo da seqüência *P* (posições 23 pb, 500 pb, 1136 pb e 2883 pb), gerando fragmentos internos de 478 pb, 544 pb e 1883 pb, que abrangem praticamente toda a extensão de um elemento completo. A enzima *Acc* I

reconhece dois sítios de restrição, nas posições 53 pb e 2412 pb, gerando um fragmento interno de 2359 pb, que abrange 81% da sequência do elemento *P*.

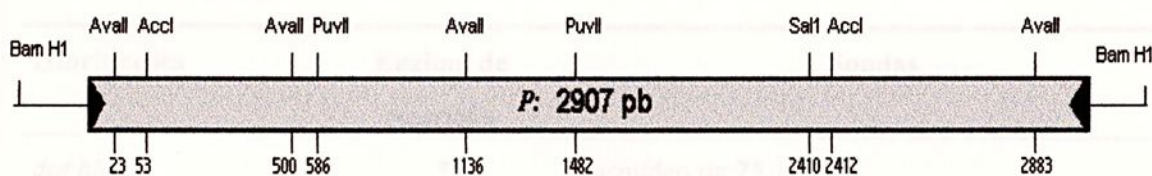


Figura 1. Representação gráfica do elemento *P* com seus principais sítios de restrição.

b. Sondas

Para cada tipo de análise e objetivo foram utilizadas diferentes tipos de sondas (Quadro 3):

b1. Análise de *dot blot*: utilizou-se como sonda o plasmídeo p π 25.1.

b2. Método de *Southern*, para a avaliação de número de cópias do elemento *P*, utilizou-se como sonda: (i) uma mistura de amplificadores do fragmento de 764 pb do elemento *P* das linhagens de *D. sturtevantii* e (ii) o amplificado de 764 pb da sequência *P* do plasmídeo p π 25.1.

b3. Método de *Southern*, para a avaliação da integridade do elemento *P*: (i) para o DNA das linhagens digerido com a enzima *Ava II*, utilizaram-se como sondas o plasmídeo p π 25.1, o amplificado de 764 pb do plasmídeo p π 25.1 e, também, um fragmento de 896 pb obtido da digestão do plasmídeo p π 25.1 com a enzima de restrição *Puv II* e (ii) para o DNA das linhagens digerido com a enzima de restrição *Acc I*, utilizou-se como sonda o fragmento *Puv II*, acima descrito.

Os amplificadores de 764 pb foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, e a banda correspondente foi extraída com o kit SephaglasTM Band Prep e purificado através do Kit ConcertTM Rapid PCR Purification System, de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1%, sendo também a banda de interesse extraída com o sistema SephaglasTM Band Prep.

b4. Controle da reação: para o marcador DNA λ *Hind III*, utilizou-se como sonda o DNA *Hind III* ECL, na concentração de 10ng/ μ L.

Quadro 3. Tipos de hibridações em membranas, respectivas enzimas de restrição e sondas utilizadas.

Hibridações	Enzima de restrição	Sondas
<i>dot blot</i>	*	plasmídeo p π 25.1
<i>Southern blot</i>		amplificado de 764 pb do plasmídeo p π 25.1
número de cópias	<i>Sal I</i>	amplificado de 764 pb do elemento <i>P</i> das linhagens
		plasmídeo p π 25.1
integridade	<i>Ava II</i>	amplificado de 764 pb do plasmídeo p π 25,1
		fragmento <i>Puv II</i> de 896 pb do plasmídeo p π 25,1
	<i>Acc I</i>	fragmento <i>Puv II</i> de 896 pb do plasmídeo p π 25,1

c. Análise de *dot blot*

Foram desnaturados, sob fervura, 3 μ g do DNA genômico das linhagens de *D. sturtevantii* e também da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*. Estas amostras foram aplicadas diretamente sobre a membrana de nylon que, a seguir, foi desnaturada durante 15 minutos com solução de NaCl 1,5M e NaOH 0,5M. A seguir, a membrana foi neutralizada durante 15 minutos em solução NaCl 1,5M e Tris HCl 0,5M, pH 7,5. O DNA foi fixado sob luz ultravioleta. A metodologia utilizada para hibridação e detecção foi a mesma utilizada na análise de *Southern*.

d. Análise de *Southern*

Cerca de 8 a 10 μ g do DNA genômico das linhagens, digeridos *overnight* com as enzimas de restrição apropriadas, foram aplicados em gel de agarose 1% com tampão TAE (Tris base 2M; ácido acético glacial 0,05M e EDTA 0,5M, pH 8,0). Foram também aplicados ao gel cerca de 10 μ L do marcador DNA λ *Hind III*. O gel foi depurinado (HCl 250mM), desnaturado (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5M) e neutralizado (NaCl 1,5M e Tris HCl 0,5M, pH 7,5) à temperatura ambiente, conforme as instruções do fabricante do sistema ECL.

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

O DNA fixado na membrana foi pré-hibridado durante 1h, a 42°C, com tampão de hibridação ECL e, depois hibridado com a sonda apropriada (para cada mL de tampão de hibridação adicionou-se 1ng de sonda marcada), durante aproximadamente 12 horas, a 42°C. Após a hibridação, foram realizados dois banhos de 20 minutos com Tampão Primário (uréia 6M; 0,4% de SDS e 0,5XSSC), à temperatura de 42°C, e dois banhos de 5 minutos com Tampão Secundário (2XSSC), à temperatura ambiente.

Para a detecção da hibridação, a membrana foi banhada em volumes iguais dos reagentes de detecção ECL 1 e 2 e, em seguida, exposta a um filme autorradiográfico (Hyperfilm-ECL), durante 20 minutos. A revelação e fixação do filme foi realizada com o revelador Kodak KGBX Developer and Replenisher e o fixador Kodak KGBX Fixer and Replenisher, de acordo com o procedimento padrão.

3. Análises Estatísticas

Foram realizadas as seguintes análises estatísticas:

a. análise de χ^2 , para avaliar a heterogeneidade dos números de gônadas normais e anormais em descendentes dos intra e intercruzamentos e dos números de cópias dos elementos *P* em diferentes *blots*.

b. análise de variância, para avaliar a heterogeneidade das produtividades médias de machos, de fêmeas e de imagos na descendência de cada intra e intercruzamento. A partir dos resultados obtidos das análises de variância, a determinação de quais médias eram significativamente diferentes foi feita aplicando-se o teste para comparações múltiplas de Tukey (Steel & Torrie, 1960).

c. análise multivariada por aglomerado de variáveis, para avaliar o padrão de similaridade das nove linhagens de *D. sturtevantii*, quanto à presença ou ausência de fragmentos específicos do elemento *P*. O método realiza um agrupamento hierárquico das linhagens quanto ao seu padrão de bandas, onde a distância utilizada entre dois aglomerados é a distância média entre a linhagem em um aglomerado e a linhagem em outro aglomerado, através da distância de correlações.

IV. RESULTADOS

Para averiguação da ocorrência, da integridade e do número de cópias e do grau de atividade do elemento transponível *P* nas linhagens de *D. sturtevantii* foram utilizadas, neste trabalho, análises fenotípicas e moleculares.

1. Análises fenotípicas

Para investigar se existem elementos *P* ativos nas linhagens de *D. sturtevantii*, utilizadas neste estudo, foram realizados 25 tipos de cruzamentos, sendo estudados 70 casais de cada cruzamento. Os resultados da análise morfológica das gônadas e da produtividade destes casais estão abaixo descritos.

a. Disgenesia Gonadal

Os resultados da análise da disgenesia gonadal dos diversos cruzamentos são apresentados na Tabela 1. As morfologias de ovários e testículos normais, de ovários e testículos unilateralmente disgênicos, de ovários bilateralmente disgênicos e de ovários rudimentares são ilustradas na Figura 2.

Os índices de disgenesia gonadal foram baixos, de maneira geral, variando de 0 a 8,57. Nos descendentes dos intracruzamentos foi observada disgenesia ovariana apenas em descendentes da linhagem RP_1 (DG: 2,85); entre os machos, o maior índice de disgenesia (DG: 2,85) foi observado também em descendentes desta linhagem.

Entre os intercruzamentos do tipo I, classe de cruzamentos em que machos das diferentes linhagens foram cruzados com fêmeas da linhagem COL, o maior índice de disgenesia ovariana foi 1,42, encontrado em descendentes do cruzamento entre fêmeas COL e machos RP_1 , seguido por um índice igual a 0,71, em descendentes dos cruzamentos entre fêmeas COL e machos NHO e entre fêmeas COL e machos MAQ. Nos demais cruzamentos desta classe não foram encontrados ovários disgênicos. Quanto à disgenesia testicular, os descendentes dos cruzamentos entre fêmeas COL e machos APA, entre fêmeas COL e machos MAT e entre fêmeas COL e machos RP_1 , apresentaram índice DG igual a 0,71; nos demais cruzamentos não foram encontrados testículos disgênicos.

Entre os intercruzamentos do tipo II, nos quais as fêmeas das diferentes linhagens foram cruzadas com machos da linhagem COL, foram observados ovários disgênicos apenas em descendentes de cruzamentos entre fêmeas MAQ e machos COL (DG: 0,71) e

entre fêmeas I_{27} e machos COL (DG: 8,57). Para machos, apenas os descendentes dos cruzamentos entre fêmeas NHO e machos COL e entre fêmeas RP_2 e machos COL, apresentaram disgenesia testicular, com índices iguais a 0,71 e 1,42, respectivamente.

As análises de χ^2 de heterogeneidade, realizadas para comparar os números de gônadas normais e anormais nos descendentes dos cruzamentos, indicaram diferenças significantes apenas para os números de ovários dos intercruzamentos do tipo II ($\chi^2 = 57,30$, $p < 0,01$).

Ovários rudimentares (Figura 2.2), considerados assim por possuírem redução maior que 25% da massa total, mas não tão extrema como as reduções ilustradas nas fotografias 3 e 4 da Figura 2, foram um segundo tipo de anormalidade ovariana encontrada em descendentes de cruzamentos realizados a 27°C. Os índices de disgenesia gonadal foram recalculados incluindo-se essa classe de ovários entre os disgênicos (Tabela 2). Nos intracruzamentos, o maior índice DG passou a ser aquele encontrado no cruzamento entre fêmeas e machos COL (DG = 7,57) que, pelo critério anterior, não apresentou disgenesia. As linhagens APA e NHO, que também não foram consideradas disgênicas pelo critério anterior, passaram agora a apresentar um pequeno grau de disgenesia. As demais linhagens, que já haviam apresentado um baixo índice DG, tiveram os valores aumentados, não atingindo, entretanto, um grau expressivo de disgenesia.

Nos intercruzamentos da classe I, o maior índice foi encontrado em descendentes do cruzamento entre fêmeas COL e machos I_{27} , que de zero, no cálculo anterior, atingiu o valor de 25,71. Também nos intercruzamentos da classe II, o maior índice manteve-se aquele dos descendentes do cruzamento entre fêmeas I_{27} e machos COL, aumentando de 8,27 para 12,86. Nas duas classes de intercruzamentos, as diferenças entre os descendentes dos oito tipos de cruzamentos quanto aos números de ovários normais e anormais foram significantes ($\chi^2 = 100,33$; $p < 0,01$ e $\chi^2 = 70,60$; $p < 0,01$, respectivamente para os intercruzamentos das classes I e II).

Tabela 1. Ovários e testículos disgênicos e índices de disgenesia gonadal (DG) em descendentes de cruzamentos entre linhagens de *D. sturtevantii*, mantidos a 27°C (n: número de casais, N: gônadas normais, U: gônadas unilateralmente disgênicas, B: gônadas bilateralmente disgênicas; χ^2 para heterogeneidade das linhagens, **: $p < 0,01$).

Cruzamentos				Ovários			Testículos			DG	
n				N	U	B	N	U	B	fêmeas	machos
Intracruzamentos											
fêmea		macho									
COL	vs	COL	70	70	0	0	70	0	0	0	0
APA	vs	APA	70	70	0	0	70	0	0	0	0
MAT	vs	MAT	70	70	0	0	70	0	0	0	0
I ₂₇	vs	I ₂₇	70	70	0	0	68	1	1	0	2,14
BRA	vs	BRA	70	70	0	0	68	2	0	0	1,42
RP ₁	vs	RP ₁	70	68	0	2	68	0	2	2,85	2,85
NHO	vs	NHO	70	70	0	0	70	0	0	0	0
RP ₂	vs	RP ₂	70	70	0	0	70	0	0	0	0
MAQ	vs	MAQ	70	70	0	0	68	2	0	0	1,42
X ²				15,94			21,11				
Intercruzamentos I											
fêmea		macho									
COL	vs	APA	70	70	0	0	69	1	0	0	0,71
COL	vs	MAT	70	70	0	0	69	1	0	0	0,71
COL	vs	I ₂₇	70	70	0	0	70	0	0	0	0
COL	vs	BRA	70	70	0	0	70	0	0	0	0
COL	vs	RP ₁	70	69	0	1	69	1	0	1,42	0,71
COL	vs	NHO	70	69	1	0	70	0	0	0,71	0
COL	vs	RP ₂	70	70	0	0	70	0	0	0	0
COL	vs	MAQ	70	69	1	0	70	0	0	0,71	0
X ²				13,03			5,27				
Intercruzamentos II											
fêmea		macho									
APA	vs	COL	70	70	0	0	70	0	0	0	0
MAT	vs	COL	70	70	0	0	70	0	0	0	0
I ₂₇	vs	COL	70	61	6	3	70	0	0	8,57	0
BRA	vs	COL	70	70	0	0	70	0	0	0	0
RP ₁	vs	COL	70	70	0	0	70	0	0	0	0
NHO	vs	COL	70	70	0	0	69	1	0	0	0,71
RP ₂	vs	COL	70	70	0	0	69	0	1	0	1,42
MAQ	vs	COL	70	69	1	0	70	0	0	0,71	0
X ²				57,30**			14,02				

Tabela 2. Ovários disgênicos e rudimentares e índices de disgenesia gonadal em fêmeas descendentes de cruzamentos entre linhagens de *D. sturtevantii*, mantidos a 27°C (n: número de casais, N: ovários normais, U: ovários unilateralmente disgênicos B: ovários bilateralmente disgênicos, RU: ovários rudimentares, χ^2 para a heterogeneidade das linhagens, **: $p < 0,01$).

Cruzamentos			n	Ovários				DG
				N	U	B	RU	fêmeas
Intracruzamentos								
<i>fêmea</i>		<i>macho</i>						
COL	vs	COL	70	61	0	0	5	7,57
APA	vs	APA	70	70	0	0	0	0
MAT	vs	MAT	70	69	0	0	1	1,42
I ₂₇	vs	I ₂₇	70	68	0	0	2	2,86
BRA	vs	BRA	70	68	0	0	2	2,86
RP ₁	vs	RP ₁	70	68	0	2	0	2,86
NHO	vs	NHO	70	69	0	0	1	1,43
RP ₂	vs	RP ₂	70	70	0	0	0	0
MAQ	vs	MAQ	70	68	0	0	2	2,86
χ^2						31,31		
Intercruzamentos I								
<i>fêmea</i>		<i>macho</i>						
COL	vs	APA	70	70	0	0	0	0
COL	vs	MAT	70	70	0	0	0	0
COL	vs	I ₂₇	70	52	0	0	18	25,71
COL	vs	BRA	70	70	0	0	0	0
COL	vs	RP ₁	70	66	0	1	3	5,71
COL	vs	NHO	70	68	1	0	1	2,14
COL	vs	RP ₂	70	69	0	0	1	1,42
COL	vs	MAQ	70	67	1	0	2	3,57
χ^2						100,33**		
Intercruzamentos II								
<i>fêmea</i>		<i>macho</i>						
APA	vs	COL	70	70	0	0	0	0
MAT	vs	COL	70	70	0	0	0	0
I ₂₇	vs	COL	70	58	6	3	3	12,86
BRA	vs	COL	70	70	0	0	0	0
RP ₁	vs	COL	70	68	0	0	2	2,86
NHO	vs	COL	70	68	0	0	2	2,86
RP ₂	vs	COL	70	70	0	0	0	0
MAQ	vs	COL	70	70	1	0	0	0,71
χ^2						70,60**		

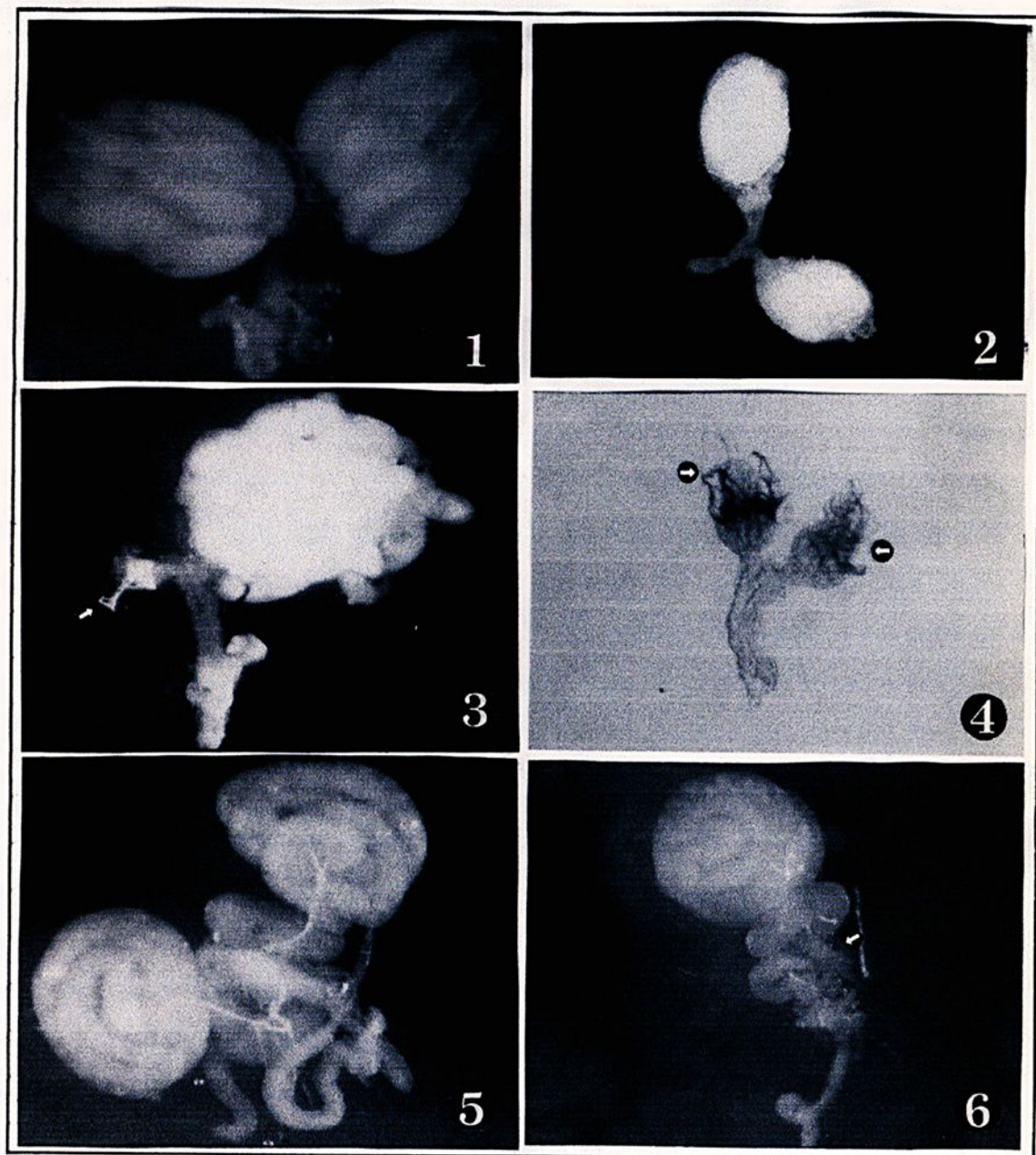


Figura 2. Morfologia das gônadas (1. ovários normais, 2. ovários rudimentares, 3. ovário unilateralmente disgênico, 4. ovários bilateralmente disgênicos, 5. testículos normais, 6. testículo unilateralmente disgênico). Fotografias 1, 3, 5 e 6: aumento de 40 vezes e fotografias 2 e 4: aumento de 63 vezes. As setas indicam anormalidades.

b. Produtividade

A produtividade dos casais (F_1), cujo desenvolvimento embrionário e demais fases do desenvolvimento ocorreram a 27°C, foi amostrada durante sete dias de ovoposição. A produtividade total e as médias e erros padrões da produtividade individual dos casais de cada cruzamento são apresentadas na Tabela 3.

Entre os intracruzamentos, a maior produtividade média de imagos foi encontrada no cruzamento entre fêmeas e machos MAT (33,06). Nos intercruzamentos do tipo I, a maior produtividade média foi encontrada no cruzamento entre fêmeas COL e machos APA (35,99). Nos intercruzamentos do tipo II, o cruzamento entre fêmeas I_{27} e machos COL foi aquele que apresentou a maior produtividade média (35,07).

Foram realizados testes t Student para a comparação dos números médios de fêmeas e de machos, para se verificar possíveis desvios significantes da razão de sexo. Foram encontradas diferenças significantes, no nível de 5%, entre as médias dos descendentes dos intercruzamentos entre fêmeas COL e machos APA e entre fêmeas COL e machos BRA. Entre os descendentes dos intercruzamentos II ocorreram diferenças significantes entre os números médios de machos e fêmeas nos cruzamentos entre fêmeas MAT e machos COL e entre fêmeas I_{27} e machos COL. Em todos os casos a razão de sexo foi desviada para um maior número de fêmeas.

Também foram realizadas análises de varância para avaliar a homogeneidade das médias da produtividade na geração F_1 dos intra e intercruzamentos. Os valores de F mostraram heterogeneidade ($p < 0,01$) da produtividade média de fêmeas, de machos, e do total, nas três classes de cruzamentos.

A partir dos resultados obtidos nas análises de variância, foram determinadas as diferenças honestamente significativas entre as produtividades médias totais através de comparações múltiplas de Tukey. No diagrama abaixo, as médias da produtividade de cada cruzamento são apresentadas em ordem crescente, com os respectivos Ws de Tukey; as médias que não diferem significativamente são unidas por um traço.

Exemplificando, nos intracruzamentos, verifica-se que a produtividade média da linhagem I_{27} não diferiu significativamente da produtividade da linhagem MAQ, sendo então, agrupadas por um traço. As produtividades das demais linhagens (COL, BRA, APA, NHO, RP_1 , RP_2 e MAT) diferiram significativamente daquela de I_{27} . A produtividade média da linhagem MAQ não diferiu daquelas das linhagens COL e BRA,

mas diferiu das produtividades das linhagens APA, NHO, RP_1 , RP_2 e MAT. A produtividade da linhagem BRA não diferiu da de APA, mas diferiu daquelas de NHO, RP_1 , RP_2 e MAT. As produtividades das linhagens APA, NHO, RP_1 , RP_2 e MAT não diferiram significativamente entre si.

Intracruzamentos $W_{0,05} = 8,75$	I_{27} 7,27	MAQ 8,84	COL 12,37	BRA 16,20	APA 23,89	NHO 25,79	RP_1 27,03	RP_2 27,44	MAT 33,06
Intercruzamentos I $W_{0,05} = 6,95$	I_{27} 6,88	MAQ 12,81	RP_1 14,54	RP_2 21,84	NHO 25,83	MAT 29,79	BRA 31,37	APA 35,99	
Intercruzamentos II $W_{0,05} = 8,24$	NHO 15,77	RP_1 16,93	RP_2 18,76	MAQ 22,79	APA 25,96	BRA 28,11	MAT 28,86	I_{27} 35,07	

O diagrama acima mostra que, para os intracruzamentos, a linhagem I_{27} , a menos produtiva, apresenta o maior número de diferenças significativas (7) em relação às demais e a linhagem APA o menor (3). Nos intercruzamentos da classe I, o maior número de diferenças significativas foi encontrado em descendentes das linhagens I_{27} , RP_1 , RP_2 (6) e, o menor, nos das linhagens NHO, MAT, BRA (4). Nos intercruzamentos da classe II, os descendentes das linhagens NHO, RP_1 , I_{27} apresentaram o maior número de diferenças significativas (4) e, o menor, foi encontrado em descendentes da linhagem MAQ (3).

As médias da produtividade dos intracruzamentos foram comparadas com as dos respectivos intercruzamentos. Com os resultados de análise de variância foram determinadas as diferenças honestamente significativas através do teste de comparações múltiplas de Tukey. No diagrama abaixo encontram-se as médias da produtividade dos descendentes de cada cruzamento, em ordem crescente de seus valores, os valores de F de

Fisher, e os valores de W_s de Tukey, bem como a indicação das similaridades entre as médias:

grupo 1 $F_{3,276} = 30,95^{**}$ $W_{0,05} = 6,32$	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fAPA vs m APA$ 23,89	$fAPA vs m COL$ 25,96	$fCOL vs m APA$ 35,99
grupo 2 $F_{3,276} = 17,68^{**}$ $W_{0,05} = 8,01$	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fMAT vs m COL$ 28,86	$fCOL vs m MAT$ 29,79	$fMAT vs m MAT$ 33,06
grupo 3 $F_{3,276} = 58,13^{**}$ $W_{0,05} = 6,36$	$fCOL vs m I_{27}$ 6,88	$fI_{27} vs m I_{27}$ 7,27	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fI_{27} vs m COL$ 35,07
grupo 4 $F_{3,276} = 26,94^{**}$ $W_{0,05} = 6,40$	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fBRA vs m BRA$ 16,20	$fBRA vs m COL$ 28,11	$fCOL vs m BRA$ 31,37
grupo 5 $F_{3,276} = 16,37^{**}$ $W_{0,05} = 5,82$	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fCOL vs m RP_1$ 14,54	$fRP_1 vs m COL$ 16,93	$fRP_1 vs m RP_1$ 27,03
grupo 6 $F_{3,276} = 15,65^{**}$ $W_{0,05} = 6,35$	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fNHO vs m COL$ 15,77	$fNHO vs m NHO$ 25,79	$fCOL vs m NHO$ 25,83
grupo 7** $F_{3,276} = 15,76$ $W_{0,05} = 6,87$	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fRP_2 vs m COL$ 18,76	$fCOL vs m RP_2$ 21,84	$fRP_2 vs m RP_2$ 27,44
grupo 8 $F_{3,276} = 13,67^{**}$ $W_{0,05} = 5,88$	$fMAQ vs m MAQ$ 8,84	$fCOL vs m COL$ 12,37	$fCOL vs m MAQ$ 12,81	$fMAQ vs m COL$ 22,79

No grupo 1, a produtividade média do intracruzamento da linhagem COL foi significativamente inferior, enquanto que a produtividade média dos descendentes do intercruzamento entre fêmeas COL e machos APA foi significativamente superior aos demais. Já, as médias de produtividade dos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas e

machos APA e entre fêmeas APA e machos COL foram intermediárias e não diferiram significativamente entre si.

No grupo 2, a produtividade média do intracruzamento da linhagem COL foi significativamente menor que a do intracruzamento da linhagem MAT e esta não diferiu das produtividades dos descendentes dos intercruzamentos entre as duas linhagens.

No grupo 3, apenas a produtividade média dos descendentes do cruzamento entre fêmeas I₂₇ e machos COL foi significativamente superior àquelas dos demais cruzamentos do grupo.

No grupo 4, a produtividade média dos intracruzamentos da linhagem COL e da linhagem BRA foram significativamente inferiores às produtividades médias dos descendentes dos intercruzamentos entre fêmeas BRA e machos COL, e também entre fêmeas COL e machos BRA.

No grupo 5, apenas produtividade média do intracruzamento da linhagem RP₁ foi significativamente superior às demais produtividades dos cruzamentos do grupo.

No grupo 6, a produtividade média do intracruzamento COL e dos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas NHO e machos COL foram significativamente inferiores às médias de produtividade dos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas e machos NHO e entre fêmeas COL e machos NHO.

Em relação ao grupo 7, as produtividades médias dos intracruzamentos da linhagem COL e dos descendentes do cruzamento entre fêmeas RP₂ e machos COL não diferiram significativamente e foram superiores àquelas do intracruzamento da linhagem RP₂. Os descendentes do cruzamento entre fêmeas COL e machos RP₂ tiveram produtividade intermediária aos dois intracruzamentos.

No grupo 8, apenas a produtividade média dos descendentes do cruzamento entre fêmeas MAQ e machos COL foi significativamente superior às demais produtividades do grupo. As diferenças acima descritas são ilustradas na Figura 3.



Tabela 3. Produtividade total de 70 casais dos intra e inter cruzamentos entre linhagens de *D. sturtevantii*, produtividade individual média e respectivos erros padrões (F para a homogeneidade das médias, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).

Cruzamentos				Médias $\pm$ Erros Padrões			
				Fêmeas	Machos	t	Total
Intracruzamentos							
<i>fêmea</i>	<i>macho</i>						
COL vs COL	438	427	865	6,26 $\pm$ 0,82	6,11 $\pm$ 0,81	0,12	12,37 $\pm$ 1,58
APA vs APA	886	786	1672	12,66 $\pm$ 1,09	11,23 $\pm$ 0,99	0,97	23,89 $\pm$ 2,00
MAT vs MAT	1175	1139	2314	16,79 $\pm$ 1,39	16,27 $\pm$ 1,38	0,79	33,06 $\pm$ 2,67
I ₂₇ vs I ₂₇	259	250	509	3,70 $\pm$ 0,74	3,57 $\pm$ 0,78	0,12	7,27 $\pm$ 1,48
BRA vs BRA	584	550	1134	8,34 $\pm$ 0,99	7,86 $\pm$ 0,90	0,36	16,20 $\pm$ 1,82
RP ₁ vs RP ₁	937	955	1892	13,39 $\pm$ 0,96	13,64 $\pm$ 1,05	0,18	27,03 $\pm$ 1,90
NHO vs NHO	974	831	1805	13,91 $\pm$ 1,17	11,87 $\pm$ 0,99	1,34	25,79 $\pm$ 2,06
RP ₂ vs RP ₂	981	940	1921	14,01 $\pm$ 1,12	13,43 $\pm$ 1,19	0,36	27,44 $\pm$ 2,24
MAQ vs MAQ	316	303	619	4,51 $\pm$ 0,98	4,33 $\pm$ 0,97	0,13	8,84 $\pm$ 1,93
<i>F</i> _{8, 621}				20,63**	19,32**		21,47**
Intercruzamentos							
I							
<i>fêmea</i>	<i>macho</i>						
COL vs APA	1369	1150	2519	19,56 $\pm$ 1,01	16,43 $\pm$ 0,87	2,34*	35,99 $\pm$ 1,66
COL vs MAT	1080	1005	2085	15,43 $\pm$ 1,29	14,36 $\pm$ 1,10	0,63	29,79 $\pm$ 2,30
COL vs I ₂₇	241	241	482	3,44 $\pm$ 0,48	3,44 $\pm$ 0,57	0,0	6,88 $\pm$ 1,00
COL vs BRA	1220	976	2196	17,43 $\pm$ 0,93	13,94 $\pm$ 0,78	2,83*	31,37 $\pm$ 1,58
COL vs RP ₁	522	496	1018	7,46 $\pm$ 0,70	7,09 $\pm$ 0,72	0,71	14,54 $\pm$ 1,32
COL vs NHO	861	947	1808	12,30 $\pm$ 0,90	13,53 $\pm$ 1,03	0,90	25,83 $\pm$ 1,76
COL vs RP ₂	773	756	1529	11,04 $\pm$ 0,96	10,80 $\pm$ 1,01	0,17	21,84 $\pm$ 1,88
COL vs MAQ	464	433	897	6,63 $\pm$ 0,56	6,19 $\pm$ 0,56	0,56	12,81 $\pm$ 1,04
<i>F</i> _{7,552}				39,81**	29,41**		39,61**
Intercruzamentos II							
<i>fêmea</i>	<i>macho</i>						
APA vs COL	998	819	1817	14,26 $\pm$ 0,97	11,70 $\pm$ 0,89	1,93	25,96 $\pm$ 1,70
MAT vs COL	1121	899	2020	16,01 $\pm$ 1,20	12,84 $\pm$ 1,02	2,02*	28,86 $\pm$ 2,13
I ₂₇ vs COL	1372	1083	2455	19,60 $\pm$ 1,50	15,47 $\pm$ 1,20	2,15*	35,07 $\pm$ 2,57
BRA vs COL	1055	913	1968	15,07 $\pm$ 1,15	13,04 $\pm$ 0,98	1,34	28,11 $\pm$ 2,03
RP ₁ vs COL	628	557	1185	8,97 $\pm$ 0,86	7,96 $\pm$ 0,79	0,86	16,93 $\pm$ 1,55
NHO vs COL	621	438	1059	8,87 $\pm$ 0,84	6,90 $\pm$ 0,75	1,74	15,77 $\pm$ 1,54
RP ₂ vs COL	690	623	1313	9,86 $\pm$ 0,95	8,90 $\pm$ 0,93	0,71	18,76 $\pm$ 1,82
MAQ vs COL	807	788	1595	11,53 $\pm$ 0,96	11,26 $\pm$ 0,88	0,21	22,79 $\pm$ 1,79
<i>F</i> _{7,522}				12,82**	9,42**		12,17**

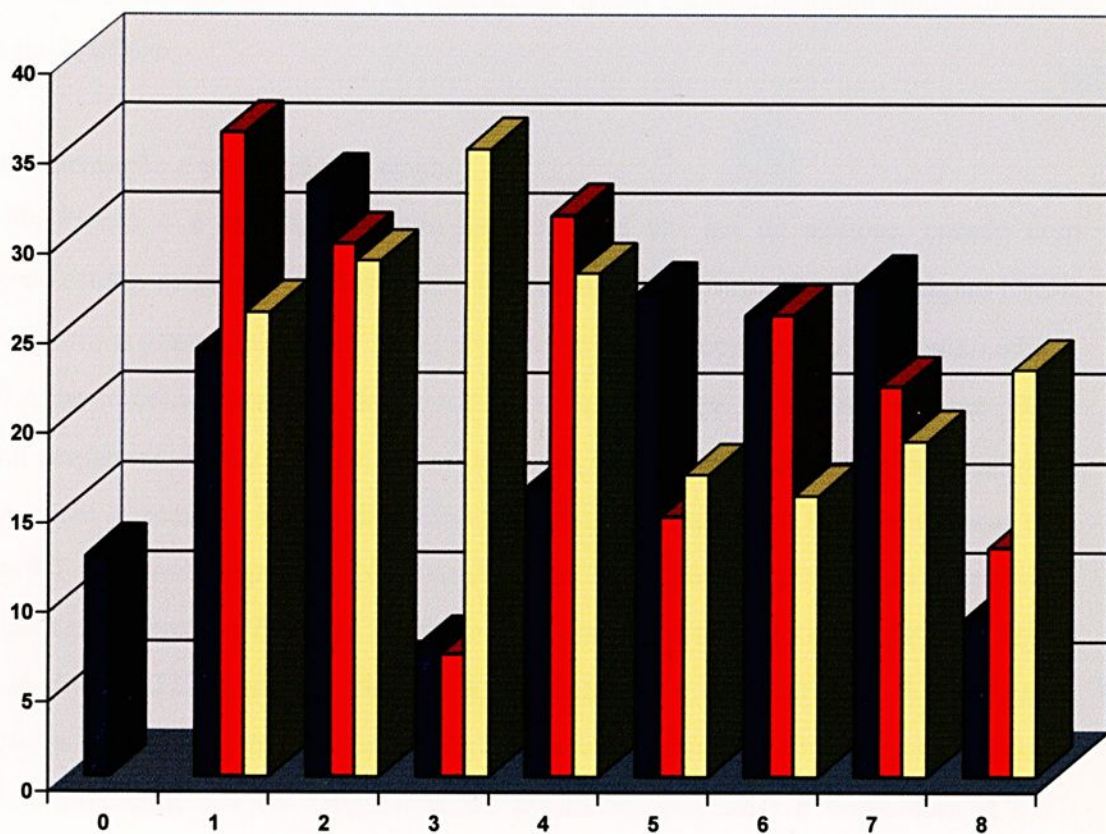


Figura 3. Produtividade média dos intracruzamentos (em azul, 0: f COL vs m COL; 1: f APA vs m APA; 2: f MAT vs m MAT; 3: f I₂₇ vs m I₂₇; 4: f BRA vs m BRA; 5: f RP₁ vs m RP₁; 6: f NHO vs m NHO; 7: f RP₂ vs m RP₂; 8: f MAQ vs m MAQ); dos intercruzamentos do tipo I (em vermelho, 1: f COL vs m APA; 2: f COL vs m MAT; 3: f COL vs m I₂₇; 4: f COL vs m BRA; 5: f COL vs m RP₁; 6: f COL vs m NHO; 7: f COL vs m RP₂; 8: f COL vs m MAQ) e dos intercruzamentos do tipo II (em amarelo, 1: f APA vs m COL; 2: f MAT vs m COL; 3: f I₂₇ vs m COL; 4: f BRA vs m COL; 5: f RP₁ vs m COL; 6: f NHO vs m COL; 7: f RP₂ vs m COL; 8: f MAQ vs m COL).

A ocorrência, o número de cópias e a integridade de seqüências *P* no genoma de *D. sturtevantii* foram analisadas através de três técnicas da Biologia Molecular. A técnica de amplificação de cadeia pela polimerase (PCR) e a técnica de *dot blot* permitiram analisar a ocorrência de seqüências *P* ou pelo menos parte destas seqüências no genoma das linhagens. Já, o número de cópias e a integridade destes elementos foram analisadas pelo método de *Southern*.

2.1 Transformação e produção da sonda

Na Figura 4 é apresentada uma fotografia de um gel de agarose, corado com brometo de etídio, onde está documentado o sucesso da transformação da linhagem DH5 α de *E. coli* com o plasmídeo p π 25.1. Na primeira coluna encontra-se o DNA marcador λ *Hind III* e, na terceira, o produto da digestão do plasmídeo p π 25.1 com a enzima *Xho I*. Como na seqüência *P* não existem sítios de restrição para esta enzima, e no plasmídeo pBR322 existe apenas um sítio, a digestão enzimática produziu uma seqüência linear com cerca de 9,1 Kb, como esperado. Na quarta coluna encontra-se o produto da digestão do plasmídeo com a enzima *Bam HI*. Como existe um único sítio de restrição *Bam HI* na seqüência do pBR322, onde foi inserida a seqüência *P*, e nenhum sítio *Bam HI* nesta seqüência, a digestão do plasmídeo p π 25.1 com esta enzima produziu as duas bandas esperadas: uma com 4,4 Kb (seqüência do plasmídeo pBR322) e outra com 4,7 Kb (seqüência do p π 25.1), comprovando assim o sucesso da transformação. Esta última banda é composta por um fragmento contendo 2,9 Kb, correspondente à seqüência *P* canônica, e cerca de 1,8 Kb de DNA flaqueador proveniente da região 17C do cromossomo X de *D. melanogaster*, de onde o elemento *P* foi originalmente extraído.

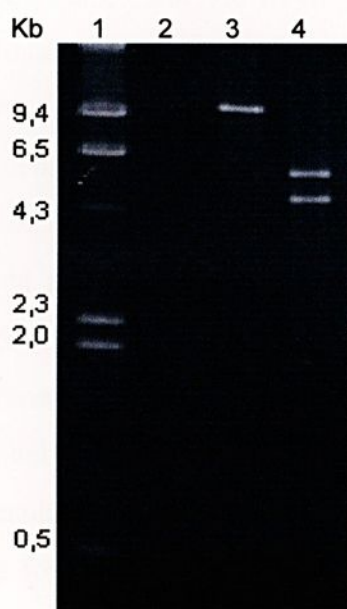


Figura 4. Produto da digestão do plasmídeo p π 25.1, extraído da linhagem DH5 α de *E. coli* transformada, com as enzimas de restrição *Xho* I (coluna 3) e *Bam* HI (coluna 4). Na coluna 1 encontra-se o DNA marcador λ Hind III.

2.2 Identificação de seqüências *P*

Na Figura 5 encontram-se os resultados de dois procedimentos utilizados para verificar a ocorrência de seqüências do elemento *P* no genoma das nove linhagens de *D. sturtevantii*: PCR e análise de *dot blot*. A Figura 5A mostra uma fotografia de gel de agarose, corado com brometo de etídio, contendo fragmentos amplificados do elemento transponível *P*. Na primeira coluna encontra-se do DNA marcador 1Kb (298pb a 12216 pb) e nas demais colunas observam-se bandas de 764 pb, resultante da amplificação de parte da seqüência *P* nas linhagens. As amostras foram aplicadas segundo as datas de coleta das linhagens: COL, BRA, I₂₇, MAQ, RP₁, APA, MAT, NHO, RP₂. Notam-se algumas bandas abaixo da banda principal de 764 pb nas linhagens RP₁ e NHO que indicam deleções nesta região do elemento *P*. O controle positivo, p π 25.1, produz três diferentes bandas, uma decorrente da amplificação da seqüência *P* e outras duas correspondentes às formas super-hélices do plasmídeo.

A Figura 5B mostra o resultado da hibridação por *dot blot* com o plasmídeo p π 25.1. A disposição das amostras foi baseada na localização geográfica aproximada das linhagens, apresentando a seguinte ordem de aplicação: COL, APA, MAT, I₂₇, BRA, RP₁, NHO, RP₂ e MAQ. O último sinal de hibridação refere-se ao controle positivo da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*. Esta análise indicou a eficiência da sonda produzida, bem como confirmou a existência de elementos transponíveis *P* em todas as linhagens.

Figura 5. Ocorrência de elementos *P* no genoma de nove linhagens de *D. sturtevantii*. A) Amplificado de seqüências *P* (colunas 1: DNA marcador 1Kb, 3: COL, 4: BRA, 5: I₂₇, 6: MAQ, 7: RP₁, 8: APA, 9: MAT, 10: NHO, 11: RP₂ e 13: plasmídeo p π 25.1). B) *Dot-Blot* com sonda do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

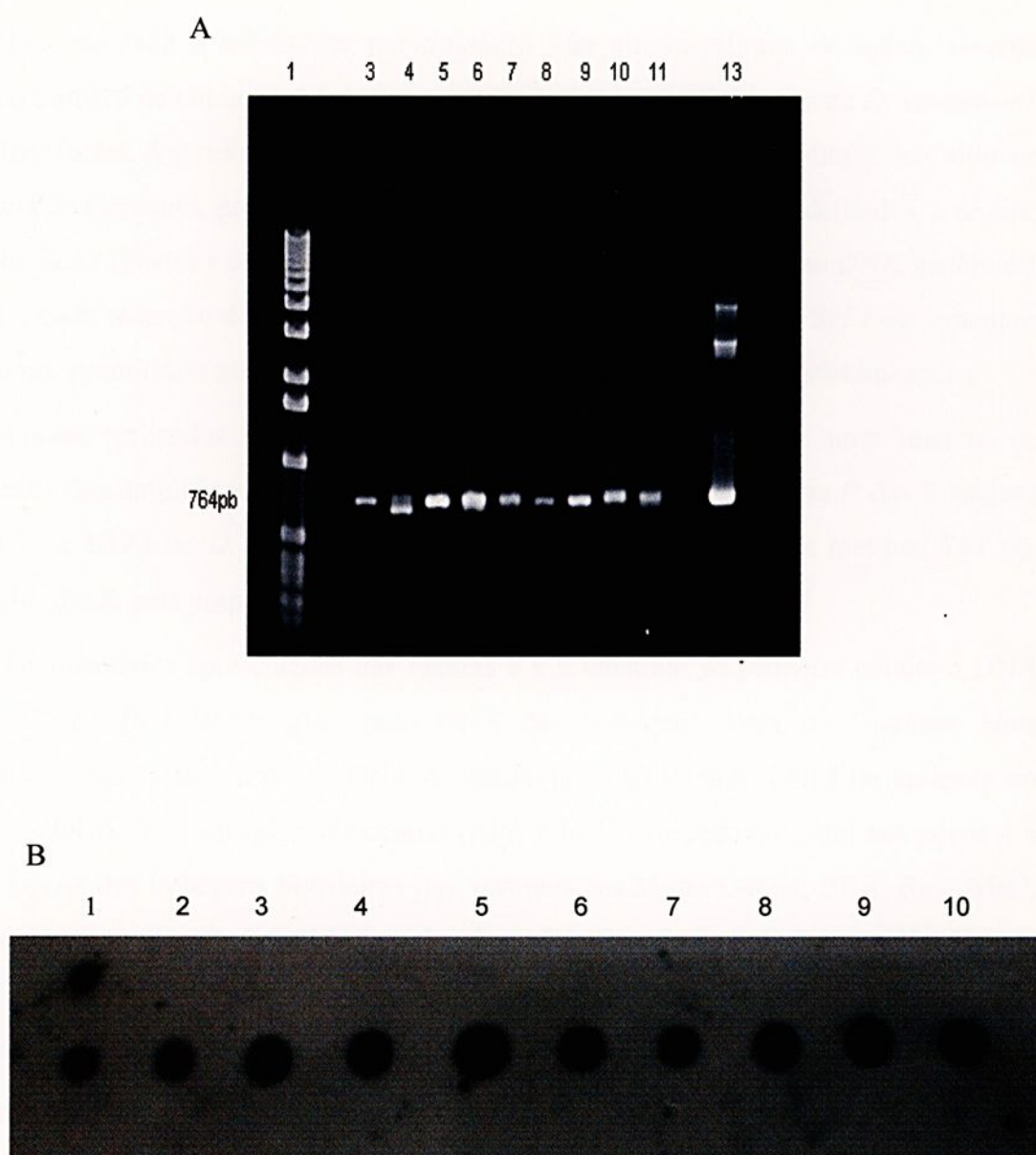


Figura 5. Ocorrência de elementos *P* no genoma de nove linhagens de *D. sturtevantii*. A) Amplificado de seqüências *P* (colunas 1: DNA marcador 1Kb, 3: COL, 4: BRA, 5: I₂₇, 6: MAQ, 7: RP₁, 8: APA, 9: MAT, 10: NHO, 11: RP₂ e 13: plasmídeo p π 25.1). B) *Dot blot* com sonda do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

2.3 Análise do número de cópias do elemento *P*

Foi realizada a hibridação por *Southern blot* em membrana de nylon, visando avaliar o número de cópias do elemento transponível *P* nestas linhagens de *D. sturtevantii*. Os DNAs foram digeridos com a enzima *Sal I*, que por reconhecer um único sítio na sequência do elemento, produz fragmentos de comprimentos variáveis, definidos, à direita, pelo sítio *Sal I* (posição 2410) e, à esquerda, pelo primeiro sítio *Sal I* no DNA genômico. Portanto, cada inserção do elemento *P* no genoma produz fragmentos *Sal I* de tamanhos específicos, permitindo assim avaliar o número de cópias no genoma destas linhagens.

Foram utilizados dois tipos de sondas: uma constituída de uma mistura de fragmentos dos amplificadores de 764 pb da extremidade 5' da sequência *P* das linhagens APA, RP₁ e NHO de *D. sturtevantii*. A outra sonda constituída pelos mesmos 764 pb, porém foi obtida pela amplificação da sequência *P* do plasmídeo π 25.1.

Os resultados apresentados nas Figuras 6 e 9 mostram na primeira coluna o DNA marcador λ *Hind III*, seguido pelo DNA das linhagens. Para os *Southern blots* apresentados nas Figuras 6 e 9, o DNA da linhagem da Colômbia (COL) foi aplicado no poço 3, os DNAs das linhagens mexicanas (APA e MAT, respectivamente) nos poços 4 e 5, e os DNAs das linhagens brasileiras (I₂₇, coletada em Minas Gerais; BRA, RP₁, NHO, RP₂, coletadas em São Paulo; e MAQ, coletada no Rio Grande do Sul) foram aplicados nos poços 6 a 11, respectivamente. No poço 12 foi aplicado o DNA da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*.

a. Hibridação com o amplificado das linhagens

O número de cópias do elemento *P*, utilizando-se como sonda a mistura de fragmentos de 764 pb, foi variável entre as linhagens (Figura 6). Na linhagem colombiana foram observadas 14 cópias; nas mexicanas, 11 cópias para APA e 10 cópias para MAT; nas linhagens brasileiras, 15 cópias para MAQ, 14 cópias para BRA, 11 cópias para I₂₇, NHO, RP₂ e 9 cópias para RP₁. Já, para a linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*, o produto de hibridação forma quase um rastro, devido a grande quantidade de cópias de elementos *P* presentes no genoma desta espécie.

Na Figura 7 está esquematizado o padrão de bandas de cada linhagem. A presença ou ausência de bandas específicas, identificadas e numeradas pela sua posição no *blot*, possibilitou a construção de um dendograma, através de análise multivariada, que agrupou

as nove linhagens de acordo com o grau de similaridade resultante dos padrões de bandas obtidos. Observa-se na Figura 8 que as linhagens provenientes do norte da América do Sul e do México (COL, APA, MAT) formam um aglomerado com mais de 90% de similaridade, separado das linhagens brasileiras (BRA, RP₁, I₂₇, NHO, RP₂), que apresentam similaridade variando entre 61,81% a mais de 90% (NHO e RP₂). A similaridade das linhagens mexicanas e colombiana, com relação às brasileiras foi menor que 42,71%. A exceção neste agrupamento que reflete a proximidade geográfica, foi a linhagem MAQ, que agrupou-se com as linhagens mexicanas e colombiana.

Figura 6. Southern blot do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Sal I*, e hibridação com a sonda de 746 pb do elemento P amplificado das linhagens (colunas 1: DNA λ Hind III; 3: COL, 4: APA, 5: MAT, 6: I₂₇, 7: BRA, 8: RP₁, 9: NHO, 10: RP₂, 11: MAQ e 12: *D. melanogaster* [Harwich-w]).

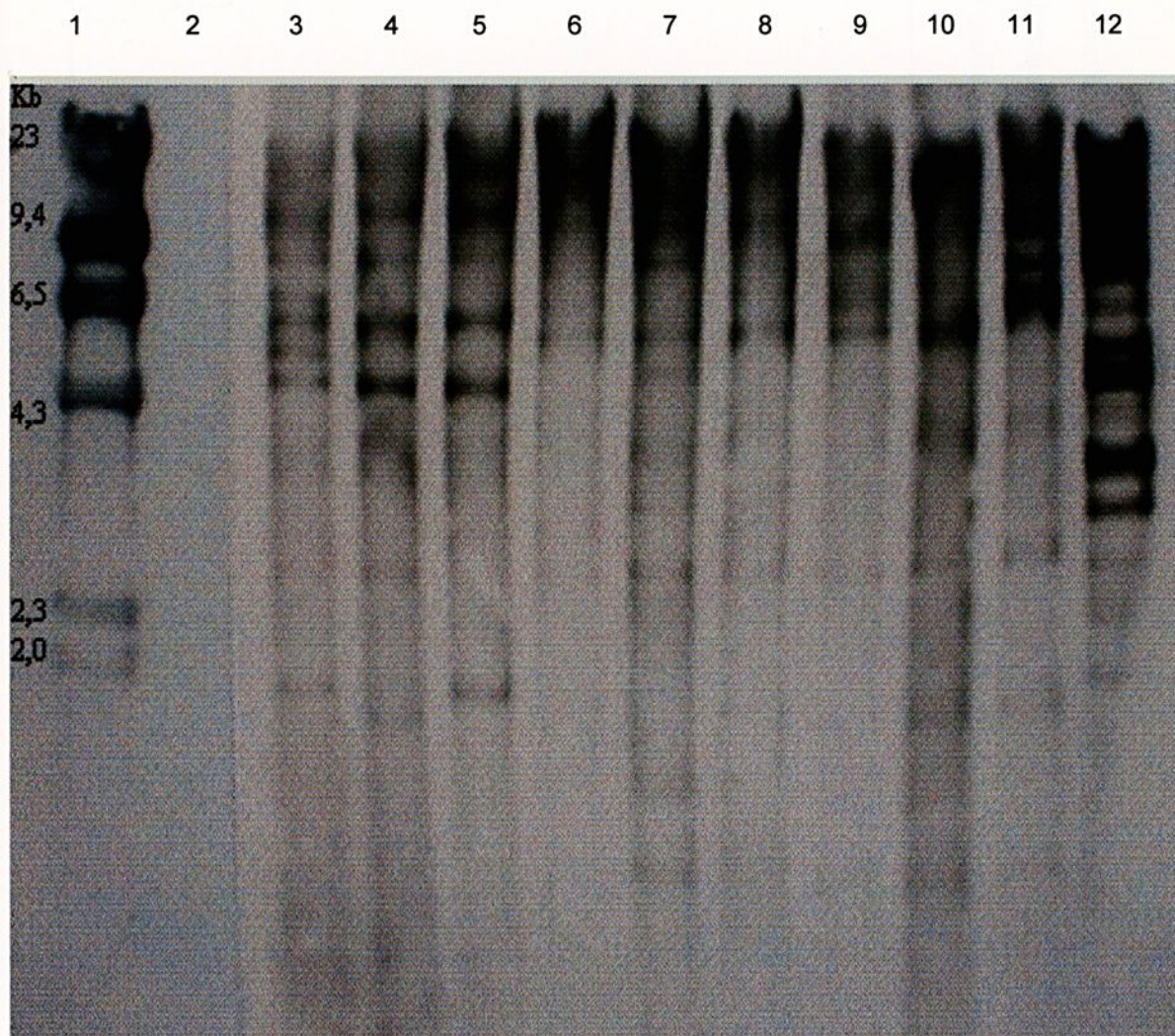


Figura 6. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Sal I*, e hibridado com a sonda de 746 pb do elemento *P* amplificado das linhagens (colunas 1: DNA λ Hind III 3: COL, 4: APA, 5: MAT, 6: I₂₇, 7: BRA, 8: RP₁, 9: NHO, 10: RP₂, 11: MAQ e 12: *D. melanogaster* Harwich-w).

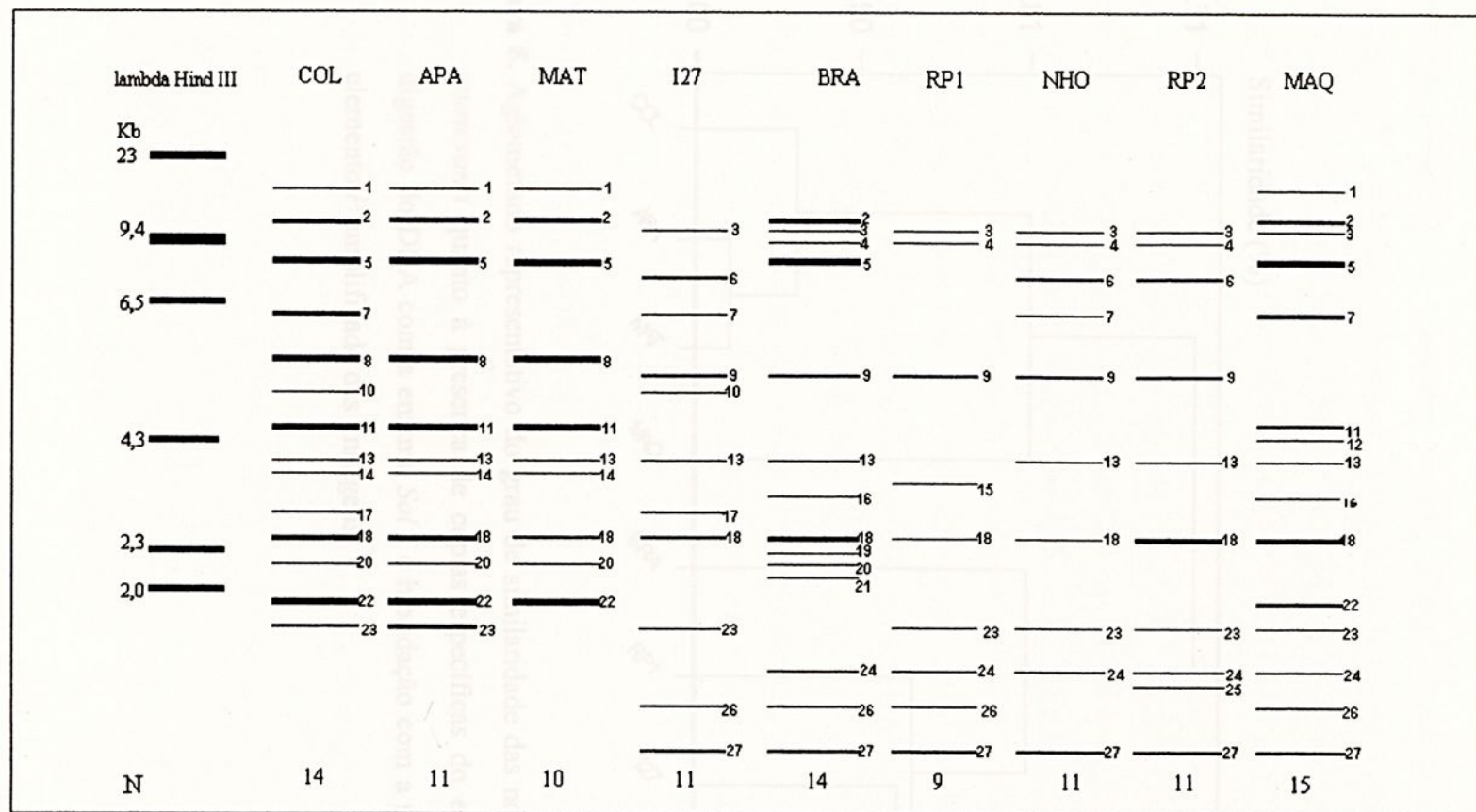


Figura 7. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Sal I* e hibridado com a sonda de 746 pb do elemento *P* amplificado das linhagens (as bandas foram numeradas em ordem crescente a partir do maior fragmento; N: número de bandas).

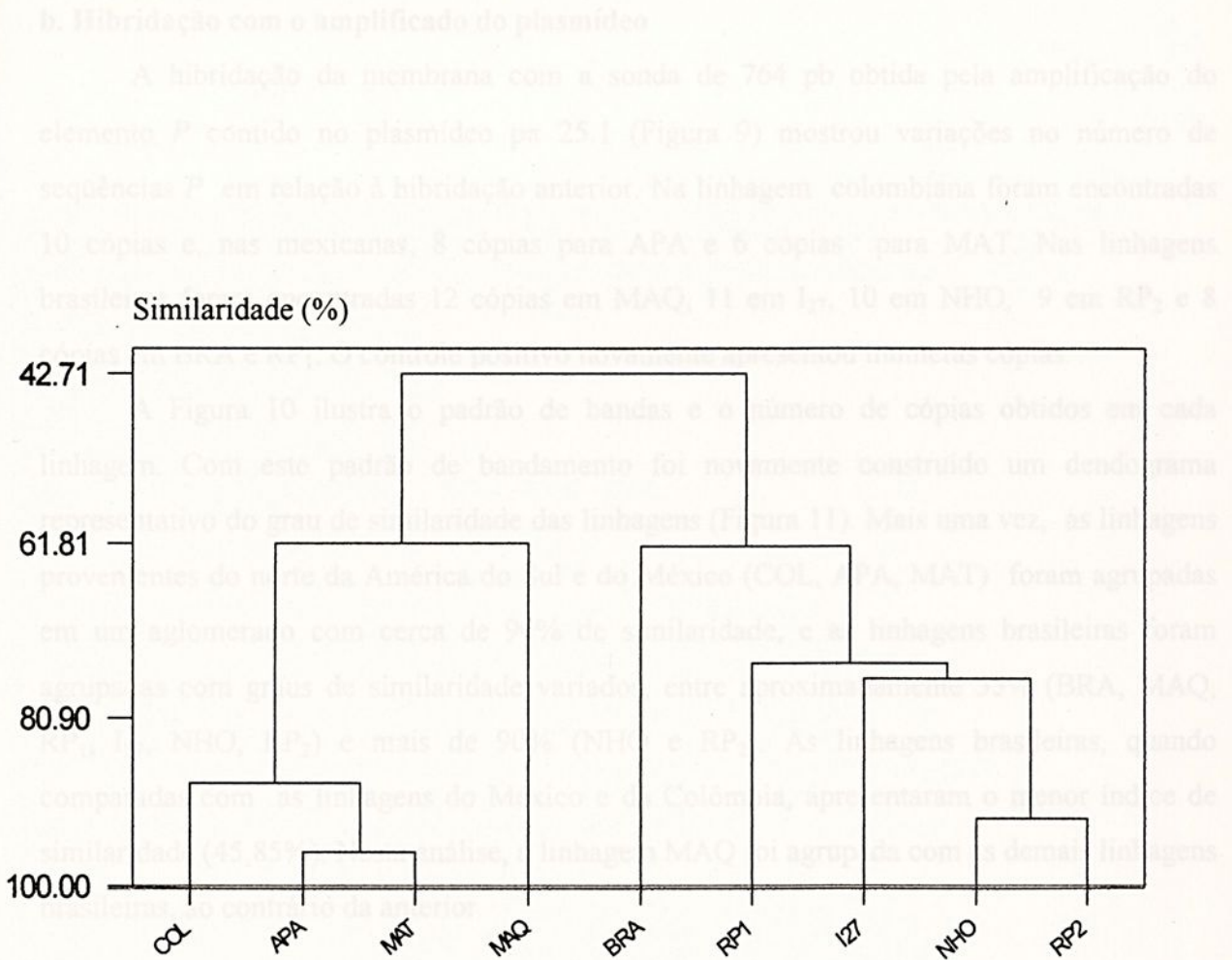


Figura 8. Aglomerado representativo do grau de similaridade das nove linhagens de *D. sturtevantii* quanto à presença de cópias específicas do elemento *P*, após a digestão do DNA com a enzima *Sal I* e hibridação com a sonda de 764 pb do elemento *P* amplificado das linhagens.

b. Hibridação com o amplificado do plasmídeo

A hibridação da membrana com a sonda de 764 pb obtida pela amplificação do elemento *P* contido no plasmídeo π 25.1 (Figura 9) mostrou variações no número de seqüências *P* em relação à hibridação anterior. Na linhagem colombiana foram encontradas 10 cópias e, nas mexicanas, 8 cópias para APA e 6 cópias para MAT. Nas linhagens brasileiras foram encontradas 12 cópias em MAQ, 11 em I₂₇, 10 em NHO, 9 em RP₂ e 8 cópias em BRA e RP₁. O controle positivo novamente apresentou inúmeras cópias.

A Figura 10 ilustra o padrão de bandas e o número de cópias obtidos em cada linhagem. Com este padrão de bandamento foi novamente construído um dendograma representativo do grau de similaridade das linhagens (Figura 11). Mais uma vez, as linhagens provenientes do norte da América do Sul e do México (COL, APA, MAT) foram agrupadas em um aglomerado com cerca de 90% de similaridade, e as linhagens brasileiras foram agrupadas com graus de similaridade variados, entre aproximadamente 55% (BRA, MAQ, RP₁, I₂₇, NHO, RP₂) e mais de 90% (NHO e RP₂). As linhagens brasileiras, quando comparadas com as linhagens do México e da Colômbia, apresentaram o menor índice de similaridade (45,85%). Nesta análise, a linhagem MAQ foi agrupada com as demais linhagens brasileiras, ao contrário da anterior.

c. Números médios de cópias

O número médio ($\bar{X} \pm \text{SE}$) de cópias de elementos *P*, identificados pela sonda do amplificado de 764 pb das linhagens, foi igual a $11,78 \pm 0,68$. Com a sonda do amplificado do plasmídeo π 25.1, o valor médio foi igual a $9,11 \pm 0,61$. As médias foram comparadas através do teste *t* de Student que indicou ser a diferença significativa ($t_{16} = 2,91$; $p < 0,01$).

Figura 9. Southern blot do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Sal* I, e hibridado com a sonda de 766 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo π 25.1 (colunas 1: DNA λ *Hind* III 3; COL, 4: APA, 5: MAT, 6: I₂₇, 7: BRA, 8: RP₁, 9: NHO, 10: RP₂, 11: MAQ e 12: *D. melanogaster* Harwich-w).

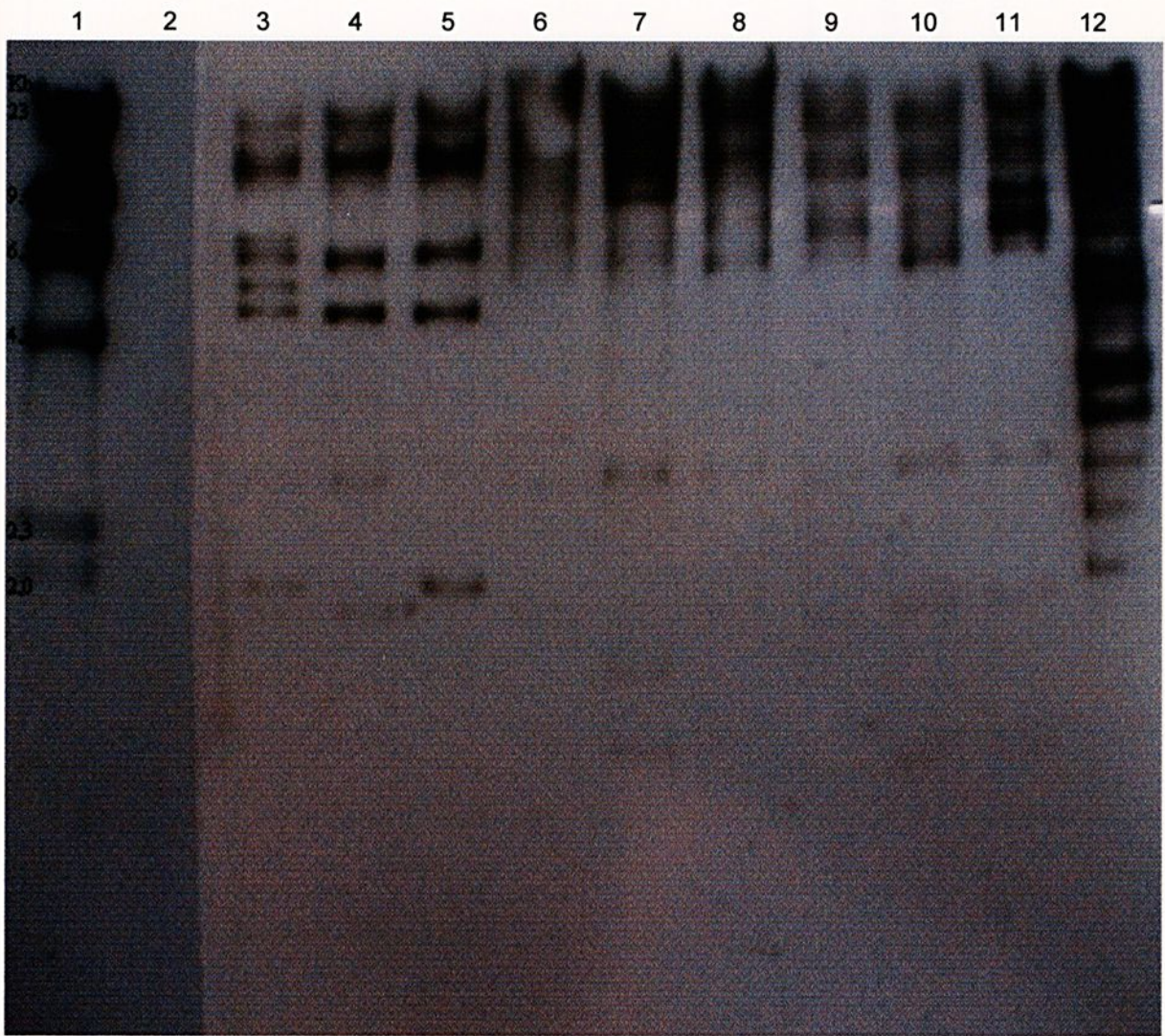


Figura 9. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Sal I*, e hibridado com a sonda de 746 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: DNA λ *Hind III* 3: COL, 4: APA, 5: MAT, 6: I₂₇, 7: BRA, 8: RP₁, 9: NHO, 10: RP₂, 11: MAQ e 12: *D. melanogaster* Harwich-w).

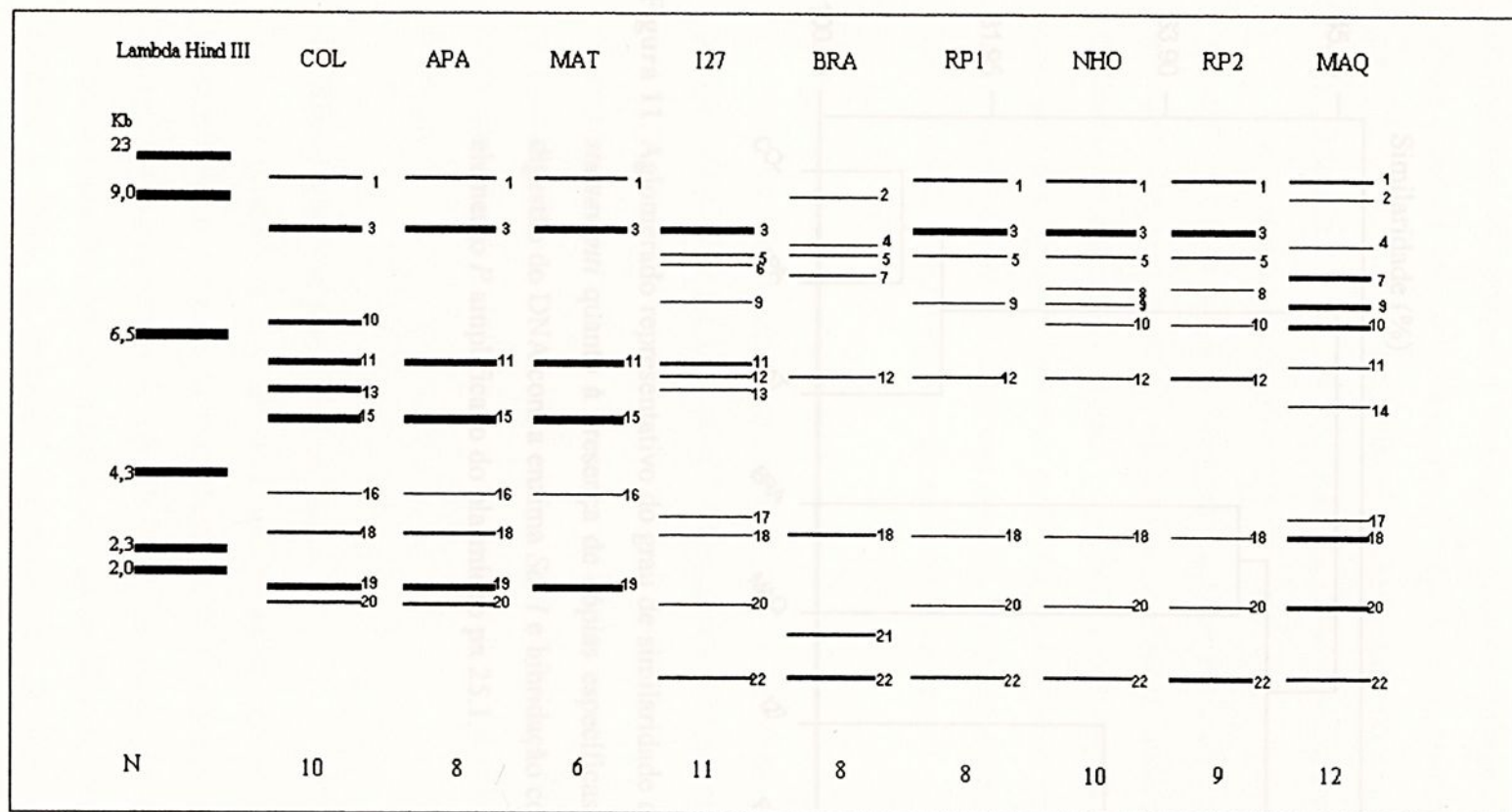


Figura 10. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevanti*, digerido com a enzima *Sal I* e hibridado com sonda de 746 pb da sequência *P* amplificada do plasmídeo p π 25.1 (as bandas foram numeradas em ordem crescente a partir do maior fragmento; N: número de bandas).

2.4 Análise da integridade dos elementos *P*

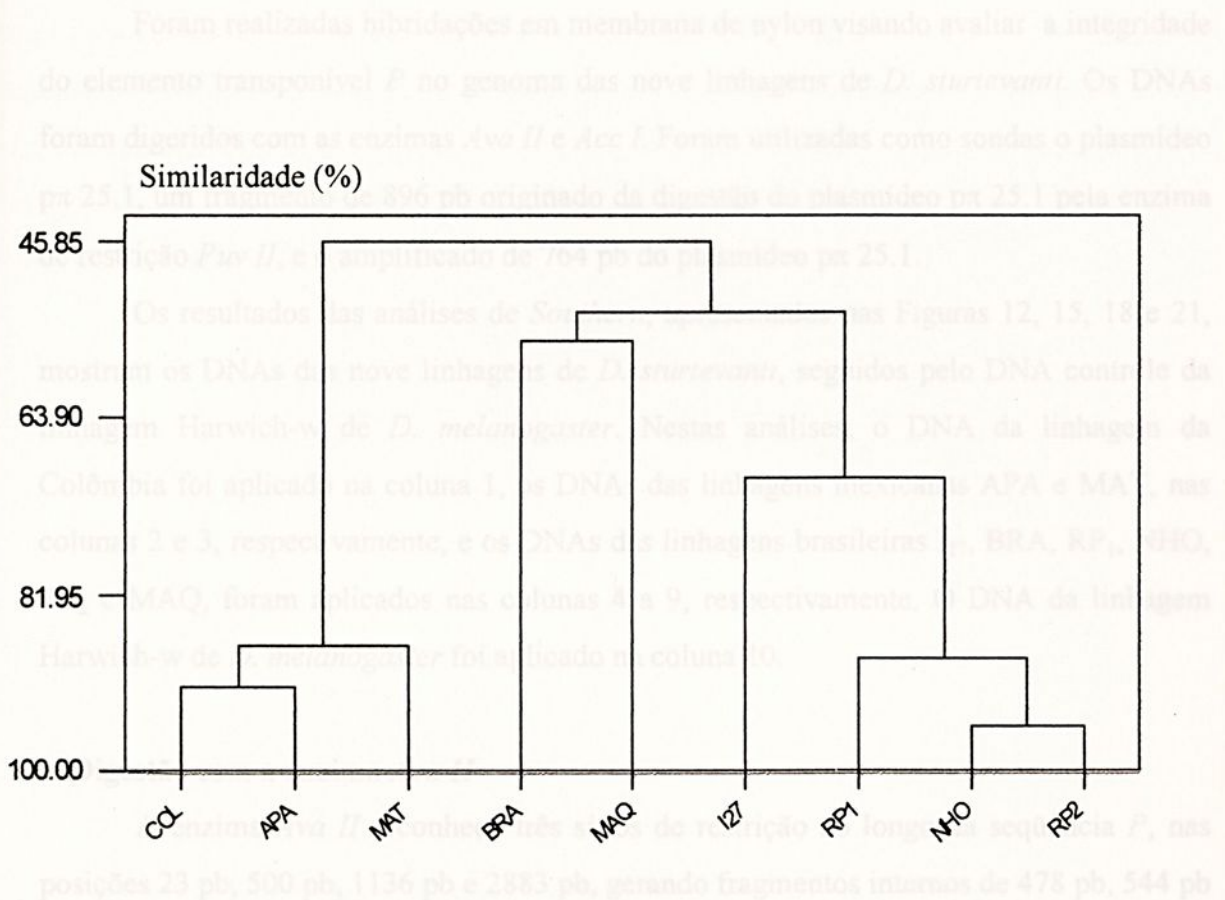


Figura 11. Aglomerado representativo do grau de similaridade das nove linhagens de *D. sturtevantii* quanto à presença de cópias específicas do elemento *P*, após a digestão do DNA com a enzima *Sal I* e hibridação com a sonda de 764 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo π 25.1.

a1. Hibridação com plasmídeo π 25.1

O produto da digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridação com a sonda do plasmídeo π 25.1, mostrou um padrão variável entre as linhagens. Os fragmentos de 1,3 Kb, 0,54 Kb e 0,43 Kb esperados de um elemento *P* canônico digerido com esta enzima são observados na coluna 10 (Figura 12), onde foi aplicado o DNA da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*. Verifica-se que os fragmentos de 1,3 Kb e de 0,54 Kb estão presentes em todas as linhagens de *D. sturtevantii*, entretanto, a banda de 0,43 Kb não foi observada.

2.4 Análise da integridade dos elementos *P*

Foram realizadas hibridações em membrana de nylon visando avaliar a integridade do elemento transponível *P* no genoma das nove linhagens de *D. sturtevantii*. Os DNAs foram digeridos com as enzimas *Ava II* e *Acc I*. Foram utilizadas como sondas o plasmídeo p π 25.1, um fragmento de 896 pb originado da digestão do plasmídeo p π 25.1 pela enzima de restrição *Puv II*, e o amplificado de 764 pb do plasmídeo p π 25.1.

Os resultados das análises de *Southern*, apresentados nas Figuras 12, 15, 18 e 21, mostram os DNAs das nove linhagens de *D. sturtevantii*, seguidos pelo DNA controle da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*. Nestas análises, o DNA da linhagem da Colômbia foi aplicado na coluna 1, os DNAs das linhagens mexicanas APA e MAT, nas colunas 2 e 3, respectivamente, e os DNAs das linhagens brasileiras I₂₇, BRA, RP₁, NHO, RP₂ e MAQ, foram aplicados nas colunas 4 a 9, respectivamente. O DNA da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster* foi aplicado na coluna 10.

a. Digestão com a enzima *Ava II*

A enzima *Ava II* reconhece três sítios de restrição ao longo da sequência *P*, nas posições 23 pb, 500 pb, 1136 pb e 2883 pb, gerando fragmentos internos de 478 pb, 544 pb e 1883 pb. Como estes fragmentos abrangem praticamente toda a extensão do elemento, a ocorrência destes fragmentos intactos é indicativa da existência de elementos *P* completos no genoma. A falta de um desses fragmentos, ou a variação de seus tamanhos, podem ser indicativos de deleções internas ou também de ausência ou mutações dos sítios de restrição.

a1. Hibridação com plasmídeo p π 25.1

O produto da digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridação com a sonda do plasmídeo p π 25.1, mostrou um padrão variável entre as linhagens. Os fragmentos de 1,8 Kb, 0,54 Kb e 0,48 Kb esperados de um elemento *P* canônico digerido com esta enzima são observados na coluna 10 (Figura 12), onde foi aplicado o DNA da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*. Verifica-se que os fragmentos de 1,8 Kb e de 0,54 Kb estão presentes em todas as linhagens de *D. sturtevantii*, entretanto, a banda de 0,48 Kb não foi observada.

A Figura 13 apresenta, de forma esquematizada, os padrões de bandamento observados no *blot*. Com estes padrões foi repetida a análise multivariada, que agrupou mais uma vez as linhagens provenientes do norte da América do Sul e do México em um aglomerado (cerca de 70% de similaridade), e as linhagens brasileiras, com graus de similaridade variando entre 80 % (I₂₇, BRA, RP₁, NHO, RP₂ e MAQ) e mais de 90% (RP₂ e MAQ) em outro. A similaridade das linhagens mexicanas e colombiana, com relação às brasileiras foi de 55,49% (Figura 14).

Figura 12. Southern blot do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridado com a sonda do plasmídeo ps 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

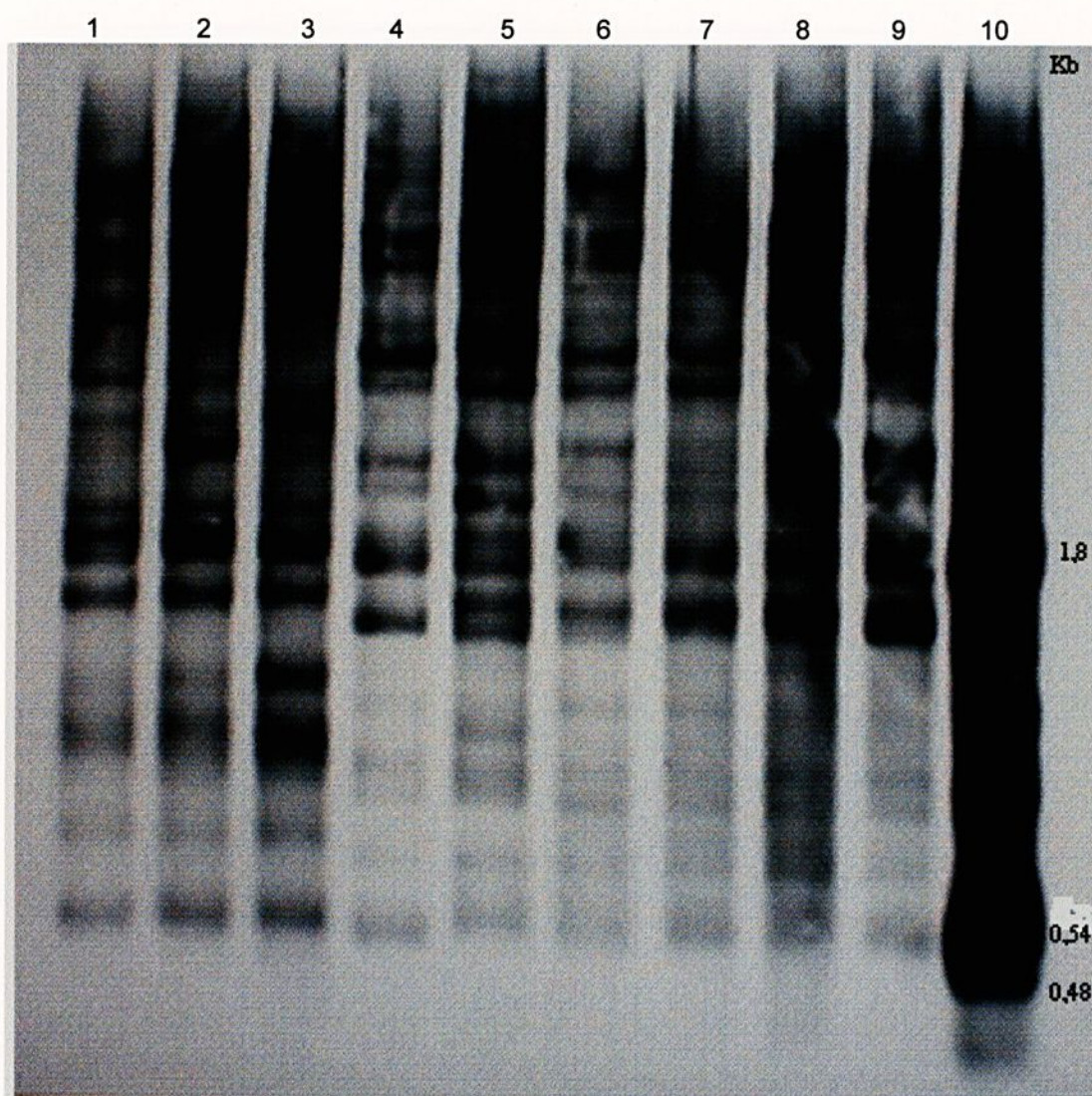


Figura 12. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridado com a sonda do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

9/10/00

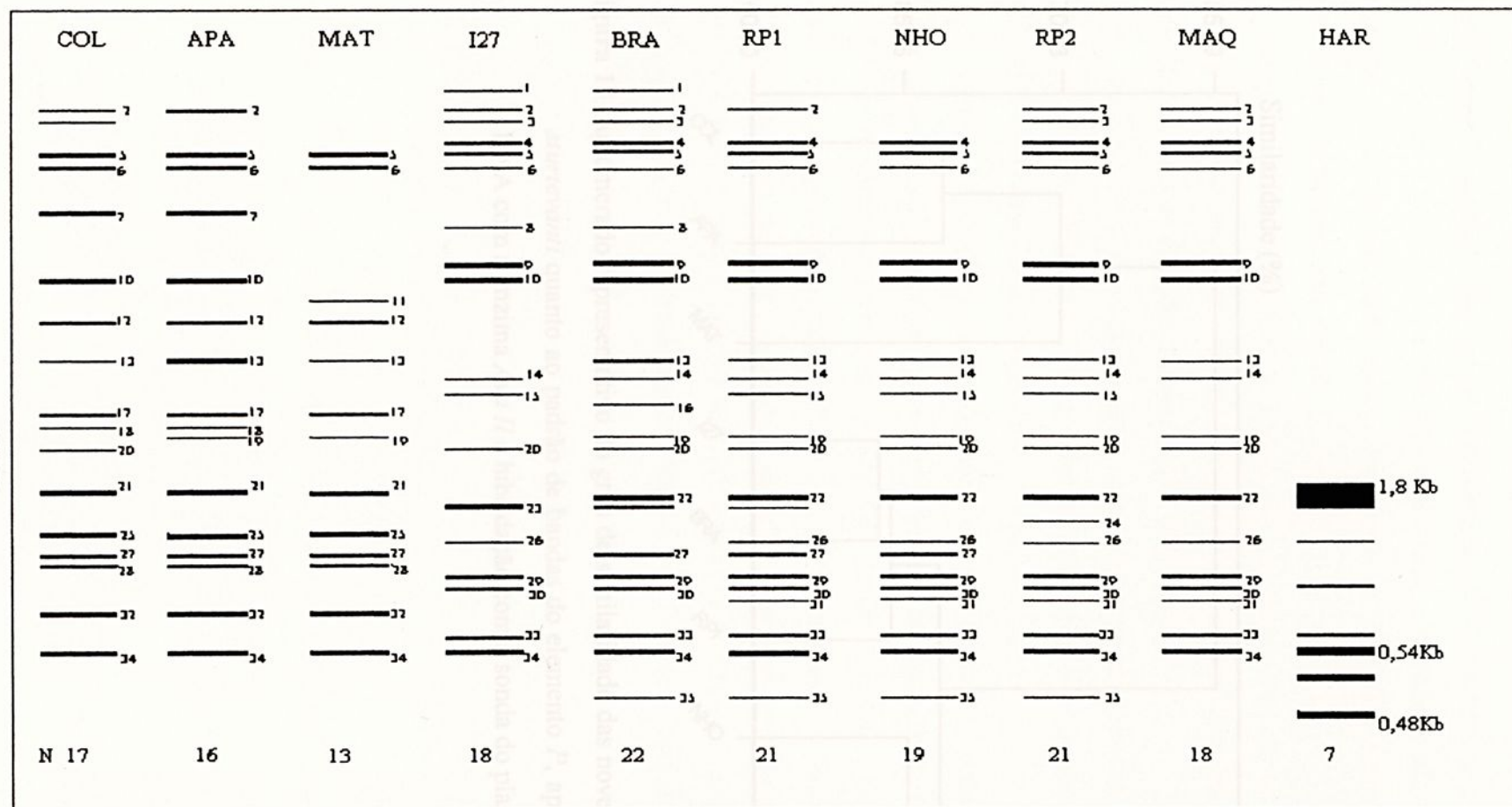


Figura 13. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Ava II* e hibridado com o plasmídeo p π 25.1 (as bandas foram numeradas em ordem crescente a partir do maior fragmento; N: número de bandas; HAR: *D. melanogaster* Harwich-w).

a2. Hibridação com o fragmento *Puv II*

Com o objetivo de averiguar se os fragmentos de 0,48 Kb, ausentes no *Southern blot* anterior, estão contidos nas bandas superiores a 1,8 Kb, ou seja, se o sítio da enzima *Ava II* na posição 23 tem alguma mutação, e por isso, o fragmento não foi detectado, a mesma membrana foi hibridada com o fragmento de 896 pb obtido da digestão do plasmídeo *pr 25.1* pela enzima *Puv II*.

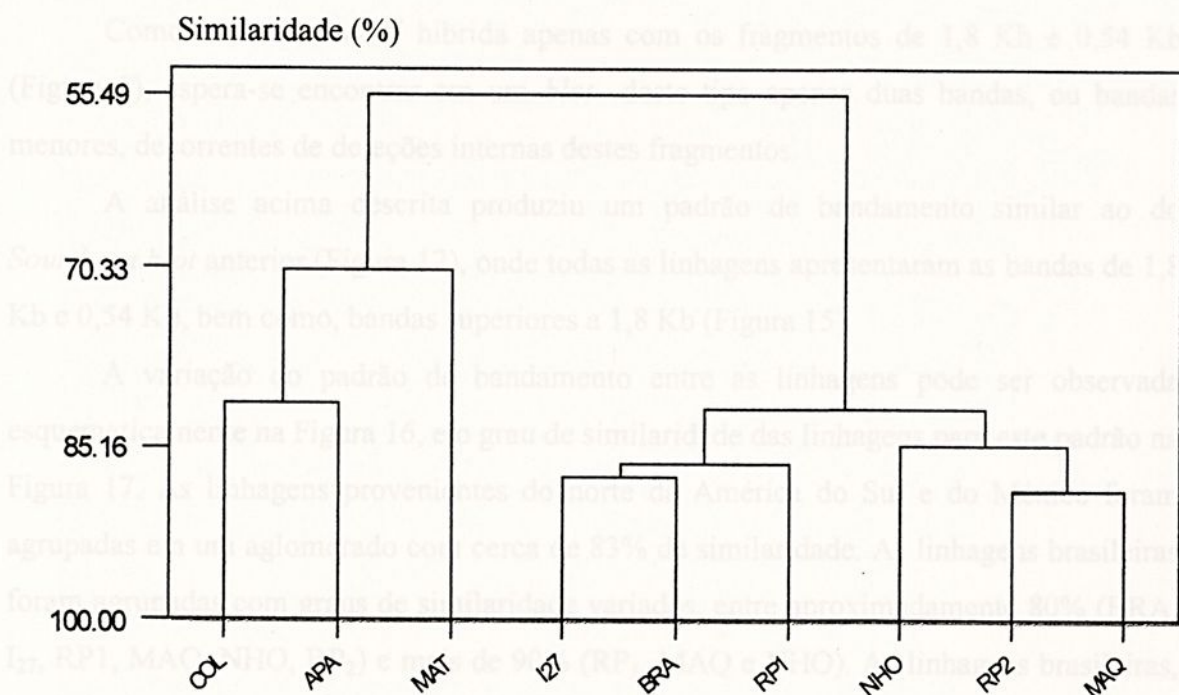


Figura 14. Aglomerado representativo do grau de similaridade das nove linhagens de *D. sturtevantii* quanto ao padrão de bandas do elemento *P*, após a digestão do DNA com a enzima *Ava II* e hibridação com a sonda do plasmídeo *pr 25.1*.

a2. Hibridação com o fragmento *Puv II*

Com o objetivo de averiguar se os fragmentos de 0,48 Kb, ausentes no *Southern blot* anterior, estão contidos nas bandas superiores a 1,8 Kb, ou seja, se o sítio da enzima *Ava II* na posição 23 tem alguma mutação, e por isso, o fragmento não foi detectado, a mesma membrana foi hibridada com o fragmento de 896 pb obtido da digestão do plasmídeo p π 25.1 pela enzima *Puv II*.

Como a sonda *Puv II* hibrida apenas com os fragmentos de 1,8 Kb e 0,54 Kb (Figura 1), espera-se encontrar em um *blot* deste tipo apenas duas bandas, ou bandas menores, decorrentes de deleções internas destes fragmentos.

A análise acima descrita produziu um padrão de bandamento similar ao do *Southern blot* anterior (Figura 12), onde todas as linhagens apresentaram as bandas de 1,8 Kb e 0,54 Kb, bem como, bandas superiores a 1,8 Kb (Figura 15).

A variação do padrão de bandamento entre as linhagens pode ser observada esquematicamente na Figura 16, e o grau de similaridade das linhagens para este padrão na Figura 17. As linhagens provenientes do norte da América do Sul e do México foram agrupadas em um aglomerado com cerca de 83% de similaridade. As linhagens brasileiras foram agrupadas com graus de similaridade variados, entre aproximadamente 80% (BRA, I₂₇, RP₁, MAQ, NHO, RP₂) e mais de 90% (RP₁, MAQ e NHO). As linhagens brasileiras, quando comparadas com as linhagens do México e da Colômbia, apresentaram o menor índice de similaridade (59,03%).

Figura 15. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. melanogaster*, digerido com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridado com a sonda do fragmento *Puv II* do plasmídeo p π 25.1 (todas as linhagens: 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich). →: posição da banda de 0,48 Kb.

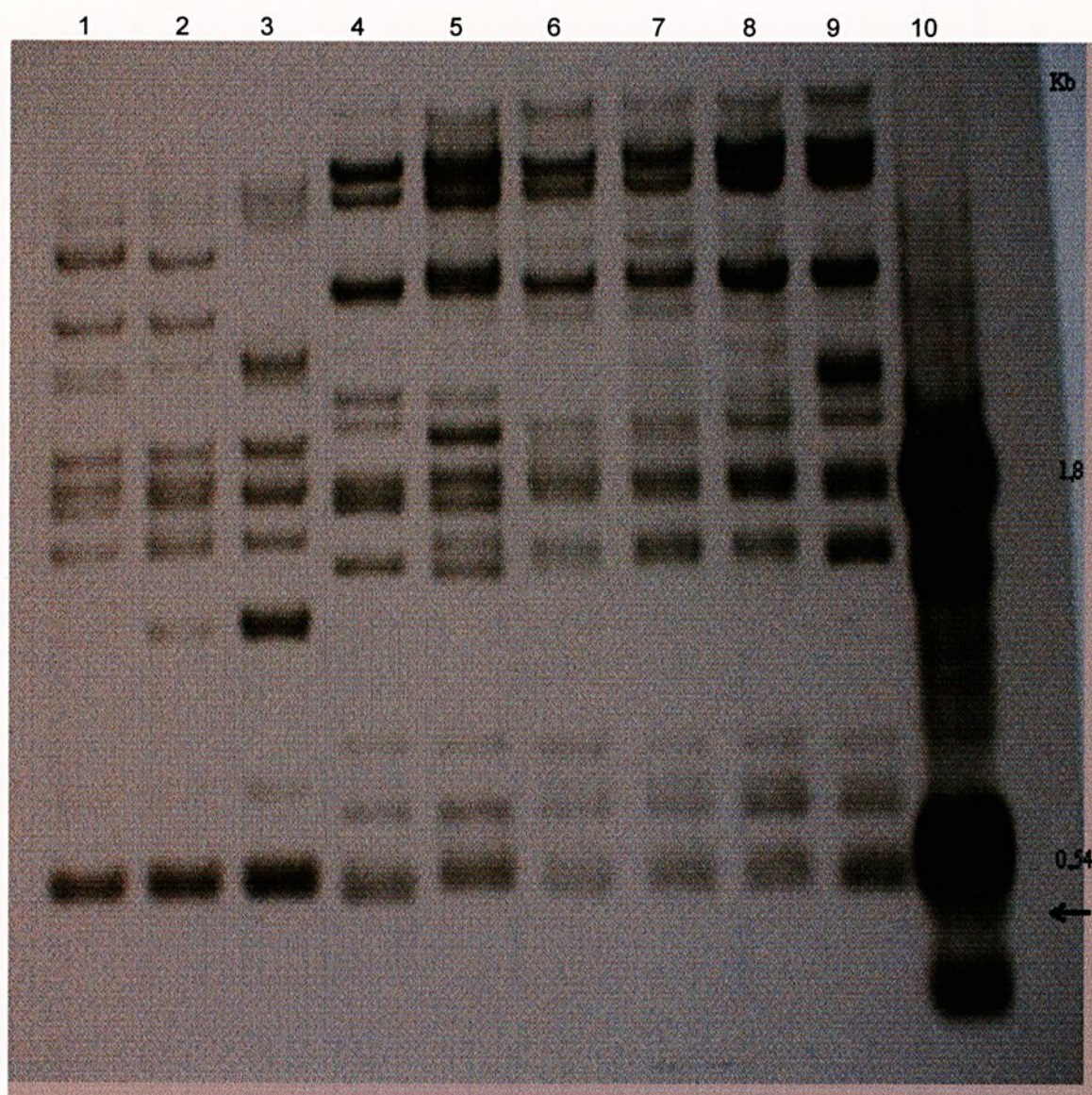


Figura 15. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridado com a sonda do fragmento *PuvII* do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w, →: ausência da banda de 0,48 Kb).

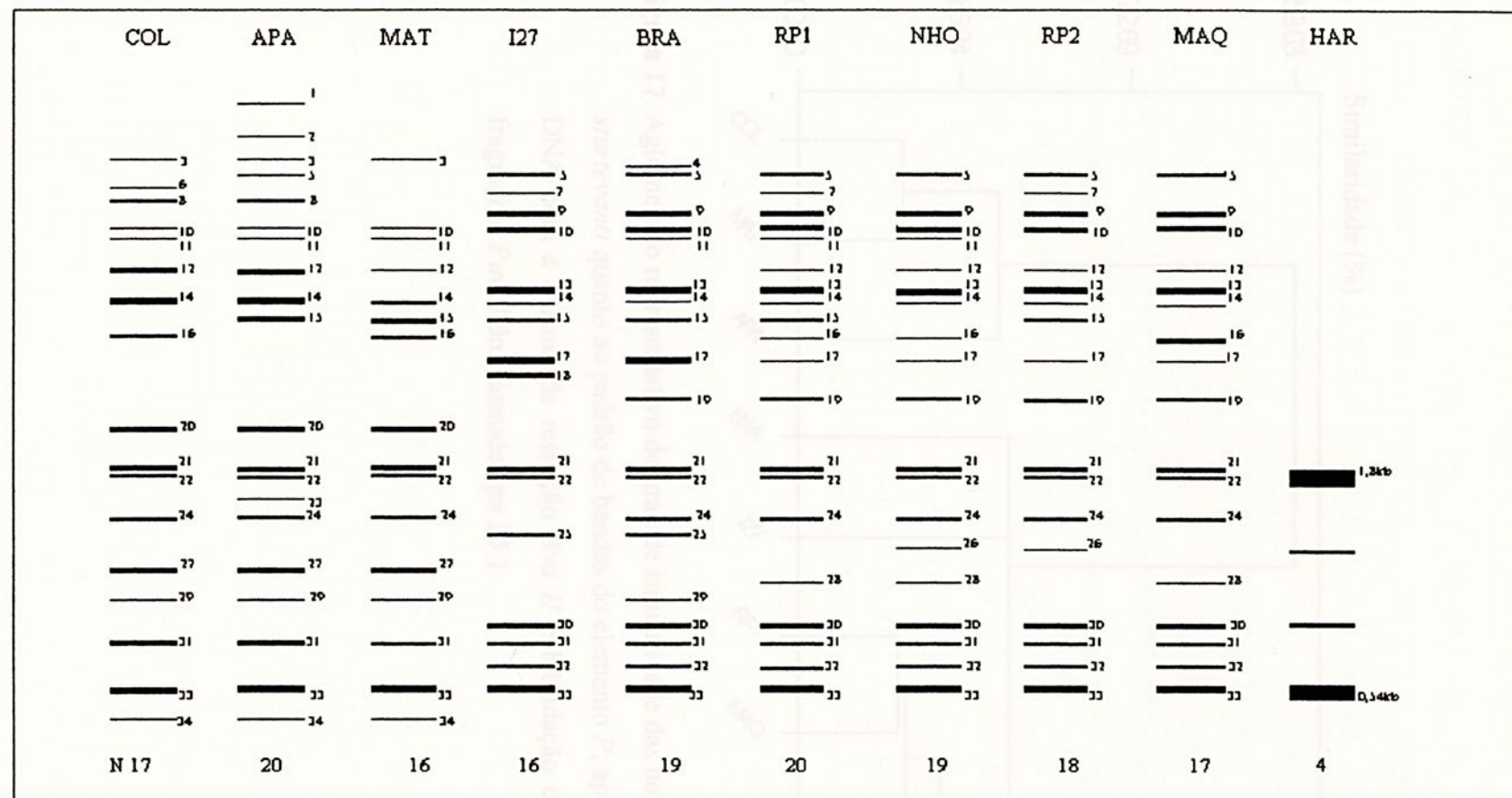


Figura 16. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima *Ava II* e hibridado com o fragmento *Puv II* do plasmídeo π 25.1 (as bandas foram numeradas em ordem crescente a partir do maior fragmento; N: número de bandas, HAR: *Drosophila melanogaster* Harwich-w).

a3. Hibridação com amplificado do plasmídeo p π 25.1

Com o objetivo de averiguar se existem deleções no primeiro e segundo sítio de restrição para a enzima *Ava II*, o que também explicaria a ausência do fragmento de 0,48 Kb e a presença de bandas superiores a 1,8 Kb, a mesma membrana dos experimentos de hibridação foi hibridada com a sonda de 764 pb do elemento *P*.

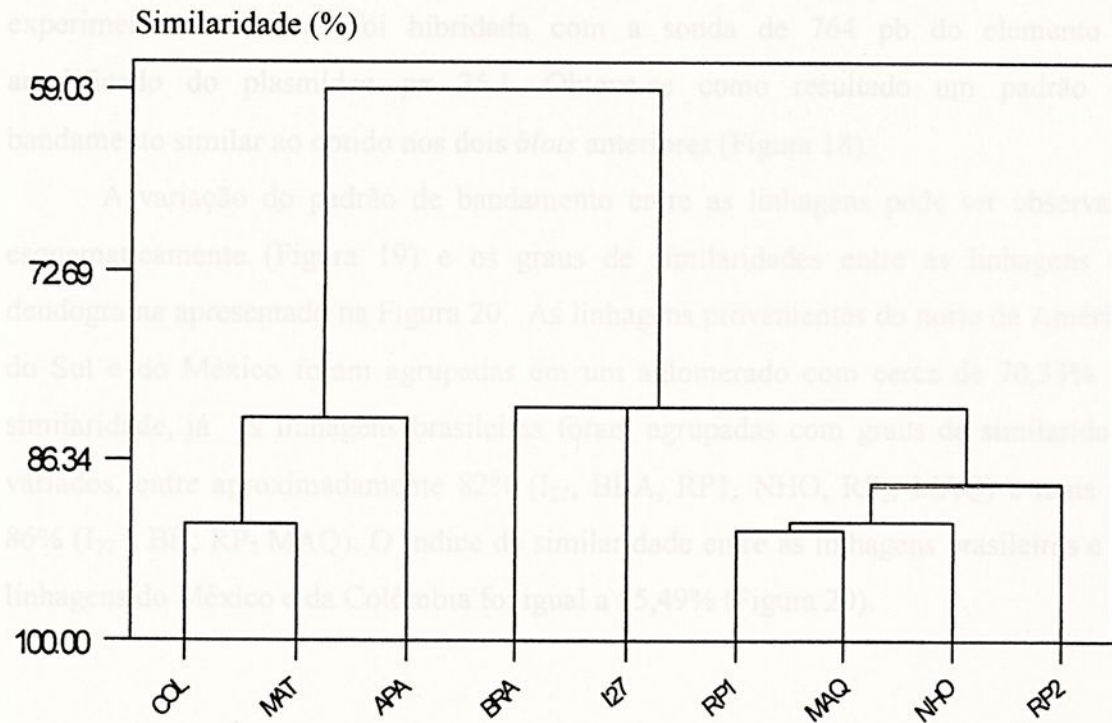


Figura 17. Aglomerado representativo do grau de similaridade das nove linhagens *D. sturtevantii* quanto ao padrão de bandas do elemento *P*, após a digestão do DNA com a enzima de restrição *Ava II* e hibridação com a sonda do fragmento *Puv II* do plasmídeo p π 25.1.

a3. Hibridação com amplificado do plasmídeo p π 25.1

Com o objetivo de averiguar se existem deleções no primeiro e segundo sítio de restrição para a enzima *Ava II*, o que também explicaria a ausência do fragmento de 0,48 Kb e a presença de bandas superiores a 1,8 Kb, a mesma membrana dos experimentos anteriores foi hibridada com a sonda de 764 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo p π 25.1. Obteve-se como resultado um padrão de bandamento similar ao obtido nos dois *blots* anteriores (Figura 18).

A variação do padrão de bandamento entre as linhagens pode ser observada esquematicamente (Figura 19) e os graus de similaridades entre as linhagens no dendograma apresentado na Figura 20. As linhagens provenientes do norte da América do Sul e do México foram agrupadas em um aglomerado com cerca de 70,33% de similaridade, já as linhagens brasileiras foram agrupadas com graus de similaridade variados, entre aproximadamente 82% (I₂₇, BRA, RP1, NHO, RP₂, MAQ) e mais de 86% (I₂₇ e BR; RP₂ MAQ). O índice de similaridade entre as linhagens brasileiras e as linhagens do México e da Colômbia foi igual a 55,49% (Figura 20).

Figura 18. Southern blot do DNA genômico das nove linhagens de *D. striatellus*, digerido com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridado com a sonda de 764 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

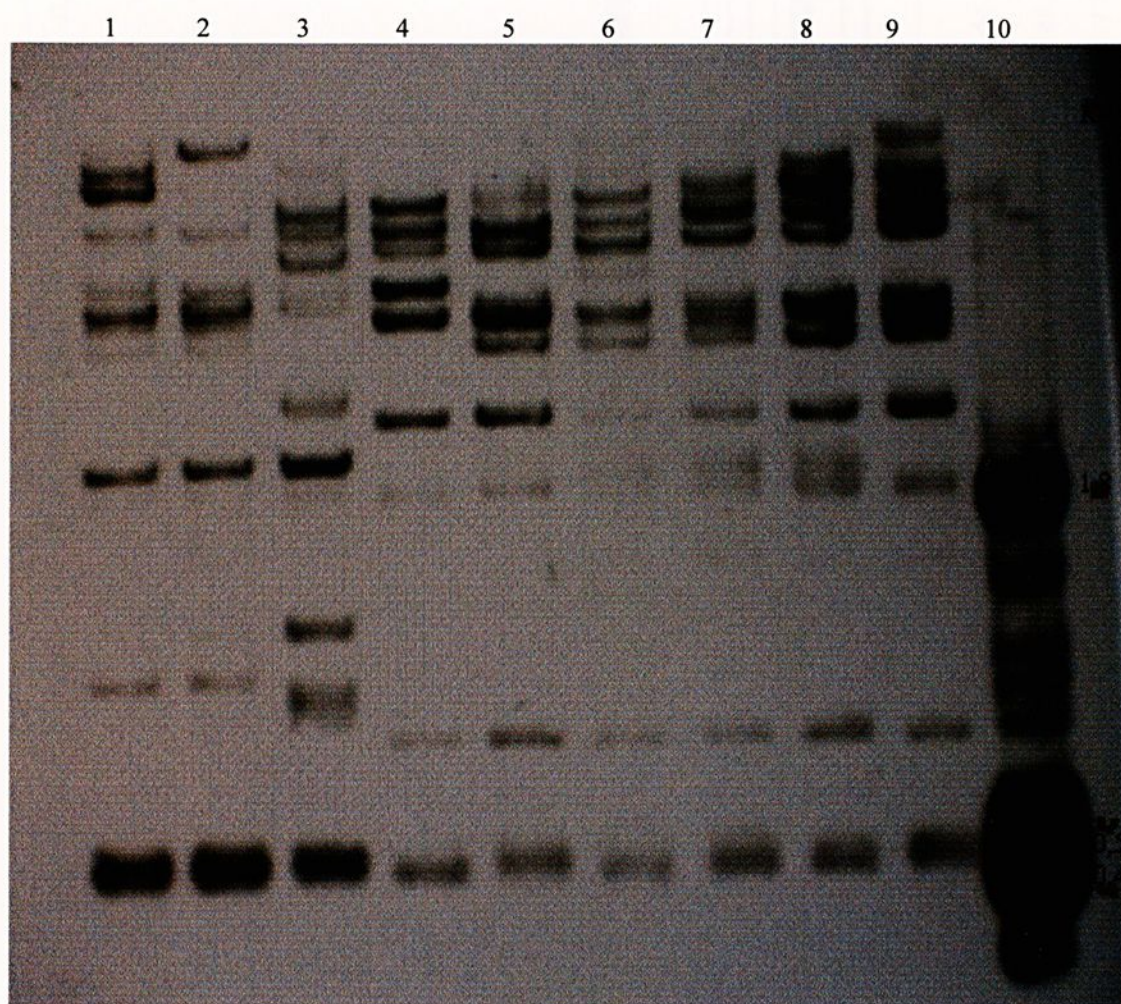


Figura 18. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima de restrição *Ava II*, e hibridado com a sonda de 764 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

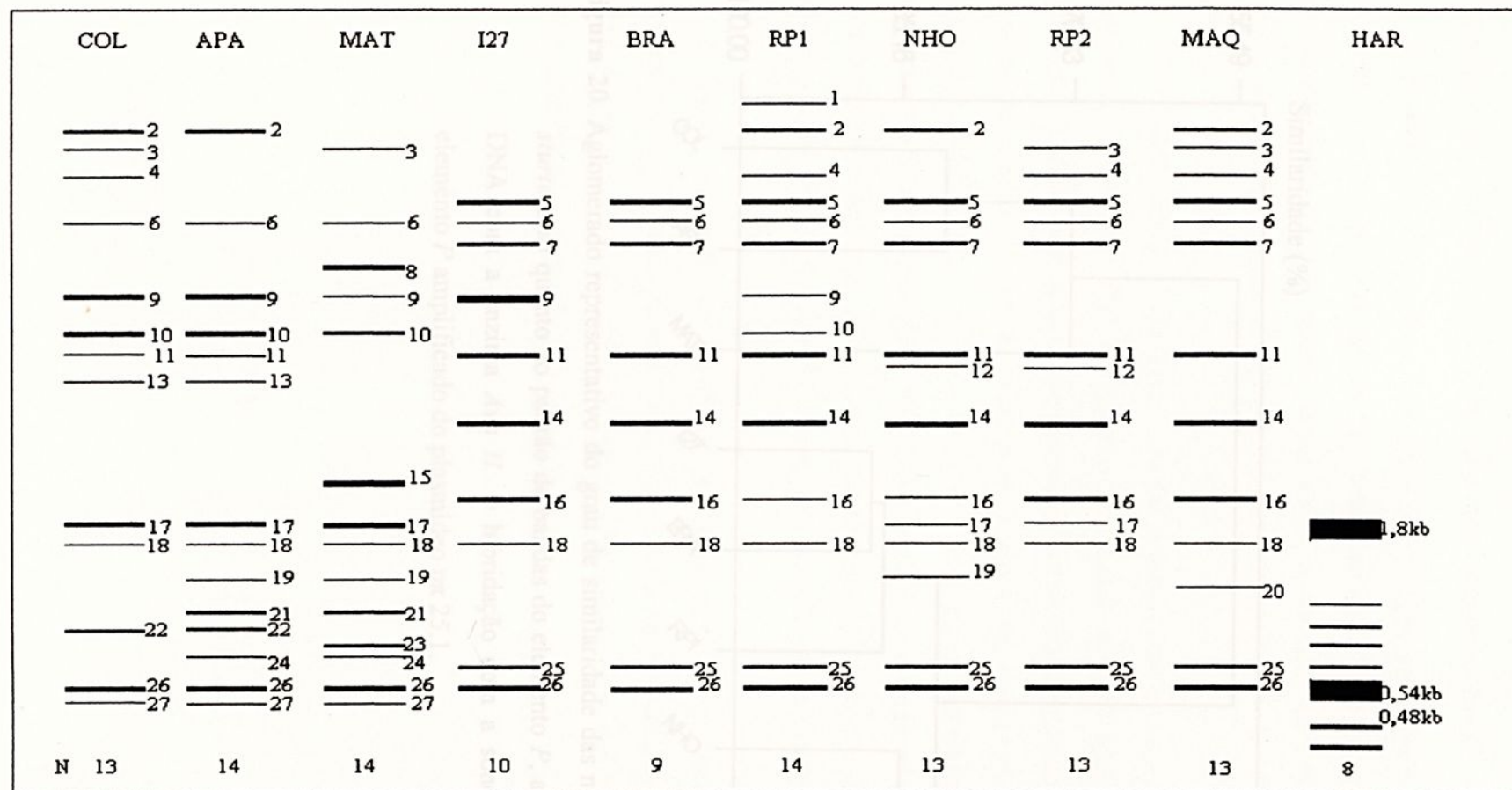


Figura 19. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com *Ava II* e hibridado com 764 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo π 25.1 (as bandas foram numeradas em ordem crescente a partir do maior fragmento; N: número de bandas, HAR: *D. melanogaster* Harwich-w).

b. Digestão com a enzima *Ace I* e hibridação com fragmento *Pur II*

A enzima *Ace I* reconhece dois sítios de restrição ao longo da sequência *P*, nas posições 33 pb e 2412 pb, gerando um fragmento interno de 2339 pb, que abrange 81% da sequência *P* completa. Sendo assim, a obtenção de bandas com tamanhos

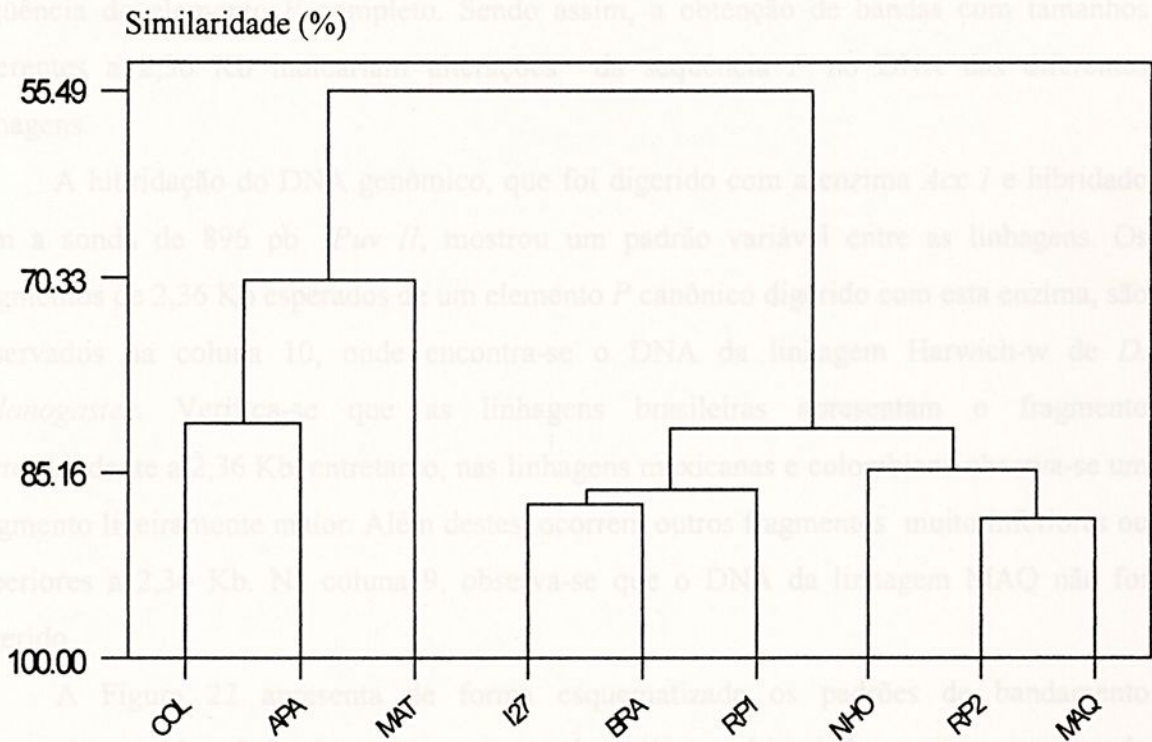


Figura 20. Aglomerado representativo do grau de similaridade das nove linhagens *D. sturtevanti* quanto ao padrão de bandas do elemento *P*, após a digestão do DNA com a enzima *Ava II* e hibridação com a sonda de 764 pb do elemento *P* amplificado do plasmídeo $\pi\pi$ 25.1.

b. Digestão com a enzima *Acc I* e hibridação com fragmento *Puv II*

A enzima *Acc I* reconhece dois sítios de restrição ao longo da sequência *P*, nas posições 53 pb e 2412 pb, gerando um fragmento interno de 2359 pb, que abrange 81% da sequência do elemento *P* completo. Sendo assim, a obtenção de bandas com tamanhos diferentes a 2,36 Kb indicariam alterações da sequência *P* no DNA das diferentes linhagens.

A hibridação do DNA genômico, que foi digerido com a enzima *Acc I* e hibridado com a sonda de 896 pb *Puv II*, mostrou um padrão variável entre as linhagens. Os fragmentos de 2,36 Kb esperados de um elemento *P* canônico digerido com esta enzima, são observados na coluna 10, onde encontra-se o DNA da linhagem Harwich-w de *D. melanogaster*. Verifica-se que as linhagens brasileiras apresentam o fragmento correspondente a 2,36 Kb, entretanto, nas linhagens mexicanas e colombiana observa-se um fragmento ligeiramente maior. Além destes, ocorrem outros fragmentos muito inferiores ou superiores a 2,36 Kb. Na coluna 9, observa-se que o DNA da linhagem MAQ não foi digerido.

A Figura 22 apresenta de forma esquematizada os padrões de bandamento observados no *blot*. O dendograma resultante de análise multivariada continuou agrupando as linhagens provenientes do norte da América do Sul e do México em um aglomerado e as linhagens brasileiras em outro (Figura 23).

Figura 22. Southern blot do DNA genômico das nove linhagens de *D. melanogaster*, digeridos com a enzima de restrição *Acc I*, e hibridado com a sonda do fragmento *Puv II* do plasmídeo ps 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: L₂₇, 5: BRA, 6: RP₂, 7: NHO, 8: RP₁, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

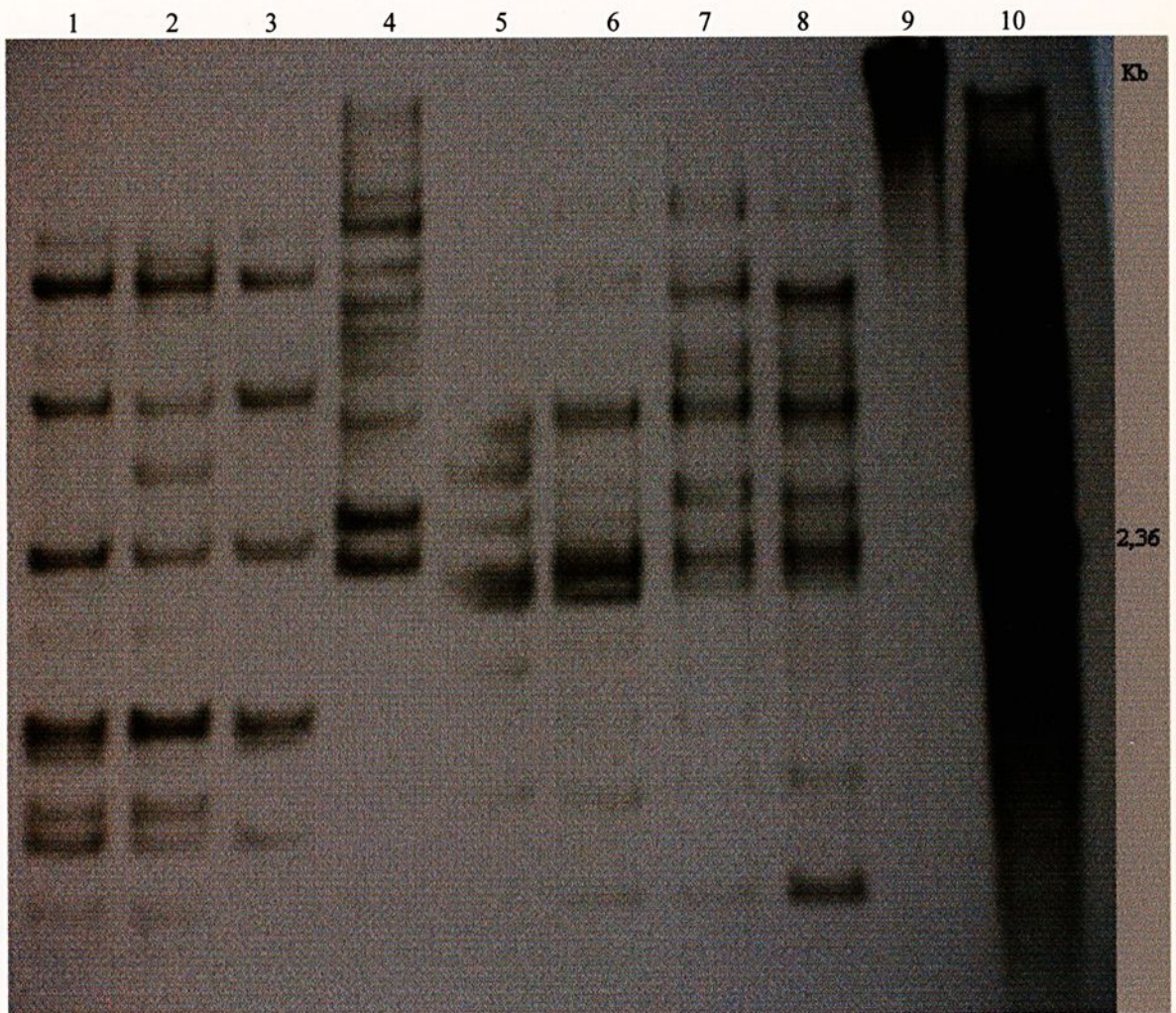


Figura 21. *Southern blot* do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digeridos com a enzima de restrição *Acc I*, e hibridado com a sonda do fragmento *Puv II* do plasmídeo p π 25.1 (colunas 1: COL, 2: APA, 3: MAT, 4: I₂₇, 5: BRA, 6: RP₁, 7: NHO, 8: RP₂, 9: MAQ e 10: *D. melanogaster* Harwich-w).

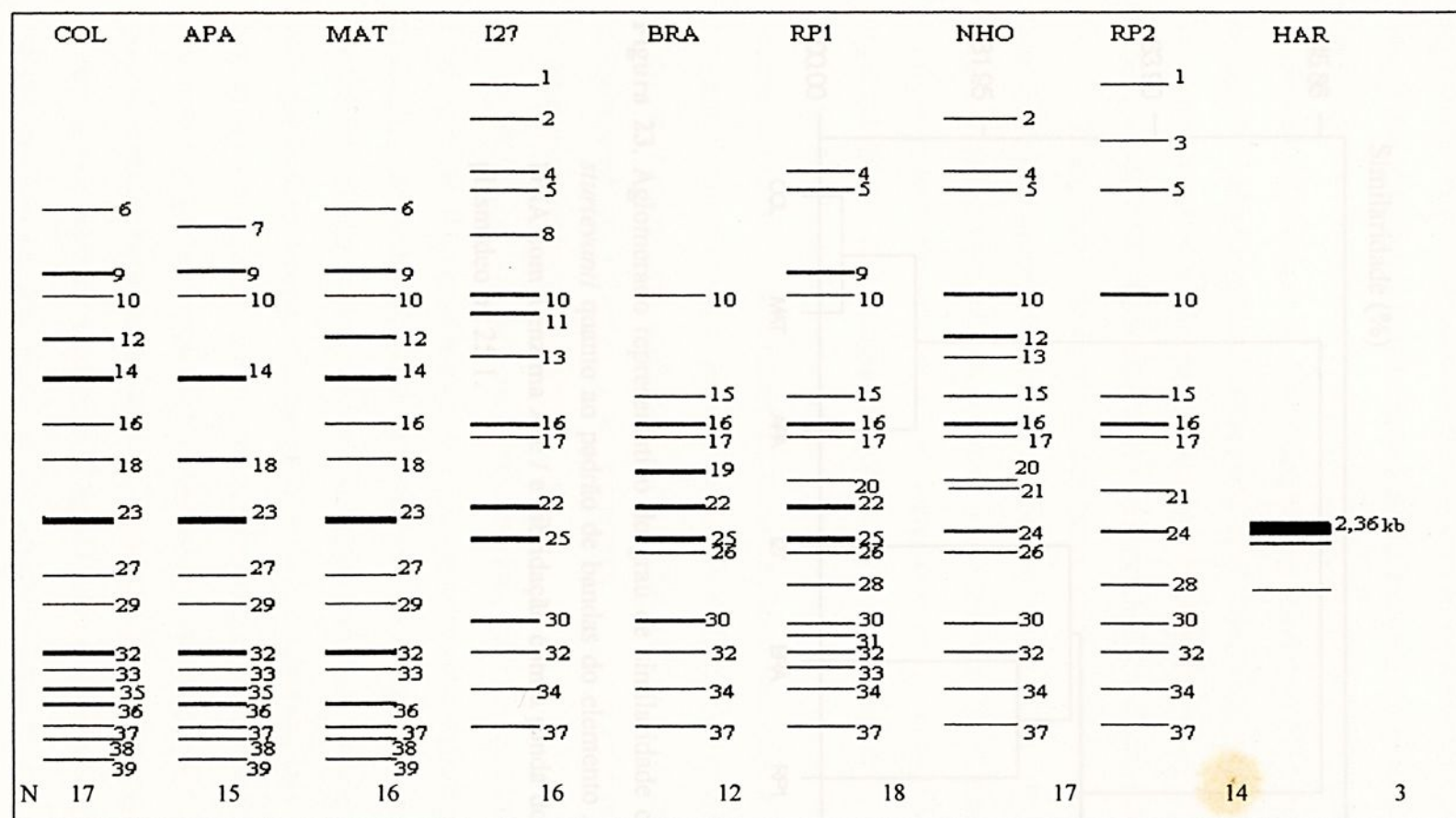


Figura 22. Representação esquemática do padrão de bandamento resultante do DNA genômico das nove linhagens de *D. sturtevantii*, digerido com a enzima *Acc I* e hibridado com fragmento *Puv II* do plasmídeo p π 25.1 (as bandas foram numeradas em ordem crescente a partir do maior fragmento; N: número de bandas; HAR: *D. melanogaster* Harwich-w).

V. DISCUSSÃO

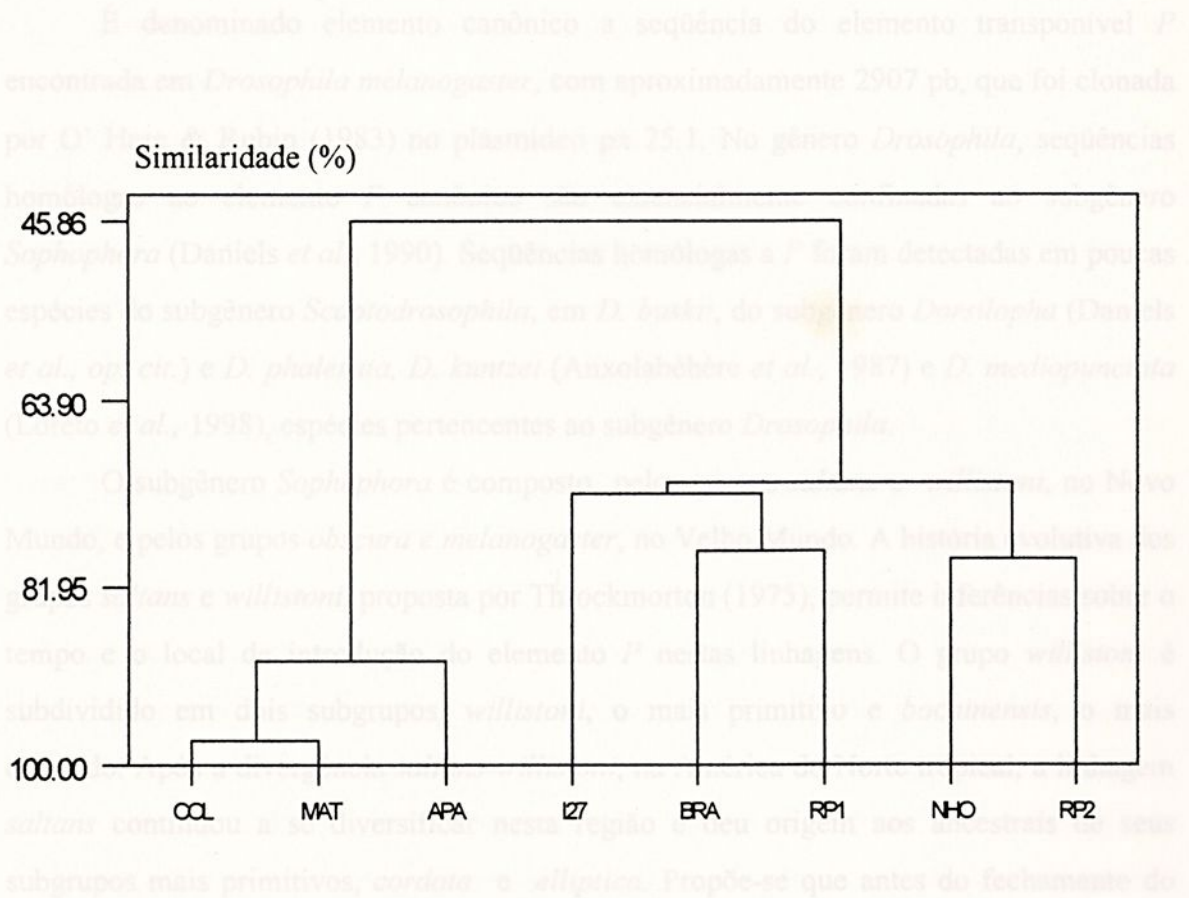


Figura 23. Aglomerado representativo do grau de similaridade de nove linhagens *D. sturtevantii* quanto ao padrão de bandas do elemento *P*, após a digestão do DNA com a enzima *Acc I* e hibridação com a sonda do fragmento *Puv II* do plasmídeo p π 25.1.

V. DISCUSSÃO

É denominado elemento canônico a sequência do elemento transponível *P* encontrada em *Drosophila melanogaster*, com aproximadamente 2907 pb, que foi clonada por O' Hare & Rubin (1983) no plasmídeo p π 25.1. No gênero *Drosophila*, sequências homólogas ao elemento *P* canônico são essencialmente confinadas ao subgênero *Sophophora* (Daniels *et al.*, 1990). Sequências homólogas a *P* foram detectadas em poucas espécies do subgênero *Scaptodrosophila*, em *D. buskii*, do subgênero *Dorsilopha* (Daniels *et al.*, *op. cit.*) e *D. phalerata*, *D. kuntzei* (Anxolabéhère *et al.*, 1987) e *D. mediopunctata* (Loreto *et al.*, 1998), espécies pertencentes ao subgênero *Drosophila*.

O subgênero *Sophophora* é composto pelos grupos *saltans* e *willistoni*, no Novo Mundo, e pelos grupos *obscura* e *melanogaster*, no Velho Mundo. A história evolutiva dos grupos *saltans* e *willistoni*, proposta por Throckmorton (1975), permite inferências sobre o tempo e o local de introdução do elemento *P* nestas linhagens. O grupo *willistoni* é subdividido em dois subgrupos, *willistoni*, o mais primitivo e *bocainensis*, o mais derivado. Após a divergência *saltans*-*willistoni*, na América do Norte tropical, a linhagem *saltans* continuou a se diversificar nesta região e deu origem aos ancestrais de seus subgrupos mais primitivos, *cordata* e *elliptica*. Propõe-se que antes do fechamento do Istmo do Panamá, um progenitor da América do Norte cruzou o espaço marinho e colonizou a América do Sul, onde, posteriormente, ocorreu a divergência que originou os subgrupos *sturtevanti*, *parasaltans* e *saltans*.

Daniels *et al.* (*op. cit.*), baseado em análises moleculares e em inferências biogeográficas de Throckmorton (1975), sugeriram que o elemento *P* surgiu no gênero *Drosophila* antes das primeiras radiações, e suas sequências foram transmitidas para as espécies do gênero por uma ou mais linhagens primitivas de *Scaptodrosophila*. Durante a radiação Sophophoriana, estas sequências *P* foram transmitidas verticalmente para uma linhagem *protomelanogaster* que, posteriormente, deu origem aos grupos *melanogaster* e *obscura*. A origem das sequências *P* nos grupos *saltans* e *willistoni* é mais problemática, pois as espécies mais primitivas deste grupo não apresentam sequências homólogas a *P*; porém, a existência de sequências *P* em *D. insularis*, uma espécie do grupo *willistoni*, restrita às Antilhas, homólogas às dos grupos *melanogaster* e *obscura*, sugere que o

elemento *P* surgiu nos grupos *saltans* e *willistoni* na mesma época que nestes grupos, mas foi perdida em algumas espécies por deriva genética.

Acredita-se que tenha ocorrido uma segunda invasão de seqüências *P*, depois do estabelecimento do grupo *saltans* no continente Sul Americano, que foram introduzidas, ou reintroduzidas, independentemente, nas linhagens *willistoni* e *saltans* da América do Sul. Esta segunda invasão poderia ter sido mediada por um processo infeccioso que ocorreu exclusivamente neste continente, naquele tempo. Tal evento poderia explicar a ausência do elemento *P* nos subgrupos *saltans* primitivos (*cordata* e *elliptica*) e a presença nos subgrupos derivados (*sturtevantii*, *parasaltans* e *saltans*).

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a ocorrência do elemento transponível *P* em linhagens de *D. sturtevantii* provenientes de diferentes regiões geográficas e avaliar o número de cópias e a integridade destas seqüências. Em uma primeira etapa deste estudo, comprovou-se a existência dos 764 pb iniciais da seqüência do elemento *P* canônico (Figura 5A) em todas as linhagens, através de PCR. As linhagens BRA, RP₁ e NHO apresentaram bandas inferiores a 764 pb, que evidenciam existirem cópias com deleções nesta região.

Além de análises moleculares, um dos métodos para detectar a ocorrência de diversas famílias de elementos transponíveis em uma espécie é a análise da disgenesia gonadal em descendentes de intercruzamentos submetidos à temperaturas elevadas. Além da família *P*, responsável pelo fenômeno de disgenesia híbrida (Kidwell *et al.*, 1977; Kidwell *et al.*, 1979; Bingham *et al.*, 1982; Black *et al.*, 1987; Boussy & Kidwell, 1987; Sved, 1987; Boussy *et al.*, 1988), outras famílias de elementos transponíveis podem causar esta anormalidade, tais como a família *I* (Bucheton *et al.*, 1976, 1984, 1986; Finnegan, 1989), a família *hobo* (Blackman *et al.*, 1987; Yannopoulos *et al.*, 1987; Stamatidis *et al.*, 1989) e a família *Ulysses* (Lozovskaya *et al.*, 1990).

Schaefer *et al.* (1979), em um dos trabalhos clássicos sobre o assunto, relataram os efeitos fenotípicos da disgenesia em híbridos do cruzamento entre machos da linhagem Harwich de *D. melanogaster*, que é classificada como P forte, e fêmeas da linhagem Canton S, classificada como M. Em descendentes de cruzamentos realizados sob temperaturas que variaram entre 18°C e 29°C, havia uma redução das dimensões dos ovários com o aumento da temperatura. Às temperaturas de 18°C e 21°C, os ovários

foram aparentemente normais. Entretanto, à temperatura de 25°C, a média do comprimento ovariano foi reduzida, e a 27°C e 29°C, os ovários sofreram uma drástica redução, possuindo em média 20% a 25% da dimensão normal. Esta redução ovariana foi denominada como disgenesia híbrida. A disgenesia ovariana bilateral predominou nos cruzamentos a 27°C e 29°C, a unilateral predominou nos cruzamentos a 25°C.

O padrão de distribuição da disgenesia P-M em populações de *D. melanogaster* vem sendo estudado em todo o mundo. Na Austrália foi estudado por Boussy (1987), Boussy & Kidwell (1987) e Boussy *et al.* (1988, 1998); na China e na América do Norte foi estudado por Anxolabéhère *et al.* (1988), na França e Ásia Central por Periquét *et al.* (1989) e no Brasil por Vetorazzi (1997, 1998) e Vetorazzi *et al.* (1999).

Com o objetivo de avaliar se os elementos *P* detectados pela reação em cadeia da polimerase nas linhagens de *D. sturtevantii* apresentam-se ou não em seu estado ativo, foram realizados cruzamentos, para se verificar a ocorrência de disgenesia híbrida. Observações preliminares (Sena & Carareto, 1997) indicaram frequências moderadas de disgenesia híbrida em cruzamentos de linhagens de *D. sturtevantii* de diferentes origens geográficas com uma linhagem de laboratório, coletada há mais de 40 anos na Colômbia, e que foi novamente utilizada neste trabalho.

Para que ocorra a transposição e conseqüente disgenesia híbrida são necessárias duas condições: linhagens com elementos *P* ativos e linhagens sem elementos *P* ou com apenas cópias defectivas com baixa atividade repressora. Como a linhagem colombiana (COL) tem sido mantida há várias décadas em laboratório, e conseqüentemente sujeita a reduções do tamanho populacional, erros de amostragem e deriva genética, havia a possibilidade de ter perdido parcial ou completamente suas cópias, tornando-se uma linhagem M, ou M'. A segunda condição, a existência de elementos ativos em *D. sturtevantii* também é possível, decorrente da regeneração de elementos completos e ativos através de eventos de recombinação entre duas cópias incompletas.

Os cruzamentos realizados entre as linhagens recém-coletadas e a linhagem COL, mostraram índices de disgenesia baixos (Tabela 1), sendo o maior observado no intercruzamento entre fêmeas I₂₇ e machos COL (DG = 8,57). As linhagens, independente da data de coleta, podem ser consideradas estáveis, de acordo com o critério de

Quenesville & Anxolabéhère (1997), pois apresentaram níveis de intraesterilidade baixos; os valores DG dos intracruzamentos foram inferiores a 5%.

No sistema P-M, a disgenesia híbrida é assimétrica, ocorrendo apenas no sentido de cruzamento entre machos P e fêmeas M (Preston & Engels, 1984). Isto indica que a regulação da atividade do elemento P faz-se através de um estado celular transmitido maternalmente, chamado citotipo P. O citotipo P, que é característico de linhagens P, reprime a transposição. O citotipo M, característico de linhagens M, é susceptível à ação do elemento P, uma vez que não apresenta atividade repressora (Engels, 1979). Neste trabalho, a disgenesia híbrida ocorreu em ambas direções de cruzamento, e portanto, parece provável que seja devida à presença de outra família de elementos transponíveis, que não a família P.

As análises fenotípicas mostraram ainda a ocorrência de ovários intermediários entre os extremos normal e disgênico (Tabela 2). Este fenótipo, denominado ovário rudimentar, consiste de ovários reduzidos a cerca de 25% da dimensão normal e da presença de um ou poucos ovários. Segundo Daniels *et al.* (1989), ovários rudimentares são raros em *D. melanogaster* (limitando-se a cruzamentos à temperatura de 25°C); entretanto, este tipo de ovário foi detectado, nesta espécie, em cruzamentos realizados a 29°C (Vetorazzi *et al.*, 1999). Ovários rudimentares foram freqüentes também em intracruzamentos de linhagens de *D. simulans* e de *D. mauritiana* (Montchamp - Moreau *et al.*, 1991).

Se considerarmos os ovários rudimentares como disgênicos, como fazem alguns autores, o maior índice de disgenesia gonadal foi encontrado no intercruzamento entre fêmeas COL e machos I₂₇ (25,71), seguido pelo cruzamento recíproco (12,86). Desta forma, independente da direção do cruzamento, percebemos que híbridos da linhagem I₂₇, apresentaram maior freqüência de anormalidades ovarianas, quando submetidos a temperaturas elevadas no período embrionário.

A disgenesia gonadal dependente da temperatura foi relatada também em *D. willistoni* (Regner *et al.*, 1999), em cruzamentos de uma linhagem derivada de um velho estoque de laboratório com outra recém-coletada de uma população natural. Dentre os cruzamentos, o maior índice de disgenesia ovariana foi 26,1, e o maior de disgenesia testicular foi 20,6, ambos resultantes do cruzamento entre fêmeas da linhagem antiga e

machos da recém-coletada. Níveis significantes de disgenesia também foram encontrados nos cruzamentos recíprocos. Os autores concluíram que o fenômeno da disgenesia em *D. willistoni*, apesar de apresentar uma morfologia muito semelhante ao encontrado em *D. melanogaster*, difere desta por não depender da direção de cruzamento, sendo provavelmente devida à mobilização de outro elemento transponível.

Os baixos índices de disgenesia encontrados nos demais cruzamentos realizados, neste trabalho sugerem a ausência de cópias completas do elemento *P* no genoma destas linhagens. No caso de existirem, sua transposição estaria sendo reprimida em todas as linhagens, por alguns dos mecanismos de regulação já citados.

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

Schaefer *et al.* (1979) observaram que a produtividade dos cruzamentos entre machos Harwich e fêmeas Canton-S de *D. melanogaster* diminuía significativamente com o aumento da temperatura. Às temperaturas de 18°C e 21°C, a produtividade era igual à dos cruzamentos controles, à temperatura de 25°C houve uma significativa redução da produtividade. Nos cruzamentos realizados a 27°C e 29°C não houve produção de descendência devido a quase 100% de incidência de disgenesia gonadal.

Kidwell *et al.* (1977) relataram que, em fêmeas, a esterilidade pode ser o resultado da falta de ovoposição ou pode ser uma falha na eclosão dos ovos. Segundo os autores, fêmeas falham completamente em colocar ovos em certos cruzamentos, em outros ocorrem anomalias na eclosão e, em um terceiro grupo, pode ocorrer uma combinação destes dois efeitos. Ovos colocados sob condições apropriadas de temperatura não mostram redução na habilidade de eclosão; já, os colocados sob alta temperatura apresentam uma certa redução. Os autores explicam que a fase de sensibilidade à temperatura ocorre em estágio precoce do desenvolvimento. Engels & Preston (1979), mostraram que a esterilidade gonadal dependente da temperatura é máxima antes e durante o primeiro estágio larval, decresce fortemente durante o segundo e é imperceptível durante e após o terceiro.



Neste estudo, todos os cruzamentos foram realizados à temperatura de 27°C, considerada ótima para a ocorrência de disgenesia híbrida e conseqüente incidência de esterilidade e redução da produtividade. Sendo a disgenesia híbrida P-M assimétrica, esperava-se observar uma redução da produtividade dos descendentes dos intercruzamentos da classe I, quando comparados com seus respectivos intracruzamentos e intercruzamentos II. Esta redução não ocorreu na maior parte dos cruzamentos, como demonstrado pelas comparações múltiplas de Tukey. Ao contrário, ocorreram descendentes de intercruzamentos da classe I com maior produtividade que os dos controles, como por exemplo, nos cruzamentos entre fêmeas COL e machos APA e entre fêmeas COL e machos NHO (Tabela 3).

As produtividades dos intracruzamentos, principalmente as das linhagens COL, I₂₇ e MAQ foram inferiores às dos respectivos intercruzamentos. Esta redução da produtividade pode ser devida à depressão endogâmica, resultante da manutenção destas linhagens em laboratório, como também, à conseqüente produtividade superior dos descendentes heterozigotos.

Dois são os possíveis mecanismos que originam o efeito heterótico nas populações mendelianas (Dobzhansky, 1955). De acordo com uma das proposições, o alto valor adaptativo de um heterozigoto pode surgir da coadaptação de alelos em dado loco, ou complexos gênicos alternativos em um dado cromossomo, através do processo da seleção natural. Segundo a outra, a heterozigose *per se*, significando a existência de diferentes alelos em um ou mais locos, pode ser responsável por um estímulo fisiológico, resultando em valor adaptativo superior. Este último deve ser o mecanismo responsável pela produtividade superior dos descendentes dos intercruzamentos.

Os resultados da produtividade, assim como os da análise morfológica das gônadas, indicam que não ocorreu transposição de elementos *P* nestas linhagens de *D. sturtevantii*, devido à ausência de cópias ativas no genoma desta espécie, ou à repressão da atividade destes elementos.

A análise de *dot blot* (Figura 5B) confirmou a presença dos elementos transponíveis *P* em todas as linhagens estudadas, como esperado, enquanto que a amplificação por PCR mostrou que todas as linhagens apresentam ao menos as seqüências iniciais de um elemento *P*, como também seqüências deletadas desta região (Figura 5A). Porém, este tipo de análise não permite conhecer o número de cópias e nem avaliar sua

integridade, não permitindo avaliar se os elementos presentes estão ativos (seqüência completa) ou inativos (com deleções internas).

Os padrões de hibridação, resultantes da análise de *Southern*, para o número de cópias do elemento *P* (Figuras 6 e 9), mostraram heterogeneidade do número chegando a um máximo de 15 cópias (linhagem MAQ, quando hibridada com o amplificado purificado do elemento *P* obtido das linhagens) e um mínimo de 6 (linhagem MAT, quando hibridada com o amplificado purificado do elemento *P* obtido do plasmídeo p π 25.1). Estes resultados são concordantes àqueles obtidos por Daniels *et al.* (1990) que, realizando hibridações no grupo *willistoni*, espécie muito próxima filogeneticamente a *D. sturtevantii*, encontraram 12 cópias em média. Os autores ainda realizaram neste estudo, hibridações para estudo da integridade das seqüências *P* no grupo *saltans*. A análise do *blot* apresentado no trabalho permitiu-nos deduzir que o número de cópias na linhagem de *D. sturtevantii* estudada foi igual a 12.

O presente estudo mostrou que o número médio de cópias para linhagens das *D. sturtevantii* variou de 9 a 11, dependendo da sonda utilizada. Outros estudos mostraram que o número de cópias do elemento *P* em espécies dos grupos *saltans* e *willistoni* é bem menor do que o encontrado em *D. melanogaster* (Daniels & Strausbaugh, 1986; Daniels *et al.*, 1990; Lansman *et al.*, 1985; Regner *et al.*, 1998). A presença do elemento *P* em todas populações de *D. willistoni* estudadas, e os resultados deste trabalho em *D. sturtevantii*, suportam a hipótese da ausência de linhagens homólogas a M nas espécies sul-americanas dos grupos *saltans* e *willistoni* (Daniels & Strausbaugh, 1986).

Comparações entre seqüências *P* encontradas em diferentes espécies, e até mesmo na mesma espécie, sugerem que existam algumas subfamílias de *P*, as quais divergem em até 30% de suas seqüências nucleotídicas (Capy *et al.*, 1998). Esta observação pode ser usada para explicar vários resultados deste trabalho.

O primeiro resultado refere-se ao fato que, utilizando-se como sonda o amplificado das linhagens, o número de bandas foi significativamente maior, indicando uma maior homologia entre as seqüências *P* das linhagens de *D. sturtevantii*, comparada com a seqüência *P* canônica de *D. melanogaster*. O segundo é que o tempo de exposição da membrana ao filme autorradiográfico necessitou ser um pouco maior, ao utilizar-se como sonda o amplificado do plasmídeo p π 25.1. Esta observação reforça o resultado

anteriormente discutido que há seqüências *P* no genoma das linhagens que não são suficientemente homólogas ao *P* canônico.

O terceiro resultado relacionado com a existência de subfamílias *P* é a observação de similaridades entre as linhagens em relação às suas distribuições geográficas. Tanto os padrões de bandamento que resultam dos sítios de inserção dos elementos *P* no genoma, quanto os padrões resultantes da análise de sua integridade, sugerem esta similaridade. Além disso, os dendogramas apresentados nas Figuras 11, 14, 17, 20 e 23 comprovam estas observações. Estes resultados passam a ser discutidos abaixo.

Quanto aos sítios de inserção, caracterizados pelo padrão de bandamento das seqüências *P*, destacaram-se dois tipos de bandas: aquelas que foram comuns a maioria das linhagens e aquelas comuns às linhagens geograficamente mais relacionadas.

As bandas denominadas 13, 18 e 23 (Figura 7) e 1, 3, 18 e 20 (Figura 10) ocorreram em pelo menos sete das nove linhagens, independente de sua origem geográfica. Pode-se supor, portanto, que estas seqüências estivessem presentes, e já inativas, em *D. sturtevantii*, no início de sua dispersão pelas Américas do Sul e Central, e sul da América do Norte, e não sofreram mutações nos sítios das endonucleases de restrição usadas para detectá-las.

As bandas denominadas como 1, 8, 11, 20 e 22, por exemplo, estão na maioria das vezes, presentes apenas nas linhagens colombiana e mexicanas; ao contrário, as bandas 3, 4, 6, 9, 10, 16, 19, 21, 24, 25, 26 e 27 estão presentes apenas nas linhagens brasileiras (Figura 7). Do mesmo modo, as bandas 11, 15 e 19 são em sua maioria restritas às linhagens colombiana e mexicanas, enquanto que, as bandas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 17, 21 e 22 estão presentes apenas nas linhagens brasileiras (Figura 10).

Os padrões de bandamento mostraram que as linhagens mexicanas e colombiana apresentam um nível de similaridade próximo a 90% (Figuras 8 e 11), enquanto que as brasileiras têm níveis de similaridade variando entre aproximadamente 50% (comparando-se todas as linhagens) a quase 95% (comparando-se linhagens geograficamente muito próximas, como RP₁, NHO e RP₂). Estas seqüências, similares em cada um destes dois grupos geográficos, devem ter origem mais recente. Possivelmente sejam descendentes de uma população ancestral que possuía elementos ainda ativos e, que após a dispersão da espécie pelas Américas, originou populações nas várias áreas geográficas, nas quais as seqüências *P* evoluíram diferentemente. Isto justificaria um conjunto de seqüências similares nas populações colombiana e mexicanas, e outro conjunto similar nas brasileiras.



Regner *et al.* (1998) também observaram similaridades quanto ao padrão de bandamento das linhagens geograficamente relacionadas de *D. willistoni*. Os autores observaram três padrões de hibridação: um para as linhagens coletadas no Amazonas, Pará e Bahia; outro para as linhagens coletadas no Rio de Janeiro e São Paulo, e um terceiro para Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Somente uma das linhagens coletadas no Paraná não apresentou um padrão de hibridação semelhante ao das linhagens geograficamente relacionadas, justificando-se este fato por esta linhagem ser restrita a uma ilha.

A digestão do DNA genômico de indivíduos portadores de elementos *P* completos, por exemplo, da linhagem Harwich de *D. melanogaster*, com a enzima *Ava II*, produz bandas de 1,8 Kb, 0,54 Kb e 0,48 Kb (Boussy *et al.*, 1988), que somadas correspondem a um elemento completo.

A análise da integridade das cópias do elemento *P* das linhagens de *D. sturtevantii* mostrou consistentemente a ausência da banda de 0,48 Kb (Figuras 12, 15 e 18). Como também foram observadas bandas de tamanhos superiores a 1,8 Kb, não esperadas, formulou-se a hipótese que a banda de 0,48 Kb, que é correspondente à extremidade 5' do elemento *P*, estivesse contida nestas bandas superiores, devido à existência de uma mutação no primeiro sítio de restrição para a endonuclease *Ava II*, o que impossibilitaria sua clivagem. O próximo sítio *Ava II* no genoma dos indivíduos estará em diferentes localizações, gerando bandas de tamanhos variáveis para cada cópia do elemento *P*. Em suporte a essa idéia observa-se que na linhagem Harwich-w de *D. melanogaster* foram detectados os três fragmentos esperados da digestão do DNA genômico com *Ava II*, indicando que as bandas superiores a 1,8 Kb detectadas nas linhagens de *D. sturtevantii* não são artefatos de técnica.

Uma estratégia utilizada para esclarecer se os fragmentos de 0,48 Kb estavam realmente contidos nas bandas superiores a 1,8 Kb foi hibridar a mesma membrana com um fragmento *Puv II* do elemento *P* canônico (Figura 15), homólogo apenas a partes dos fragmentos de 1,8 Kb e de 0,54 Kb. Neste caso, não se esperaria encontrar as bandas superiores a 1,8 Kb. Entretanto, essas bandas continuaram a ser detectadas. Além disso, a hibridação da mesma membrana com a sonda de 764 pb, correspondente à sequência *P* canônica inicial, confirmou tanto a ausência da banda de 0,48 Kb, como a presença de bandas superiores a 1,8 Kb (Figura 18).



A análise de PCR comprovou a existência dos sítios de anelamento para os oligonucleotídeos *primers* 829 e 830, bem como, a existência da sequência inicial do elemento *P* com 764 pb no genoma de todas as linhagens de *D. sturtevantii* (Figura 5A). Este resultado indica que a sequência de 0,48 Kb, correspondente ao primeiro fragmento da digestão com *Ava II* existe. A ausência da banda de 0,48 Kb nos experimentos de hibridação sugere que tenha ocorrido uma mutação de ponto no primeiro sítio de restrição desta enzima, o que levaria a formação das bandas superiores a 1,8 Kb.

A hipótese de uma mutação de ponto acima proposta, que impediria a digestão do primeiro sítio pela *Ava II* não justifica, entretanto, as bandas superiores a 1,8 Kb, também detectadas pelo fragmento *Puv II*, visto que esta sonda não hibridaria com a sequência *P* inicial. Uma possível explicação para este fato seria a ocorrência de elementos *P* com alterações, mutações de ponto ou deleções, envolvendo a região do segundo sítio de restrição da enzima *Ava II*, o que poderia explicar as bandas superiores a 1,8 Kb observadas nas hibridações com o fragmento *Puv II*.

Daniels *et al.* (1990), com o objetivo de esclarecer quais espécies dos grupos *saltans* e *willistoni* poderiam ser as possíveis doadoras da sequência *P* canônica, no processo de transferência horizontal para espécie *D. melanogaster*, observaram que as espécies do grupo *saltans* não apresentavam o fragmento de 0,9 Kb, originados pela digestão do DNA das linhagens com a enzima *Puv II*. Este resultado mostrou que as espécies do grupo *saltans* têm sequências *P* diferenciadas em relação às espécies *D. willistoni* e *D. melanogaster*, particularmente na região que se estende de 586 pb a 1482 pb, correspondentes aos dois sítios de restrição para a enzima na sequência *P* canônica.

As alterações detectadas por Daniels *et al.* (1990), e aquelas sugeridas neste trabalho, poderiam ser resultantes de mutações de ponto ou deleções, na sequência *P* canônica, ou mesmo da existência das subfamílias T ou O. Por outro lado, o presente estudo também mostra a existência de cópias inalteradas nesta região, em todas as linhagens, visto que a banda de 0,54 Kb foi detectada nos *blots* correspondentes às Figuras 12, 15 e 18.

Biémont *et al.* (1990), estudando populações de *D. melanogaster*, observaram que a digestão do DNA genômico de indivíduos portadores de elementos *P* completos pela endonuclease *AccI* produz bandas de 2,36 Kb, já que o elemento *P* completo possui sítios

para esta enzima nas posições 53 pb e 2412 pb. Como este fragmento corresponde a cerca de 80% do elemento *P*, sua presença é um indicativo da existência de cópias completas.

A digestão do DNA das linhagens de *D. sturtevantii* com a enzima *AccI*, e hibridação com a sonda correspondente ao fragmento *Puv II*, produziu bandas de aproximadamente 2,4 Kb (Figura 21). Entretanto, nas linhagens colombiana e mexicanas estas cópias não são idênticas às de *D. melanogaster*, já que a digestão com esta enzima produziu bandas levemente superiores. No caso das linhagens brasileiras, o padrão é mais próximo ao de *D. melanogaster*, entretanto, não se pode afirmar que estes fragmentos sejam homólogos aos do elemento *P* canônico.

A maior similaridade das linhagens geograficamente mais relacionadas, já demonstrada para o número de cópias específicas dos elementos *P* no genoma, fica também evidenciada nos resultados da análise da integridade. Na Figura 13, observa-se que as bandas 7, 12, 17, 18, 21, 25, 28 e 32 estão presentes apenas nas linhagens colombiana e mexicanas e as bandas 4, 9, 14, 15, 20, 22, 23, 29, 30, 33, e 35 estão presentes apenas nas linhagens brasileiras. Na Figura 16, observa-se que as bandas 1, 2, 3, 8, 20, 27 e 34 estão presentes apenas nas linhagens colombiana e mexicanas e as bandas 7, 9, 13, 17, 18, 19, 25, 26, 28, 30 e 32 estão presentes apenas nas brasileiras. O mesmo pode ser observado na Figura 19, onde as bandas 8, 13, 15, 21, 22, 23, 24 e 27 encontram-se apenas nas linhagens colombiana e mexicanas e as bandas 5, 7, 14, 16, e 25 apenas nas brasileiras.

Os padrões de bandamento agruparam as linhagens colombiana e mexicanas em um aglomerado com similaridade em torno de 90% e, as brasileiras, em outro, com valores que variaram entre 50%, considerando as seis linhagens a cerca de 90 %, considerando as linhagens geograficamente muito próximas, RP₁, NHO, RP₂ (Figuras 14, 17, 20 e 23).

Estes resultados, que sugerem fortemente maior similaridade de seqüências das linhagens geograficamente relacionadas, podem ser explicados pela existência de diferentes subfamílias do elemento *P* no grupo *saltans*, que foram introduzidos no grupo em épocas diferentes.

Clark *et al.* (1995), analisando espécies do subgênero *Sophophora*, agruparam filogeneticamente os elementos *P* em quatro clados principais. Embora exista uma divergência entre 0% e 10% entre os elementos do clado que reúne as seqüências mais similares ao *P* canônico, nos outros três, a divergência entre os membros do mesmo clado

foi significativamente maior (17%, 30% e 46%). Desta forma, os autores relataram a existência de várias subfamílias do elemento transponível *P*, e sugeriram, que possa haver a coexistência de mais de uma subfamília em um mesmo genoma.

Haring *et al.* (1998) relataram a existência de três diferentes subfamílias de elementos *P*, as chamadas T, O, M, em espécies de *Drosophila* do grupo *obscura*, que divergem em pelos 30% uma das outras. O tipo T é considerado imóvel e foi identificado em *D. ambigua*, *D. obscura*, *D. trititis* (Hagemann *et al.*, 1996), *D. subobscura* (Paricio *et al.*, 1991), *D. guanche* (Miller *et al.*, 1992) e *D. madeirensis* (Paricio *et al.*, 1996). O tipo O parece ser transponivelmente ativo (Haring *et al.*, 1995) e foi identificado em *D. bisfaciata* e *D. imaii*. O tipo M é o mais relacionado com a sequência *P* canônica de *D. melanogaster* (O' Hare & Rubin, 1983) e com as espécies dos grupos *saltans* e *willistoni* (Daniels *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1995). No grupo *obscura*, o tipo M foi encontrado nas espécies *D. bisfaciata* (Hagemann *et al.*, 1992), *D. imaii* (Haring *et al.*, 1995) e *D. helvetica* (Haring *et al.*, 1997, *apud* Haring *et al.*, 1998). Pelo menos em *D. bisfaciata* e *D. imaii*, os elementos do tipo M são inativos (Haring *et al.*, 1995).

Os dados acima mencionados sugerem que as bandas coincidentes nas linhagens colombiana, mexicanas e brasileiras (Figuras 7, 10, 13, 16, 19 e 22) são sequências que provavelmente já estavam inativas na população ancestral, ficando aprisionadas em certas regiões. Portanto, possivelmente estas sequências sejam de elementos das subfamílias T e O.

As sequências características de cada região geográfica (Figuras 7, 10, 13, 16, 19 e 22), que agruparam as linhagens colombiana e mexicanas em um aglomerado e as brasileiras em outro, que deveriam estar ativas nas populações ancestrais de cada grupo, seriam, assim, pertencentes à subfamília M.

As alterações encontradas nos fragmentos de restrição sugerem que as linhagens de *D. sturtevantii* estudadas apresentam diferentes subfamílias de elementos *P*. Os resultados sugerem que os elementos da subfamília M, completos ou incompletos, cuja sequência inicial foi amplificada pelos *primers* 829 e 830, apresentam uma mutação de ponto no primeiro sítio da enzima *Ava II*, indicando a existência da sequência correspondente ao fragmento de 0,48 Kb, embora o mesmo não tenha sido detectado por *Southern blot*. Contudo, a alteração no segundo sítio *Ava II* pode ser resultante de mutações de ponto, ou deleções, independente da subfamília à qual o elemento pertença.

Finalmente, a detecção dos fragmentos de 0,54 Kb e 1,8 Kb através de *Southern blot* (Figuras 12, 15 e 18), somada ao fato de que foi possível a amplificação dos 764 pb iniciais do elemento *P* em todas as linhagens (Figura 5A), sugerem que além de formas incompletas, devam também existir no genoma destas linhagens seqüências *P* completas com aproximadamente 2,9 Kb que, entretanto, estariam modificadas em relação a seqüência canônica.

Daniels & Strausbaugh (1986), estudando linhagens recém-coletadas de espécies do grupo *willistoni* e linhagens antigas de laboratório observaram que o padrão de hibridação era mais heterogêneo e complexo nas linhagens naturais do que nas de laboratório. A explicação dos autores para este fato foi a de que as linhagens de laboratório tinham seus elementos *P* funcionais perdidos devido a processos estocásticos.

Ao contrário dos resultados acima descritos, no presente trabalho não foram observadas diferenças marcantes entre a linhagens antigas e recém-coletadas. A linhagem BRA, mantida desde 1971 no Laboratório de Genética e Evolução de *Drosophila*, do Departamento de Biologia, da UNESP de São José do Rio Preto, e as linhagens recém-coletadas e geograficamente relacionadas a ela, como é o caso das linhagens RP₁, NHO, RP₂, apresentaram um padrão muito similar, apesar de não possuírem exatamente o mesmo número de cópias de elementos *P*. Esta similaridade seria esperada apenas se as cópias presentes no ancestral das linhagens estivessem todas incompletas e inativas, e também, se os estoques não tivessem passado por reduções extremas de tamanho que levasse a uma perda significativa de sua variabilidade.

Os resultados das análises fenotípicas e moleculares aqui relatados mostraram que o elemento *P* está presente em todas as linhagens de *D. sturtevantii* selecionadas para este estudo, porém no seu estado inativo. Esta inatividade pode ser devida à ausência de cópias completas similares à do elemento *P* canônico, como sugerido pelos experimentos de *Southern blot* realizados para verificar sua integridade. Uma hipótese alternativa para explicar essa inatividade seria a atuação de mecanismos de regulação eficientes. Estudos complementares são necessários para que se possa conhecer a estrutura destes elementos e identificar as diferentes subfamílias, como também entender a dinâmica da dispersão da família *P* nas populações de *Drosophila sturtevantii*.



V. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi averiguar a ocorrência, o número de cópias e a integridade e o grau de atividade das seqüências *P* no genoma de nove linhagens de *Drosophila sturtevantii*. As linhagens estudadas são procedentes do México (APA e MAT), da Colômbia (COL) e do Brasil (I₂₇, Minas Gerais; BRA, RP₁, RP₂, NHO, de regiões do Estado de São Paulo, e MAQ, do Rio Grande do Sul). A linhagem COL foi derivada dos estoques da Universidade do Texas (Austin, EUA), a linhagem BRA foi coletada em 1971, e as demais entre 1995 e 1998.

Para a identificação do grau de atividade dos elementos *P*, foram realizados intra e intercruzamentos recíprocos entre a linhagem da Colômbia e as demais, à temperatura de 27°C. Dos descendentes destes cruzamentos foram analisadas a morfologia das gônadas e a produtividade. Os índices de disgenesia gonadal (DG) foram baixos (0 a 8,56). Considerando os ovários rudimentares com disgênicos, os índices aumentaram, particularmente em descendentes dos cruzamentos entre fêmeas COL e machos I₂₇ (DG: 25,71) e no seu recíproco (DG: 12,86). A produtividade dos descendentes dos intracruzamentos, principalmente das linhagens COL, I₂₇ e MAQ (12,37; 7,27 e 8,84 imagos), foram inferiores às dos respectivos intercruzamentos (35,99; 35,07 e 22,79 imagos). Os baixos índices DGs, a falta de assimetria destes índices e a não redução da produtividade em descendentes dos intercruzamentos são sugestivos de inatividade dos elementos *P* nos híbridos destas linhagens.

Análises moleculares, através de PCR e *dot blot*, confirmaram a presença de seqüências *P* em todas as linhagens. Análises de *Southern*, através da digestão do DNA genômico das linhagens com a enzima de restrição *Sal I* e hibridação com sondas contendo os 764 pb iniciais do elemento *P* (amplificados do DNA das linhagens ou do plasmídeo p π 25.1) indicaram um número médio de cópias entre 9 e 11. Foram observadas bandas comuns a todas as linhagens, independente de sua origem geográfica, e bandas comuns apenas às linhagens geograficamente mais relacionadas.

As linhagens foram agrupadas quanto ao padrão de bandas, resultante da análise do número de cópias, através de análise multivariada. As linhagens mexicanas e colombiana foram reunidas em um aglomerado com similaridade próxima a 90% e, as brasileiras foram reunidas em outro, com níveis de similaridade variando entre 50% e 95%. Sugere-se que as bandas comuns a todas as linhagens sejam seqüências que estavam presentes, e já

inativas, desde o início da dispersão de *D. sturtevantii* pelas Américas, e que não sofreram mutações nos sítios das enzimas usadas para detectá-las. Sequências comuns às linhagens colombiana e mexicanas, de um lado, e às brasileiras, de outro, devem ter origem mais recente. Possivelmente sejam descendentes de uma população ancestral que possuía elementos ainda ativos e que, após a dispersão, originou populações nas várias áreas geográficas, nas quais as sequências *P* evoluíram diferentemente.

Para a investigação da integridade das sequências *P*, o DNA das linhagens foi digerido com as enzimas *Ava II* e *Acc I* e hibridado com sequências *P* do plasmídeo p π 25.1 (fragmento *Puv II*, amplificado dos 764 pb iniciais ou o plasmídeo inteiro). O DNA digerido com a enzima *Acc I* liberou fragmentos com tamanhos similares aos esperados 2,36 Kb em todas as linhagens, o que sugere a existência de sequências *P* completas. O produto da digestão com a enzima *Ava II*, hibridado com o plasmídeo p π 25.1, produziu dois dos três fragmentos esperados (0,54 Kb e 1,8 Kb). O fragmento correspondente aos 0,48 Kb iniciais da sequência *P* não foi observado, como também não foram identificados com a sonda produzida com os 764 pb iniciais da sequência *P*. Nestas análises ocorreram fragmentos superiores a 1,8 Kb, inesperados. Esta bandas foram também detectadas quando o DNA foi hibridado com a sequência *Puv II*.

Amplificações por PCR mostraram a existência dos 764 pb iniciais do elemento *P*, que contém a sequência correspondente ao fragmento *Ava II* de 0,48 Kb. A ausência deste fragmentos sugere a inexistência do primeiro sítio desta enzima, que resultaria na produção de bandas superiores a 1,8 Kb; os fragmentos de 0,54 Kb e 1,8 Kb indicam que o restante do elemento está completo. Mutações de ponto, ou deleções, na região do segundo sítio *Ava II*, em elementos de outra subfamília, explicariam a manutenção das bandas de 1,8 Kb em membranas hibridadas com a sonda *Puv II*. Estes resultados corroboram dados da literatura que identificaram em *D. sturtevantii* elementos *P* de diferentes subfamílias e permitiram, ainda, sugerir algumas das alterações que estes elementos apresentariam. Não foram encontradas diferenças significativas entre as sequências *P* de linhagens antigas e recém-coletadas, como demonstrado pelos padrões de bandas muito similares da linhagem BRA e das linhagens RP₁, NHO e RP₂.

Os resultados das análises fenotípicas e moleculares mostraram que o elemento *P* ocorre em todas as linhagens de *D. sturtevantii*, porém sugerem que esteja em estado

inativo. A inatividade pode ser decorrente da ausência de cópias completas do elemento *P* canônico, como pode também, ser devida a mecanismos que regulam a transposição. Estudos complementares são necessários para que se possa conhecer a estrutura destes elementos, como também, entender a dinâmica da dispersão da família *P* nas populações de *Drosophila sturtevantii*.

D. sturtevantii (L.) and Brazil (27, Minas Gerais: BRA, RP₁, RP₂, NHO, from São Paulo state, and MAQ, from Rio Grande do Sul state). The COL strain was derived from stocks brought from University of Texas (Austin, USA), the BRA strain was collected in 1971, and the others were collected between 1995 and 1998.

To evaluate the degree of activity of *P* sequences intracrosses and reciprocal intercroses between the Colombia strain and the others, at 27°C, were done. The morphology of ovaries and testis and productivity of offspring were analyzed. The gonadal dysgenesis indexes (DG) were low, between zero and 8.56. Considering rudimentary ovaries as dysgenic, these indexes became larger, mainly in the offspring of the crosses between COL females and males I₂ (DG: 25.71) and its reciprocals (DG: 12.86). The productivity of the intracrosses, mainly of COL, I₂ and MAQ (12.37, 7.27 and 8.84 flies) were inferior to the respective intercroses (35.99, 35.07 and 22.79 flies). The low DG indexes and its absence of asymmetry and the non reduction of productivity among the offspring of the intercroses suggest that transposition of *P* elements did not happen in hybrids of these strains.

PCR and dot blot analysis confirmed the presence of *P* sequences in all strains. Southern blots with genomic DNA of the strains digested with *Sal I* restriction enzyme and probed with the first 764 pb of *P* element (amplified from the DNA of the strains or from the *D. melanogaster* *P* element p₁ 25.1) showed that the medium number of *P* element copies varied between 9 and 11. Common bands were observed in all strains, independent of geographical origin, as well as were observed bands common just to geographically more related strains.

Multivariate analyses was done to compare the band patterns resulting from the analysis of copy number. The Mexican and Colombian strains were grouped in a cluster with similarity levels close to 90% and the Brazilian strains were grouped in another, with similarity varying between almost 30% to nearly 95%. These data suggest that the fragments common to all the strains are sequences that were present, and already inactive, since the beginning of the dispersion of *D. sturtevantii* in the Americas, and they did not

VII. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The occurrence, number of copies, integrity and degree of activity of element *P* in nine strains of *Drosophila sturtevantii* was investigated. The strains are from Mexico (APA and MAT), Colombia (COL), and Brazil (I27, Minas Gerais; BRA, RP₁, RP₂, NHO, from São Paulo state, and MAQ, from Rio Grande do Sul state). The COL strain was derived from stocks brought from University of Texas (Austin, USA), the BRA strain was collected in 1971, and the others were collected between 1995 and 1998.

To evaluate the degree of activity of *P* sequences intracrosses and reciprocal intercrossees between the Colombia strain and the others, at 27°C, were done. The morphology of ovaries and testis and productivity of offspring were analyzed. The gonadal dysgenesis indexes (DG) were low, between zero and 8.56. Considering rudimentary ovaries as dysgenic, these indexes became larger, mainly in the offspring of the crosses between COL females and males I₂₇ (DG: 25.71) and its reciprocals (DG: 12.86). The productivity of the intracrosses, mainly of COL, I₂₇ and MAQ (12.37; 7.27 and 8.84 flies) were inferior to the respective intercrossees (35.99; 35.07 and 22.79 flies). The low DG indexes and its absence of asymmetry and the non reduction of productivity among the offspring of the intercrossees suggest that transposition of *P* elements did not happen in hybrids of these strains.

PCR and dot blot analysis confirmed the presence of *P* sequences in all strains. Southern blots with genomic DNA of the strains digested with *Sal I* restriction enzyme and probed with the first 764 pb of *P* element (amplified from the DNA of the strains or from the *D. melanogaster* *P* element p π 25.1) showed that the medium number of *P* element copies varied between 9 and 11. Common bands were observed in all strains, independent of geographical origin, as well as were observed bands common just to geographically more related strains.

Multivariate analyses was done to compare the band patterns resulting from the analysis of copy number. The Mexican and Colombian strains were grouped in a cluster with similarity levels close to 90% and the Brazilian strains were grouped in another, with similarity varying between almost 50% to nearly 95%. These data suggest that the fragments common to all the strains are sequences that were present, and already inactive, since the beginning of the dispersion of *D. sturtevantii* in the Americas, and they did not



suffer mutation in the restriction sites of enzymes used to detect them. The sequences common to the Colombian and Mexican strains, on one hand, and to the Brazilians, on the other, should have more recent origin. Possibly they descend from an ancestral population that still possessed active elements and, after the dispersion, originated populations in different geographical areas, in which some *P* sequences evolved differently.

To investigate the integrity of the *P* sequences, the DNA were digested with the enzymes *Acc I* and *Ava II* and probed with the *P* element π 25.1 sequences (the fragment *Puv II*, the PCR product of the initials 764 pb or the entire π 25.1). The *Acc I* digests liberated fragments with sizes similar to 2.36 Kb in all the strains, which suggests the occurrence of complete *P* sequences. The *Ava II* digests probed with π 25.1 generated two from the three expected fragments (544 pb and 1883 pb). The fragment corresponding to the initials 480 pb of the *P* sequence was not observed; was also not observed when the same blot was probed with the 764 pb of the *P*. Additional bands, bigger than 1.8 Kb, were observed in this blot. These bands were also observed when the same blot was hybridized with the *Pvu II* fragment.

PCR amplification showed the existence of the 764 pb initial sequence of the *P* element that contains the 0.48 Kb produced by *Ava II*. The absence of the corresponding band suggests the absence of the first *Ava II* site, possibly due to a point mutation, which would explain the occurrence of bands bigger than 1.8 Kb. The 0.54 Kb and 1.8 Kb fragments indicate that the rest of the element is complete. The occurrence of alterations, point mutations or deletions, also in the second site of *Ava II*, in elements from other *P* subfamilies, would explain the maintenance of these bigger of 1.8 Kb bands in membranes probed with *Puv II*. These results are in agreement with literature that shows the existence of two subfamilies of *P* elements in *D. sturtevantii* at least and allows to make inferences about some of the modifications that these elements present. Significant differences among the *P* sequences of old and recently collected strains were not found, as demonstrated by very similar banding patterns of the BRA strain and RP₁, NHO and RP₂ strains.

The phenotypic and molecular analyses showed that the *P* element is present in all strains of *D. sturtevantii*, even though in its inactive state. This inactivity can be due to the absence of complete copies of the *P* element, or also to mechanisms of transposition regulation. Additional studies are necessary to determine the structure of these elements

and to identify the different subfamilies, as well as for understanding the dispersion dynamics of the *P* element family in populations of *Drosophila sturtevantii*.

- ANXOLABÉHÈRE, D., NOUAUD, D., PÉRIQUET, G., TCHEN, P. *P* elements distribution in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 82, p. 5418 - 5422, 1985.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KIDWELL, M. G., PÉRIQUET, G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements. *Mol. Biol. Evol.*, v. 5, p. 252 - 269, 1987.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KIDWELL, M. G., PÉRIQUET, G. Evolutionary genetics of the *P* elements in *Drosophila melanogaster* and *Drosophilidae* family. *Genetics*, v. 7, p. 1 - 3, 1988.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KIDWELL, M. G., PÉRIQUET, G. L'histoire d'une invasion génétique. *La Recherche*, v. 20, p. 1328 - 1338, 1989.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KAI, H., NOUAUD, D., PÉRIQUET, G. P-M system a survey of *Drosophila melanogaster* strains from the People's Republic of China. *Génét. Sélect. Evol.*, v. 22, p. 175 - 188, 1990.
- BIÉMONT, C., RONSSERAY, S., ANXOLABÉHÈRE, D., IZAABEL, I., GAUTIER, C. Localization of *P* elements, copy number regulation, and cytotype in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, v. 56, 3 - 14, 1990.
- BINGHAM, 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.
- BINGHAM, P. M., ZACHAR, Z. Retrotransposons and the *FB* transposon from *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed). *Mobile DNA*. Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1989. p. 485 - 502.
- BLACK, D. M., JACKSON, M. S., KIDWELL, M. G., DOVER, G. A. *KP* elements repress *P* induced dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal*, v. 6, p. 4125 - 4135, 1987.
- BLACKMAN, R., GRIMAILA, R., KOEHLER, M., GILBART, W. Mobilization of *hobo* elements residing within the decapentaplegia gene complex: suggestion of new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, v. 49, p. 497 - 503, 1987.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANXOLABÉHÈRE, D., NOUAUD, D., PERIQUET, G., TCHEN, P. *P* elements distribution in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 82, p. 5418 - 5422, 1985.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KIDWELL, M. G., PÉRIQUET, G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements. *Mol. Biol. Evol.*, v. 5, p. 252 - 269, 1987.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KIDWELL, M. G., PÉRIQUET, G. Evolutionary genetics of the *P* elements in *Drosophila melanogaster* and *Drosophilidae* family. *Genetics*, v. 7, p. 1 - 8, 1988.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KIDWELL, M. G., PÉRIQUET, G. L'histoire d' une invasion génétique. *La Recherche*, v.20, p. 1328 - 1338, 1989.
- ANXOLABÉHÈRE, D., KAI, H., NOUAUD, D., PERIQUET, G. P-M system a survey of *Drosophila melanogaster* strains from the People's Republic of China. *Génét. Sél. Evol.*, v.22, p.175 - 188, 1990.
- BIÉMONT, C., RONSSERAY, S., ANXOLABÉHÈRE, D., IZAABEL, I, GAUTIER, C. Localization of *P* elements, copy number regulation, and cytotype in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, v. 56, 3 - 14, 1990.
- BINGHAM, 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.
- BINGHAM, P. M., ZACHAR, Z. Retrotransposons and the *FB* transposon from *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D.E., HOWE, M.M. (Ed). *Mobile DNA*. Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1989. p. 485 - 502.
- BLACK, D. M., JACKSON, M. S., KIDWELL, M. G., DOVER, G. A. *KP* elements repress *P* induced dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal*, v. 6, p. 4125 - 4135, 1987.
- BLACKMAN, R., GRMAILA, R., KOEHLER, M., GILBART, W. Mobilization of *hobo* elements residing within the decapentaplegia gene complex: suggestion of new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, v. 49, p. 497 - 505, 1987.

- BOUSSY, I. A., KIDWELL, M. G. The P-M hibrid dysgenesis cline in eastern Australian *Drosophila melanogaster*: discrete P, Q and M regions are nearly contiguous. *Genetics*, v. 115, p. 737 - 345, 1987.
- BOUSSY, I. A. A latudinal cline in P-M gonadal dysgenesis potential in Australian *Drosophila melanogaster* populations. *Genet. Res.*, v. 49, 1987.
- BOUSSY, I. A., HEALY, M. J., OAKESHOTT, J. C., KIDWELL, M. G. Molecular analysis of P-M gonadal dysgenesis cline in eastern Australian *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 119, p. 889 - 902, 1988.
- BOUSSY, I. A., ITHOH M., RAND D., WOODRUFF, R. C. Origin and decay of the P element-associated latitudinal cline in Australian *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 104, p. 45-57, 1998.
- BUCHETON, A., LAVIGE, J.M., PICARD, G., HERITIER, P. Non-Mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster*: quantitative variation in the efficiency of inducer and reactive strains. *Heredity*, v. 36, p. 305 - 314, 1976.
- BUCHETON, A., PARO, R., SANG, H. M., PELISSON, A., FINNEGAN, D. J. The molecular basis of I-R hybrid dysgenesis: identification, cloning and properties of I factor. *Cell*, v. 38, p. 153 - 163, 1984.
- BUCHETON, A., SIMONELIG, M., VAURY, C., CROZATIER, M. Sequences similar to the I transposable element involved in I-R hybrid dysgenesis occur in other *Drosophila* species. *Nature*, v. 322, p. 650 - 652, 1986.
- CAPY, P., BAZIN, C., HIGUET, D., LANGIN, T. *Dynamics and Evolution of Transposable Elements*. 1st. France: Landes Bioscience, 1998. 197p.
- CHARLESWORTH, B., CHARLESWORTH, D. The population dynamics of transposable elements. *Genet. Res.*, v. 42, p. 1 - 27, 1983.
- CLARK, J. B., ALTHEIDE, T. K., SCHLOSSER, M. J., KIDWELL, M. G. Molecular evolution of P transposable elements in genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. *Mol. Biol. Evol.*, v. 12, p. 902 - 913, 1995.
- CLARK, J. B. & KIDWELL, M. G. A phylogenetic perspective on P transposable element evolution in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad.Sci.,USA*, v. 94, p. 11428 - 11433, 1997.
- DANIELS, S. B., STRAUSBAUGH, L.D. The distribution of P element sequences in *Drosophila*: the *willistoni* and *saltans* species groups. *J. Mol. Evol.*, v. 23, p. 138 - 148, 1986.

- DANIELS, S. B., CHOVNICK, A., KIDWELL, M. G. Hybrid dysgenesis in *Drosophila simulans* lines transformed with *P* elements. *Genetics*, v. 121, p. 281 - 291, 1989.
- DANIELS, S. B., PETERSON, K. R., STRAUBAUGH, L.D., KIDWELL, M.G., CHOVNICK, A. Evidence for horizontal of the *P* transposable element between *Drosophila* species. *Genetics*, v. 124, p. 339 - 355, 1990.
- DOBZHANSKY, Th. A review of some fundamental concepts and problems of population genetics. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 20, p. 1 - 15, 1955.
- DOOLITTLE, W. F., SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotypic paradigm and genomic evolution. *Nature*, v. 284, p. 601 - 603, 1980.
- ENGELS W. R. *P* elements in *Drosophila melanogaster*. In: BERG, D. E. & HOWE, M. M., *Mobile DNA*. Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1989. p. 439 - 484.
- ENGELS, W. R. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: rules of inheritance of female sterility. *Genetics*, v. 33, p. 219 - 236, 1979.
- ENGELS, W. R., PRESTON, C. R. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. The biology of female and male sterility. *Genetics*, v. 92, p. 161 - 174, 1979.
- 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. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.*, v. 5, p. 103 - 107, 1989.
- HAGEMANN, S., MILLER W. J., PINSKER, W. Identification of a complete *P* - element in the genome of *Drosophila bifasciata*. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 409 - 413, 1992.
- HAGEMANN, S., HARING, E., PINSKER, W. Repeated horizontal transfer of *P* transposons between *Scaptomyza pallida* and *Drosophila bifasciata*. *Genetica*, v. 98, p. 43 - 51, 1996.
- HARING, E., HAGEMANN S., PINSKER, W. Different evolutionary behavior of *P* element subfamilies: M-type and O-type elements in *Drosophila bifasciata* and *D. imaii*. *Gene*, v. 163, 197 - 202, 1995.
- HARING, E., HAGEMANN, S., PINSKER, W. Transcription and splicing patterns of M- and O-Type *P* elements in *Drosophila bifasciata*, *D. helvetica* and *Scaptomyza pallida*. *J. Mol. Evol.*, v. 46, p. 542 - 551, 1998.

- 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* genus by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, v. 253, p. 1125 - 1129, 1991.
- JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B., *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986. p. 275 - 286.
- KAPLAN, N. L., BROOKFIELD, J. Y. L. The effect on homozygosity of selective differences between sites of transposable elements. *Theory Population Biology*, v. 23, p. 272 - 280, 1983.
- KAPLAN, N. L., DARDEN, T., LANGLEY, C. Evolution and extinction of transposable elements in Mendelian populations. *Genetics*, v. 109, p. 459 - 480, 1985.
- KIDWELL, M. G., KIDWELL, J. F., SVED, J. A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*, v. 86, p. 813 - 833, 1977.
- KIDWELL, M. G., NOVY, J. B. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. sterility resulting from gonadal dysgenesis in P-M system. *Genetics*, v. 92, p. 1127 - 1140, 1979.
- KIDWELL, M.G., FRYDRYK, J.F., NOVY, J.B. The hybrid dysgenesis potential of *Drosophila melanogaster* strains of diverse temporal and geographical natural origins. *Drosophila Inform. Serv.* v. 59, p. 63-69, 1983.
- LANGLEY, C. H., MONTGOMERY, E., HUDSON, R., KAPLAN, N., CHARLESWOTH, B. On the role of unequal exchange in containment of transposable element copy number. *Genet. Res.*, v. 52, p. 223 - 235, 1988.
- LANSMAN, R. A., STACEY, S. N., GRIGLIATTI, T. A, BROCK, W. Distribution conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Nature*, v. 318, p. 561 - 563, 1985.
- LASKI, F. A., RIO, D. C., RUBIN, G. M. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at level of mRNA splicing. *Cell*, v. 44, p. 21 - 32, 1986.
- LEWIN, B. *Genes V*. New York: Oxford University Press, 1994. 1272 p.



- LORETO, E. L. S., BASSO DA SILVA, L., ZAHA, A., VALENTE, V. L. S. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. *Genetics*, v. 101, p. 153 - 165, 1998.
- LOZOVSKAYA, E. R., SCHEINKER, V. S., EVGEN'EV, M. A hybrid dysgenesis syndrome in *Drosophila virilis*. *Genetics*, v. 126, p. 619 - 623, 1990.
- MIKI, Y. Retrotransposal ingregation of mobile genetic elements in human diseases. *J. Hum. Genet.*, v. 43, p. 77 - 84, 1998.
- MILLER, W. J., HAGEMANN, S., REITER, E., PINSKER, W. *P* homologous sequences are tandemly repeated in the genome of *Drosophila guanche*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 4018 - 4022, 1992.
- MONTCHAMP - MOREAU, C., PERIQUET, G., ANXOLABÉHÈRE, D. Interspecific transfer of *P* elements by crosses between *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *J. Evol. Biol.*, v. 4, p. 131 - 140, 1991.
- MONTCHAMP - MOREAU, C., RONSSERAY, S., JACQUES, M., LEHMANN, M., ANXOLABÉHÈRE, D. Distribution and conservation of sequences homologous to 1731 retransposon in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 10, p. 791 - 803, 1993.
- O'HARE, K., RUBIN, G. M. Structure of *P* element transposable and their sites of insertion and excision in *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, v. 25, p. 24 - 35, 1983.
- ORGEL, L.E., CRICK, F. H. C. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, v. 284, p. 604 - 606, 1980.
- PARICIO, N., PÉREZ-ALONSO, M., MARTÍNEZ-SEBASTIAN, M. J., DEFRUTOS, R., *P* sequences of *Drosophila subobscura* lack exon 3 and may encode a 66 KDa repressor-like protein. *Nucleic Acids Res.*, v. 19, p. 6713 - 6718, 1991.
- PARICIO, N., MILLER, W. J., MARTÍNEZ-SEBASTIAN, M. J., HAGEMANN, S., DEFRUTOS, R., PINSKER, W. Structure and organization of the *P* element related sequences in *Drosophila madeirensis*. *Genome*, v. 39, p. 823 - 829, 1996.
- PERIQUET, G., RONSSERAY, S., HAMELIN, M. H. Are *Drosophila melanogaster* populations under a stable geographical differentiation due to the presence of *P* elements. *Heredity*, v. 63, p. 45 - 58, 1989.

- PERKINS, H. D., HOWELLS, A. J. Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in blowfly *Lucilia cuprina*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 89, p. 10753 - 10757, 1992.
- PRESTON, C. R., ENGELS, W. R. Moviment of *P* elements within a *P* strain. *Drosophila Inform. Serv.*, v. 60, p. 169 - 170, 1984.
- QUESNEVILLE, H., ANXOLABÈHÈRE, D. A simulation of the *P* element horizontal transfer in *Drosophila*. *Genetica*, v. 100, p. 295 - 307, 1997.
- REGNER, L. P., ZAHA, A., ABDELHAY, E., VALENTE, V. L. S., *P* elements in natural populations of *Drosophila willistoni* from different geografical origins. *Drosophila Inform. Serv.*, p. 156 - 160, 1998.
- REGNER, L. P., ABDELHAY, E., ROHDE, C., RODRIGUES, J. J. S., VALENTE, V. L. S. Temperature-dependent gonadal hybrid in *Drosophila willistoni*. *Genetics and Molecular Biology*, v.22, p.205 - 211, 1999.
- RONSSERAY, S., LEHMANN, M., ANXOLABÈHÈRE, D. Copy number and distribution of *P* an *I* mobile elments in *Drosophila melanogaster* populations. *Chromosoma*, v. 98, p. 207 - 214, 1989.
- RUBIN, G. M., KIDWELL, M. G., BINGHAN, P. M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations. *Cell*, v. 29, p. 987 - 994, 1982.
- RUBIN, G. M. Dispersed repetitive DNAs in *Drosophila*. In: SHAPIRO, J. A, *Mobile Genetic elements*. New York: Academic Press, 1983. p. 329 - 361.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manuals*. 2º ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.1.74 - 1.84.
- SCHAEFER, R. E., FAUSTO-STERLING, A., KIDWELL, M. G. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: morphological and cytologycal studies of ovarian dysgenesis. *Genetics*, v. 92, p. 1141 - 1152, 1979.
- SENA, J., CARARETO, C. M. A. Disgenesia híbrida em *Drosophila sturtevantii*. *Rev. Brasil. Genetica*, v. 20 (3), p. 307, 1997.
- SIEBEL, C. W., FRESCO, L. D., RIO, D.C. The mechanism of somatic inhibition of *Drosophila P* element pre-mRNA *splicing*: multiprotein complexes at an exon pseudo-5' *splice* site control U1 sn RNP binding. *Genes and Development*, v. 6, p. 1386 - 1401, 1992.

- SIMONELIG, M., ANXOLABÉHÈRE, D. A *P* elements of *Scaptomyza pallida* is active in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 88, p. 6102 - 6106, 1991.
- SIMONELIG, M., ANXOLABÉHÈRE, D. *P* elements are old components of *Scaptomyza pallida* genome. *J. Mol. Evol.*, v. 38, p. 232 - 240, 1994.
- SPRADLING, M., RUBIN, G. M. Transposition of cloned *P* elements into *Drosophila* germline chromossomes. *Science*, v. 47, 218 - 241, 1982.
- STAMITIS, N., MONASTIRIOTI, M., YANNOPOULOS, G., LOUIS, C. The P-M and the 23.5 MRF (*hobo*) systems of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* are independent of each other. *Genetics*, v. 123, p. 379 - 387, 1989.
- STEEL, R. G., TORRIE, J. H. *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill Book Company, Inc, 1960, 481 p.
- SVED, J. A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*, evidence from sterility and Southern hybridization test that *P* cytotype is not maintained in absence of chromossomal *P* factors. *Genetics*, v. 115, p. 121 - 127, 1987.
- TROCKMORTON, L. H. *The phylogeny, ecology and geography of Drosophila*. In: KING, R.C., *Handbook of Genetics*, v. 3. New York: Plenum Press, 1975. p. 421-469.
- VETORAZZI, V.C.R. Hibrid dysgenesis induced by *P* and *hobo* transposable elements in *Drosophila melanogaster* strains from Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 21, n° 2, p. 291 -292, 1998.
- VETORAZZI, V.C.R. *Disgenesia híbrida induzida pelos elementos transponíveis P e hobo em linhagens de Drosophila melanogaster de diferentes regiões do Brasil*, 1997, 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- VETORAZZI, V.C.R., LOURENÇO, M.F., CARARETO, C.M.A. The distribution of the P-M hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster* strains from Brazil. *Genetica*, v. 105, p. 273 - 279, 1999.
- YANNOPOULOS, G., STAMATIS, N., MOMSTIRIOTI, M., HATZOOPOULOS, P., LOUIS, C. *Hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23,5 MRF. *Cell*, v. 48, p. 487- 495, 1987.

