

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ELEMENTO TRANSPONÍVEL *GALILEO* COMO AGENTE PROMOTOR DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS EM *DROSOPHILA WILLISTONI* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE): UMA ABORDAGEM *IN SITU*.

CAROLINA FLORES GARCIA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

VERA LÚCIA S. VALENTE GAIESKY – Orientadora

Porto Alegre, Fevereiro de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética do Instituto de Biociências na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com recursos financeiros do CNPq, do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS e Bolsa de Mestrado do Edital MCT/70-2008 CNPq, processo nº 550569/2009-0.

Dedico esta Dissertação à minha avó Eva (*in memoriam*),

por ter me ajudado tanto nesta vida, e por ainda

continuar me ajudando.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada Professora Vera, por ter me dado a oportunidade ímpar de trabalhar no Laboratório de *Drosophila* e assim tornar muitos sonhos em realidade. Obrigada pelos ensinamentos, pela atenção, pela credibilidade; por ter e transmitir tanto entusiasmo, inclusive naqueles momentos em que tudo parece que não vai dar certo. Eu sou muito grata e feliz por poder aprender com a senhora.

Agradeço à minha mãe Marisa, minha avó Eva, minha tia Dalva (nossa estrela D'alva) e meu tio Enio. Tudo na minha vida devo a vocês. Aos meus irmãos Giuliano e Rafael por torcerem por mim e por poder contar sempre com eles.

Ao Leonardo, pela atenção, companhia, pela ajuda em tantos momentos. Pelo grande amor.

Ao grupo unido do Laboratório de *Drosophila* com quem tive e tenho o prazer de trabalhar: Gisele, Marícia, Maríndia, Ju C, Ju WG, Hermes, Aline, Dirleane, Gilberto, Clevertom, Adriana L, Adriana S, Liz, Ferreira, Gilson, Bento, Ana, Bibi, Gabriela, Mário. Vocês são os melhores!

Agradeço ao Hermes, à Ju C, à Ju WG, à Marícia, à Maríndia e à Ana pela ajuda e por me ensinarem técnicas e convivência. O que aprendi com vocês faz parte da minha formação e desta dissertação.

À Gisele, pela parceria desde o início lá no laboratório da frente. Por me desejar coisas boas, teus emails e tuas mensagens sempre me colocavam um sorriso no rosto.

Ao professor Victor, pela presteza em ajudar, não só a mim, mas a todos nós.

À Berê, Dani, Dona Sueli e Bibi pelo apoio técnico e convivência no Laboratório.

Ao Elmo e à Helen, por sempre me auxiliarem com a maior dedicação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	5
RESUMO	8
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I	12
Introdução	12
Rearranjos cromossômicos: um capítulo na história da vida	12
Inversões e evolução em <i>Drosophila</i>	15
<i>Drosophila willistoni</i> : uma das espécies mais polimórficas do gênero	19
Pontos de quebra das inversões: origem e distribuição	24
Elementos Transponíveis	27
Elementos Transponíveis e Heterocromatina	32
Elementos Transponíveis e Rearranjos cromossômicos	34
Transposon <i>Galileo</i> : agente causador de rearranjos cromossômicos em populações naturais de <i>Drosophila</i>	37
OBJETIVOS	53
CAPÍTULO II	54
Distribuição do elemento transponível <i>Galileo</i> nos cromossomos politênicos de <i>Drosophila willistoni</i> e possíveis implicações evolutivas.	54
CAPÍTULO III	91
Discussão geral e perspectivas	91
Conclusões	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

<i>71E</i>	<i>Ecdysone-induced gene 71Ee</i>	
<i>Adh</i>	<i>Alcohol dehydrogenase</i>	álcool desidrogenase
<i>BRC</i>	<i>broad-complex</i>	
<i>CuZn Sod</i>	<i>Superoxide dismutase</i>	
<i>E74</i>	<i>Ecdysone-induced protein 74EF</i>	
<i>E75</i>	<i>Ecdysone-induced protein 75EF</i>	
<i>Hsp 8</i>	<i>heat shock protein 8</i>	
<i>Hsr-omega</i>	<i>heat shock RNA omega</i>	
<i>Hsp 27</i>	<i>heat shock protein 27</i>	
<i>mu-F</i>	<i>mutator from Florida</i>	
<i>Sgs5</i>	<i>Salivary gland secretion 5</i>	
<i>Ubi</i>	<i>Ubiquitin</i>	Gene da ubiquitina
<i>BuTs</i>		<i>Transposons de Drosophila buzzatii</i>
<i>CDSs</i>		Sequências codificadoras
<i>Gb</i>		Gigabase
<i>IRs</i>	<i>Inverted Repeats</i>	Repetições invertidas
<i>TIRs</i>	<i>Inverted Repeats Terminal</i>	Repetições terminais invertidas
<i>IR-FD</i>	<i>Inverted Repeat-Flanking</i>	Domínio flanqueador

	<i>Domain</i>	da região invertida
<i>IR-OD</i>	<i>Inverted Repeat-Outer Domain</i>	Domínio externo da região invertida
<i>IR-ID</i>	<i>Inverted Repeat-Inner Domain</i>	Domínio interno da região invertida
kb		kilobase
<i>LTRs</i>	<i>Long Terminal Repeats</i>	
<i>LINEs</i>	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>	
<i>M</i>	<i>Midle domain</i>	Domínio central
Mb		Megabase
<i>MITEs</i>	<i>Miniature Inverted Repeats Transposable Elements</i>	
NaOH		Hidróxido de Sódio
<i>ORF</i>	<i>Open Read Frame</i>	Regiões de leitura aberta
Pb		Pares de base
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase
<i>RT</i>		Transcriptase reversa
<i>SM</i>	<i>Simple Matching Coefficient</i>	
<i>SINEs</i>	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>	
<i>TEs</i>		Elementos transponíveis
<i>Tpase</i>		Transposase

TSD

Target Site Duplication

Duplicação do sítio alvo

UPGMA

Unweighted Pair Group Method Using

Arithmetic Average

RESUMO

O elemento transponível *Galileo* foi encontrado em *Drosophila buzzatii* e é apontado como o responsável pela formação de três inversões descritas para esta espécie: $2j$, $2z^3$ e $2q^7$, através de recombinação ectópica. Análises *in silico* dos 12 genomas de *Drosophila* disponíveis constatou que ele é distribuído no gênero, estando presente também nos genomas de *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. mojavensis*, *D. willistoni*, as quais são reconhecidamente polimórficas, e *D. virilis*. *Drosophila willistoni* destacou-se nestas análises devido à presença de 495 cópias defectivas do elemento transponível *Galileo* encontradas em seu genoma, uma quantidade maior do que nas demais espécies. Estes achados somados com o fato de *D. willistoni* figurar entre as espécies mais polimórficas de *Drosophila* abrem um estimulante campo para os estudos da associação do elemento transponível *Galileo* com seu polimorfismo. O presente estudo analisou através de hibridização *in situ* a presença do elemento transponível *Galileo* nos cromossomos politênicos de três linhagens de *D. willistoni* oriundas de locais distintos da distribuição geográfica da espécie: Gd-H4-1 (América Central), a linhagem utilizada no sequenciamento; WIP-4 (nordeste do Brasil) e 17A2 (sul do Brasil), e estabeleceu as coincidências de inserções deste elemento com pontos de quebra descritos para a espécie e as coincidências com sítios de inserções do elemento *P*. Para tal, utilizou-se uma sonda com 2441 pb, baseada na maior variante do elemento transponível *Galileo* encontrada *in silico*, a qual não engloba suas repetições terminais invertidas (*TIRs*), portanto somente hibridiza com cópias mais completas do elemento. Nossas análises encontraram 100 sítios de inserções do elemento transponível *Galileo* distribuídos em todos os cromossomos de *D. willistoni*. Destes, 20 coincidem com pontos de quebra para inversões paracêntricas descritas, dois com pontos de quebra de uma rara inversão pericêntrica descrita e 10 com sítios de inserção do elemento *P*. O padrão de distribuição dos sinais de hibridização foi altamente similar entre as três linhagens. Também foram encontrados sinais de hibridizações nos cromocentros das linhagens analisadas. Associações estatisticamente significativas de sítios de inserção do elemento transponível *Galileo* com pontos de quebra ocorreram nos braços cromossômicos XR e IIL em

Gd-H4-1 e IIL em WIP-4. Quando o reuso (compartilhamento) dos pontos de quebras para as diferentes inversões foi considerado, o cromossomo III também apresentou associações estatisticamente significativas em Gd-H4-1 e WIP-4. As análises quanto à distribuição geográfica das inversões mostrou que houve maior coincidência de sítios de inserções do elemento transponível *Galileo* que correspondem a pontos de quebra de inversões com distribuição restrita, ou seja, provavelmente mais recentes na história evolutiva da espécie. Com base em nossos resultados, é possível inferir que o elemento transponível *Galileo* é um elemento transponível antigo no genoma de *Drosophila willistoni*, e que a sua maior prevalência com pontos de quebra de inversões mais recentes pode estar associada à sua característica de formar estruturas secundárias quando desnaturado e assim promover rearranjos cromossômicos, mesmo se tratando de uma cópia defectiva.

ABSTRACT

The *Galileo* transposable element was discovered in *Drosophila buzzatii* and was appointed as responsible for the formation of three chromosomal inversions: $2j$, $2z^3$ e $2q^7$ by ectopic recombination. *In silico* analyses of the 12 *Drosophila* genomes available showed that it is widely distributed in the genus, being present in the genomes of *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. mojavensis*, *D. willistoni*, recognized as chromosomally polymorphic, and in *D. virilis*. *Drosophila willistoni* was particularly interesting among the others, because of the finding of 495 defective copies of the *Galileo* transposable element in its genome, the highest amount found among all the studied species. Those results, and the fact that *D. willistoni* is one of the most polymorphic species of *Drosophila*, opened a stimulating field of study for the probable relationship between the *Galileo* transposable element and its chromosomal polymorphism. In the present study we analyzed the presence and the polytene chromosomal localization of the *Galileo* transposable element in three strains of *D. willistoni* from different geographical origins, through *in situ* hybridization: Gd-H4-1 (from Guadaloupe Island, Central America), the strain sequenced; WIP-4 (from Northeast Brazil) and 17A2 (from South Brazil), and detected coincidences of the *Galileo* transposable element insertion sites with break points of inversions known in this species and with sites of *P* element insertions. For this, we used a 2441 pb probe, drawn according to the larger variant of the *Galileo* transposable element found *in silico*, not including its inverted terminal repetitions (*TIRs*), thus only hybridizing with more complete copies of the element. We registered 100 sites of the *Galileo* transposable element insertions, distributed in all chromosomes of *Drosophila willistoni*. Among them, 20 coincide with break points of described paracentric inversions, two with those of a rare pericentric inversion and 10 with insertion sites of the *P* transposable element. The pattern of distribution of the hybridization signals was highly similar among the three strains. We also found hybridization signals in the chromocenters of all the strains analyzed. Statistically significant associations between insertion sites of the *Galileo* transposable element insertions with break points of inversions were detected in the chromosomal arms XR and IIL in Gd-H4-1 and IIL in WIP-4

samples. When the reuse (sharing) of the break points of different inversions was evaluated, we observed significant associations in the data of the third chromosome (III) of the Gd-H4-1 and WIP-4 samples. The analyses of the geographical distribution of the inversions showed higher coincidences of the *Galileo* transposable element insertions and break points of inversions with narrower distribution, i.e., apparently more recent in the evolutionary history of the species. Considering all our findings, we suggest *Galileo* as an ancient transposable element in the genome of *D. willistoni*, and that its apparent preference for break points of more recent inversions, can be due to its molecular characteristic of forming secondary structures when denatured, so promoting chromosomal rearrangements, even if it is a defective copy.

CAPÍTULO I

Introdução

Rearranjos cromossômicos: um capítulo na história da vida

De acordo com Merrell (1981), rearranjos cromossômicos envolvem a perda (deleção), o ganho (duplicação) e rearranjos de fragmentos, seguindo a quebra cromossômica e a reunião das partes. Atualmente, sabe-se que rearranjos cromossômicos também podem ser criados por recombinação ectópica entre sequências repetidas de DNA presentes em diferentes sítios ao longo do cromossomo (Krimbas & Powell, 1992; Hartl & Jones, 2009).

Muitas alterações cromossômicas levam a anormalidades no funcionamento da célula e do organismo, havendo dois motivos básicos para que isto ocorra. O primeiro é que as alterações cromossômicas podem resultar em número e posição anormal de genes. Segundo, se a mutação cromossômica incluir a quebra de um cromossomo (que no geral ocorre), esta poderá ocorrer em alguma parte de um gene, podendo assim perturbar seu funcionamento (Griffithis *et al.*, 2002).

A grande maioria das diferenças visíveis entre os cariótipos de diferentes espécies, e entre indivíduos de uma mesma espécie cromossomicamente polimórfica, são devidas aos rearranjos cromossômicos que ocorreram no passado remoto ou mais recente das mesmas (White, 1977).

Faria & Navarro (2010) destacam dois modelos de especiação cromossômica:

O modelo dos “híbridos estéreis”, onde indivíduos heterozigotos para rearranjos cromossômicos são parcialmente ou totalmente estéreis. Neste modelo, os rearranjos cromossômicos não são vantajosos (*underdominance*), podendo agir como barreira ao fluxo gênico entre populações com diferentes rearranjos fixados. Porém, ele é inconsistente; pois por um lado, é improvável que

rearranjos cromossômicos fortemente desvantajosos se tornem fixos. Por outro lado, se a desvantagem dos rearranjos é fraca ou suficiente para fixá-lo, eles não vão constituir fortes barreiras ao fluxo gênico e, conseqüentemente, não são susceptíveis de causar especiação.

Já o modelo de “supressão da recombinação” propõe que a redução da recombinação entre cromossomos portando diferentes rearranjos é o fator determinante para a especiação. Isto significa, conforme Kirkpatrick & Barton (2006), que as forças evolutivas agindo em diferentes rearranjos cromossômicos podem ser muito mais fortes do que aquelas que ocorrem em outros modificadores desvinculados de recombinação.

Um tipo importante de alteração cromossômica é a inversão. Esta variante origina-se de duas quebras e um posterior giro de 180° de uma porção em uma das fitas do DNA nos cromossomos. Ao contrário das deleções e das duplicações, as inversões não alteram a quantidade geral do material genético, portanto as inversões podem ser mais viáveis (a não ser que ocorram dentro de um gene com função essencial) e não apresentam anomalias no nível fenotípico (Griffithis *et al.*, 2002). Elas podem ser visualizadas em estado heterozigoto ou homozigoto e podem ser de dois tipos: paracêntricas (as quais não envolvem o centrômero na formação da inversão, ocorrendo no mesmo braço cromossômico) e pericêntricas (as quais envolvem o centrômero e mais de um braço cromossômico) (Hartl & Jones, 2009).

Embora uma inversão heterozigota não cause problemas na mitose, o mesmo pode não ocorrer na meiose. *Crossing over* dentro da alça de uma inversão heterozigota paracêntrica leva à formação de um cromossomo dicêntrico (presença de dois centrômeros) e um fragmento acêntrico (ausência do centrômero), os quais são caracterizados por deleções e duplicações. Já *crossing over* em inversões pericêntricas dão origem a deleções e duplicações (Merrel, 1981), como pode ser visto na Figura 1.

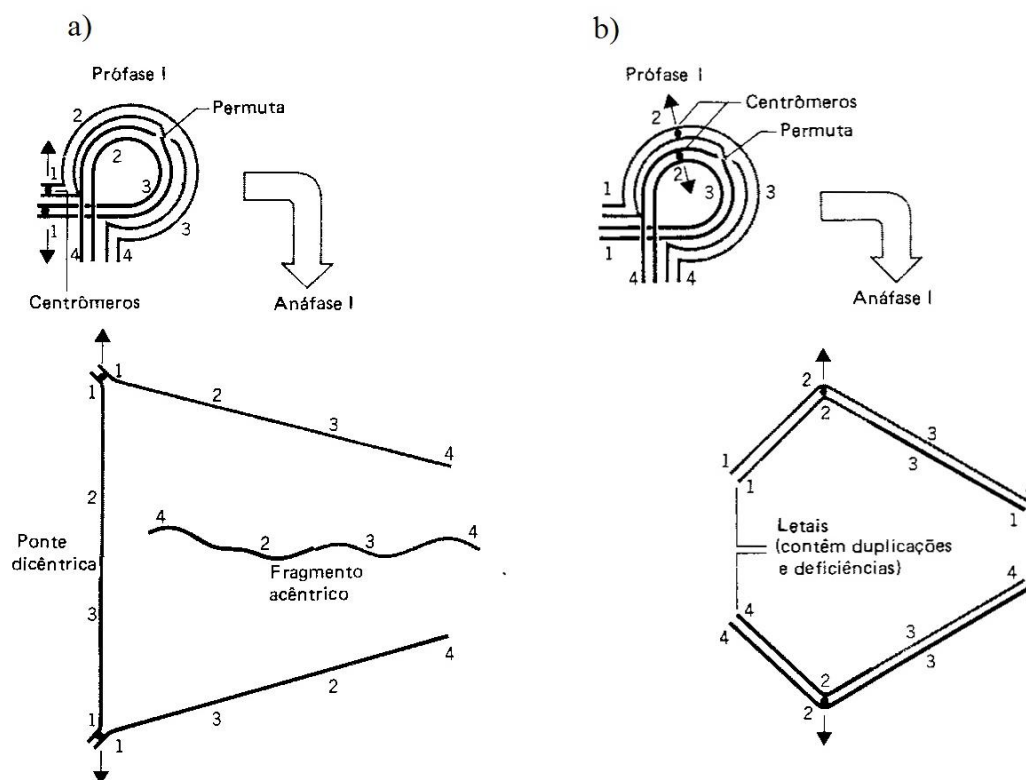


Figura 1: Representação do resultado de um único evento de *crossing over* dentro da alça de uma inversão a) paracêntrica, resultando em um fragmento acêntrico e um cromossomo dicêntrico; b) pericêntrica, resultando em cromossomos com deleções e duplicações. Modificado de Gardner & Snustad (1986).

Apesar dos malefícios característicos das inversões na meiose, muitos organismos as apresentam. Isto pode ser visto em uma gama de estudos com diferentes organismos, tais como em coleópteros (Da Silva *et al.*, 2009), na ordem Cetartiodactyla (Kulemzina *et al.*, 2009), no gênero *Leptodactylus* de anuros (Campos *et al.*, 2009), no gênero *Microtus* de roedores (Lemskaya *et al.*, 2010) e em peixes ciclídeos (Poletto *et al.*, 2010). Estes trabalhos evidenciam a ação das inversões (juntamente com as outras formas de rearranjos cromossômicos) em produzir variabilidade intra-específica e em moldar genomas.

Os mais extensivos estudos em inversões têm sido feitos em *Drosophila*.

Inversões e evolução em *Drosophila*

No gênero *Drosophila* a análise cariotípica é um campo de pesquisa muito forte e embasado, e sua solidificação deve-se principalmente ao uso dos cromossomos politênicos.

Os cromossomos politênicos estão presentes nos núcleos interfásicos das glândulas salivares das larvas, nas células nutidoras dos oócitos (Krimbas & Powell, 1992) e túbulos de Malpighi. Eles são o resultado de um evento de endopoliploidia, onde dois cromossomos homólogos de cada parental permanecem unidos como na meiose e o material genético sofre sucessivos ciclos de replicação sem que ocorra a divisão celular. Isto resulta em uma grande estrutura com bandamento natural (o qual é espécie específico), formado pela sinapse precisa dos cromômeros paralelos entre cada cromátide irmã.

A estrutura física destes cromossomos permite a análise precisa dos diferentes rearranjos cromossômicos em *Drosophila*, destacando-se as inversões, as quais são muito frequentes no gênero. Estas inversões são na sua maioria do tipo paracêntricas.

Mais da metade das espécies de *Drosophila* estudadas em detalhe são naturalmente polimórficas para inversões paracêntricas em um ou mais braços cromossômicos. Isto é altamente incomum pelo simples motivo de que: heterozigotos para tais rearranjos cromossômicos podem apresentar meiose anormal (se houver recombinação dentro da alça de uma inversão), levando pelo menos a alguma redução na fertilidade devido à produção de gametas não funcionais (Powell, 1997).

Entretanto, tais gametas anormais são seletivamente eliminados em fêmeas de *Drosophila* durante a formação do núcleo polar, com os produtos recombinantes de maneira não aleatória sendo relegados às células nutridoras dos oócitos. O núcleo polar funcional, o qual será fecundado, recebe somente cromossomos que não sofreram *crossing over*, os quais podem ser aqueles com a ordem padrão e os com a ordem invertida, enquanto que os recombinantes

formam pontes dicêntricas e fragmentos acêntricos. Porém, se mais de um braço cromossômico é polimórfico, é possível para as fêmeas serem simultaneamente heterozigotas para múltiplas inversões. Sendo assim, se recombinantes ocorrem em mais do um cromossomo segregando de maneira independente, relegar todos os produtos recombinados aos corpúsculos polares dos oócitos torna-se muito mais difícil e alguma esterilidade pode tornar-se associada a esta heterozigosidade múltipla (Sperlich & Pfriem, 1986; Powell, 1997). A presença de muitos casos no gênero *Drosophila* envolvendo múltipla heterozigosidade nos mostra a eficiência deste mecanismo em evitar a produção de gametas desfavoráveis.

Crossing over também não ocorre na espermatogênese da grande maioria das espécies, embora não todas. Sendo assim, machos em geral não sofrem qualquer infertilidade devido a inversões heterozigotas (Powell, 1997). Entretanto, a ocorrência de recombinação na meiose de machos, como documentado para populações naturais de *D. melanogaster* (Hiraizumi, 1971; Hiraizumi *et al.*, 1973; Woodruff & Thompson Jr, 1977), *D. willistoni* (Battaglia & Birch, 1956; França & Da Cunha, 1968; França *et al.*, 1968; Colares *et al.*, 2004) e *D. ananassae* (Kikkawa, 1938; Moriwaki, 1940; Matsuda *et al.*, 1983; Goñi *et al.*, 2006) sugere outras formas de controle da recombinação nessas espécies, todas altamente polimórficas.

Com a recombinação podendo ser suprimida dentro da alça de uma inversão, combinações neutras ou favoráveis (adaptativas) de genes podem ser mantidas indefinidamente (Price, 1997). Análises do efeito das inversões no *crossing over* foram feitas por Steinberg & Fraser (1944), Novitski & Braver (1954), em *D. melanogaster*, Dobzhansky & Epling (1948) em *D. pseudoobscura* e Carson (1953) em *D. robusta*.

Outros trabalhos analisaram as inversões paracêntricas em diferentes espécies de *Drosophila*, abrangendo os mais variados enfoques (clima, disponibilidade de nicho, gradientes altitudinais e latitudinais, sazonalidade, entre outros) como causadores de variações no polimorfismo. Estes trabalhos evidenciaram que as inversões, na sua grande maioria, conferem maior adaptação aos indivíduos que os portam.

De acordo com a revisão de Balanyà *et al.* (2009), o polimorfismo cromossômico de *D. subobscura* uma espécie Paleártica amplamente disseminada no continente americano, está associado a variáveis climáticas de forma adaptativa. As análises cromossômicas de populações da América do Norte e do Sul logo após sua descoberta nestas regiões na década de 80 mostraram correlações estatisticamente significativas entre a frequência de arranjos cromossômico e a latitude. A partir de então, uma série de estudos deste tipo foram feitos tanto na região Paleártica quanto no continente americano. De uma maneira geral, se observou no decorrer dos anos um aumento na frequência de polimorfismos associados a baixas latitudes (ou seja, regiões mais quentes) e decréscimo dos polimorfismos tradicionalmente associados a latitudes mais altas (regiões mais frias) em todas as amostras. Os autores inferem que o polimorfismo cromossômico de *D. subobscura* está mudando conforme o clima em ambas suas áreas de distribuição original e colonizada. Embora o mecanismo subjacente a estas alterações ainda não sejam bem entendidos, este sistema proporciona uma poderosa micro ferramenta evolutiva para monitorar o impacto genético do aquecimento global sobre as populações naturais.

Drosophila melanogaster é uma espécie cosmopolita e polimórfica. Quatro de suas inversões paracêntricas acompanham sua ampla distribuição geográfica: *In(2L)t*, *In(2R)A7S*, *In(3L)P* e *In(3R)P*. Diversos estudos têm demonstrado que estas inversões apresentam um padrão clinal em relação à altitude na Ásia, América do Norte e Austrália, com suas frequências aumentando do Sul em direção ao Equador (Watanabe, 1967; Mettler *et al.*, 1977; Stalker, 1980; Knibb *et al.*, 1981; Inoue *et al.*, 1984; Singh & Das, 1992; Aulard *et al.*, 2002). A ação da seleção é inferida nestes trabalhos, como mantenedora destes polimorfismos, provavelmente associados com médias anuais de temperaturas máximas e médias e precipitação média destes locais.

Variações no polimorfismo cromossômico também foram analisadas nos trabalhos com *D. pseudoobscura* (Dobzhansky & Sturtevant, 1938; Dobzhansky, 1943; Dobzhansky & Epling, 1944; revisão em Anderson *et al.*, 1991), grupo da *D. willistoni* (Dobzhansky & Pavan, 1950; Da Cunha *et al.*, 1950; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Dobzhansky & Pavlovsky, 1962; Kastriasis, 1966; De Souza *et*

al., 1970; Valente & Morales, 1985; Valente & Araújo, 1985; 1986; Valente *et al.*, 1993; Santos & Valente 1990; Valiati & Valente, 1997); *D. robusta* (Carson & Stalker, 1947; Carson & Stalker, 1949; Levitan, 1951); espécies ocorrentes no Chile e associadas às flores (Brncic, 1957; 1958; 1966), *D. ananassae* (Singh, 1974; 1982; 1996; 1998), entre outros.

Dobzhansky (1970) estabeleceu uma hipótese para explicar a alta heterozigosidade encontrada no gênero *Drosophila*. O maior efeito da heterozigosidade é que a recombinação é efetivamente suprimida nos cromossomos heterozigotos para uma inversão. Deste modo, a recombinação gênica pode ocorrer livremente nas inversões homozigotas, mas é bloqueada nas inversões heterozigotas; e assim, a seleção natural pode agir de modo a preservar complexos de genes favoráveis. Portanto, complexos de genes ligados em uma inversão nos diferentes tipos cromossômicos são herdados como blocos e raramente são corrompidos por *crossing over*. Onde estes complexos de genes de diferentes inversões interagem favoravelmente, eles são ditos ser coadaptados (revisão em Merrel, 1981)

Em contraste com a vasta predominância das inversões paracêntricas, as inversões pericêntricas em *Drosophila* são raras em populações naturais. Enquanto que para inversões paracêntricas ocorre um mecanismo de proteção que desfavorece os gametas inviáveis, para este tipo de inversão nenhum mecanismo de proteção é conhecido. A falta de um mecanismo de proteção eficaz provavelmente é um fator determinante da sua raridade, já que um evento de *crossing over* na região invertida de uma inversão pericêntrica pode acarretar a perda de mais de 50% da prole. Os organismos que exploram com sucesso este tipo de inversão, geralmente apresentam associada à inversão pericêntrica uma inversão paracêntrica (Hinton & Downs, 1975).

***Drosophila willistoni*: uma das espécies mais polimórficas do gênero**

Drosophila willistoni é uma espécie dominante em florestas úmidas (Sene *et al.*, 1980; Araújo & Valente, 1981; Martins, 1987, 2001) e muito versátil ecologicamente (Burla *et al.*, 1950; Valente & Araújo, 1986). Esta espécie pertence ao grupo *willistoni* do subgênero *Sophophora* o qual é constituído virtualmente por 23 espécies, as quais apresentam distribuição geográfica essencialmente neotropical e estão divididas em três subgrupos (revisão em Val *et al.*, 1981; Bächli, 2010).

O subgrupo *willistoni* de *Drosophila* é constituído por seis espécies crípticas (morfologicamente muito semelhantes): *D. willistoni*, *D. paulistorum*, constituída por seis semi-espécies; *D. tropicalis*, *D. equinoxialis*, *D. pavlovskiana* e *D. insularis* (provável ancestral que deu origem a todo o subgrupo (Rohde *et al.*, 2006; Robe *et al.*, 2010). Ocorrem ainda outros dois subgrupos de espécies crípticas e não crípticas: subgrupo *bocainensis*, com 12 espécies; e subgrupo *alagitans* com cinco espécies.

O cariótipo básico da *D. willistoni* é constituído por dois pares de cromossomos metacêntricos (o par sexual e o segundo cromossomo) e um par acrocêntrico (terceiro cromossomo) (Metz 1916, Sturtevant & Novitski 1941, Dobzhanski, 1950; Patterson & Stone 1952). A nomenclatura dos cromossomos politênicos correspondentes, definidos por Dobzhansky (1950) é: XL e XR (braço direito e esquerdo do cromossomo X), IIL e IIR (braço esquerdo e direito do segundo cromossomo) e III (o cromossomo acrocêntrico).

Drosophila willistoni sob o ponto de vista cromossômico é a mais polimórfica do grupo *willistoni* (revisões em Ehrman & Powell, 1982; Krimbas & Powell, 1992, Da Cunha *et al.*, 1950; Townsend, 1952; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Da Cunha, 1955; Da Cunha *et al.*, 1959; Valente & Morales, 1985; Valente & Araújo, 1985, 1986; Santos & Valente 1990; Valente *et al.*; 1993; Regner & Valente, 1993, Valente *et al.*, 2001).

Drosophila willistoni também figura entre as espécies mais polimórficas do gênero, como pode ser visto na Figura 2, onde é mostrado o mapa cromossômico da espécie, desenhado em câmara clara por Dobzhansky (1950). Sobre este

mapa, Regner (1992) estabeleceu os pontos de quebra de todas as inversões paracêntricas já descritas. Sendo assim, é possível perceber que *D. willistoni* apresenta, em todos os seus braços cromossômicos, considerável número de inversões paracêntricas (desde nove inversões no braço XR e IIR até 28 no cromossomo III). Somando a esta compilação uma nova inversão descrita por Valente *et al.* (2001) após análises de populações do Uruguai (inversão XR-B1), até então tem-se em torno de 70 inversões paracêntricas devidamente descritas para a espécie.

Até pouco tempo atrás, a descrição dos pontos de quebra de inversões paracêntricas em *D. willistoni* era bastante confusa, baseada somente em citações acompanhadas de desenhos pouco precisos das alças detectadas nos núcleos politênicos. O mapa cromossômico inicial feito por Dobzhansky (1950) estabelecia somente as seções (conjuntos de bandas visíveis) e dessa forma, a notação dos rearranjos era imprecisa. Algumas inversões tidas como distintas tratavam-se de uma única inversão e estes erros eram devido, em grande parte, à falta de melhor exatidão no estabelecimento dos pontos de quebra. Outros trabalhos apenas comentam sobre novas inversões, sem a descrição dos seus pontos de quebra aproximados. A primeira tentativa em estabelecer mais precisamente os pontos de quebra das inversões de *D. willistoni* foi feita por Valente & Morales (1985), onde as autoras apontam no mapa cromossômico aprimorado pelas mesmas, os pontos de quebra de 46 inversões heterozigotas encontradas nas análises de indivíduos coletados no Parque Estadual de Itapuã e na Floresta Nacional do Turvo no Rio Grande do Sul (Brasil). Subsequentemente, o primeiro fotomapa de *D. willistoni* foi estabelecido por Regner *et al.* (1996), onde as seções foram mantidas de acordo com Dobzhansky (1950). Atualmente há outro fotomapa aprimorado por membros do nosso grupo de pesquisa (Schaeffer *et al.*, 2008), o qual foi subdividido em seções e também em subseções (número menor de bandas), a fim de tornar mais precisa as análises que fazem uso destes dados. Nosso grupo de pesquisa já possui estudos em andamento a fim de preencher a lacuna quanto a um melhor estabelecimento dos pontos de quebra das inversões de *D. willistoni*.

O quadro geral que é visualizado nos trabalhos que analisaram o polimorfismo cromossômico de *D. willistoni* (Da Cunha *et al.*, 1950; Townsend, 1952; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Da Cunha *et al.*, 1959) é a presença de maiores frequências de inversões e maior polimorfismo ocorrendo em populações próximas ao centro da distribuição da espécie, que se estende desde a Flórida até a Argentina (Bächli, 2010). Nestas áreas, fêmeas analisadas apresentavam até nove inversões. Este polimorfismo apresenta uma tendência a decrescer em direção aos limites marginais Norte e Sul da distribuição.

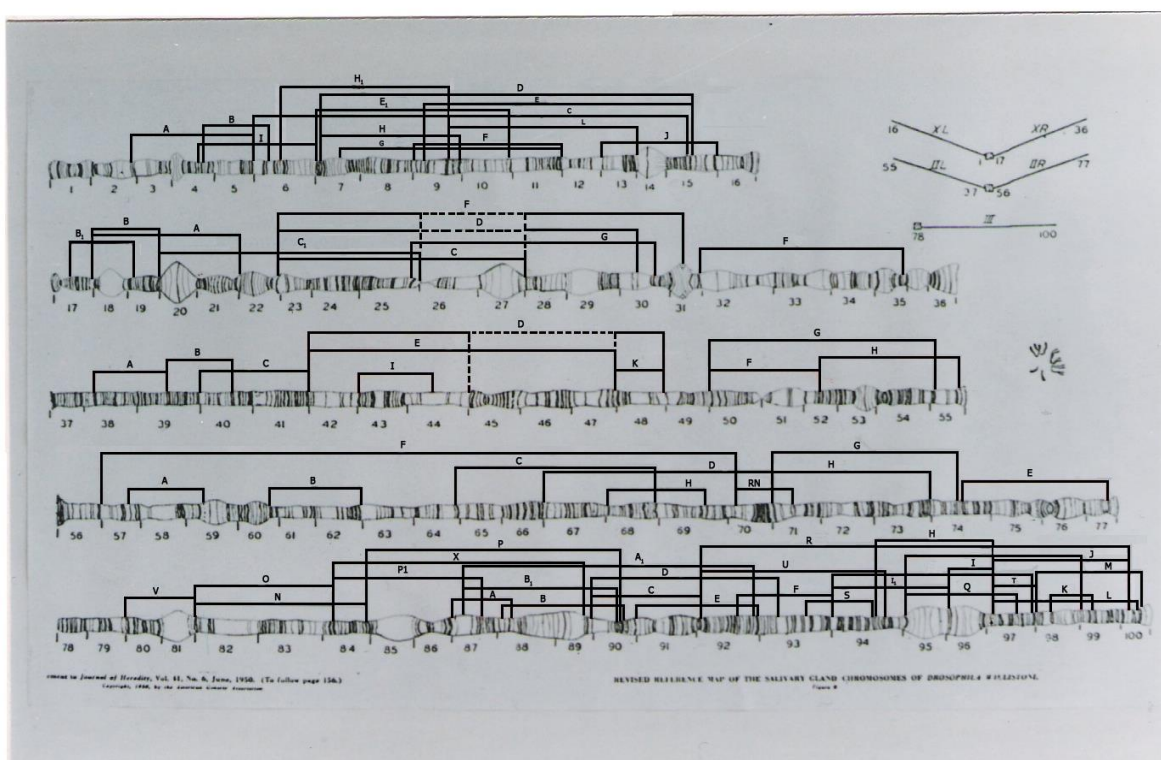


Figura 2: Mapa cromossômico de *Drosophila willistoni* desenhado em câmara clara por Dobzhansky (1950) onde estão indicados os pontos de quebra das inversões paracêntricas descritas na literatura. Modificado de Regner (2002).

A hipótese sugerida por Da Cunha *et al.* (1950) para explicar a ampla variação geográfica das frequências de inversões heterozigotas encontradas em *D. willistoni* é que a quantidade de polimorfismo em uma população tende a ser proporcional à variedade de habitats (nicho ecológico) que as populações

exploram nos territórios que elas ocupam. Sendo assim, populações que exploram uma maior quantidade de nichos são mais polimórficas. Da Cunha & Dobzhansky (1954) e Da Cunha *et al.* (1959) mostraram uma correlação positiva entre complexidade do ambiente e heterozigosidade de *D. willistoni* em diferentes locais da distribuição geográfica da espécie analisados.

Estudos mais recentes de populações de diferentes locais do Rio Grande do Sul (Brasil) e Uruguai concordam com o baixo polimorfismo encontrado por indivíduo nestes pontos mais extremos da distribuição da espécie. Porém o nível de heterozigosidade considerando as populações não é baixo como esperado de acordo com os estudos anteriores, até mesmo em locais mais urbanizados (Valente & Morales, 1985; Valente & Araújo, 1985, 1986; Santos & Valente 1990; Valente *et al.*; 1993; Regner & Valente, 1993, Valente *et al.*, 2001).

Em 2006, diversos centros de pesquisa uniram esforços para o sequenciamento de mais 10 genomas de espécies do gênero *Drosophila*, que até então dispunha dos genomas de *D. melanogaster* (Adam *et al.*, 2000), e *D. pseudoobscura* (Richards *et al.*, 2005). Uma das espécies contempladas neste estudo, pela sua importância, foi a *D. willistoni*, a única espécie neotropical. Para o sequenciamento do seu genoma, foi escolhida uma linhagem oriunda do Caribe (Gd-H4-1), propositalmente endocruzada para amenizar o efeito do alto polimorfismo (Clark *et al.*, 2007).

Estudos recentes baseados na análise dos genomas disponíveis evidenciaram diversas peculiaridades referentes à *D. willistoni*.

Muitos atributos dos genomas do gênero *Drosophila* são consideravelmente conservados entre as espécies. Tamanho total do genoma, número de genes, distribuição de elementos transponíveis e padrão de uso de códon são muito similares entre os 12 genomas, embora *D. willistoni* seja uma exceção em muitos critérios. Esta espécie apresentou o maior conteúdo de genes codificantes entre as demais (65,4 Mb), a maior proporção de íntrons (23,5 Mb) e o maior conteúdo de tRNA, com 484 genes de tRNA anotados. *Drosophila willistoni* também é a segunda espécie com maior número de sequências repetitivas (incluindo aqui elementos transponíveis) e virtualmente sem a

presença de tRNA para selenoproteína (Clark *et al.*, 2007; Chapple & Guigó, 2008).

Vicario *et al.* (2007) analisaram o uso tendencioso de códons no genoma das 12 espécies. Neste estudo os autores encontraram duas generalidades no gênero: primeiro, o conjunto de códons preferenciais é muito constante em *Drosophila*. Segundo, na maioria dos casos, os códons preferenciais em todas as espécies são aqueles com G e especialmente C na terceira posição. Isto é, geralmente em *Drosophila*, o uso enviesado de códons é para aqueles que terminam com C/G. A única exceção presente no trabalho foi *D. willistoni*, que apresentou o menor nível de uso tendencioso de códons, com preferências por códons que terminam em A/T.

Schaeffer *et al.* (2008) estabeleceram o mapa genômico das 12 espécies de *Drosophila* sequenciadas de acordo com o mapa cromossômico correspondente destas espécies. O mapa genômico de *D. willistoni* foi construído baseado no mapa genético de Spassky & Dobzhansky (1950) e também na localização *in situ* dos genes *CuZu Sod* (Rohde *et al.*, 1994), *Alcohol dehydrogenase (Adh)* (Rohde *et al.*, 1995), *Hsp 8*, *Hsr-omega*, *Hsp 27*, *Ubi*, *BRC*, *E74*, *E75*, *71E* e *Sgs5* (Rieger, 1999), de nosso grupo de pesquisa. O sequenciamento do genoma e a construção do mapa genômico de *D. willistoni*, cujas sequencias puderam ser ancoradas em um preciso mapa cromossômico foram ganhos muito valiosos para a pesquisa nesta espécie, pois permitirá análises detalhadas do genoma, bem como dos pontos de quebra das inversões.

Já o trabalho de Bhutkar *et al.* (2008) analisou a informação obtida dos mapas genômicos através de algoritmos elaborados especialmente para este fim. Destas análises, ficou claro que *D. willistoni* apresentou as taxas de rearranjos gênicos mais elevadas entre as espécies sequenciadas.

O vasto polimorfismo cromossômico e as demais peculiaridades de *D. willistoni* são, pois, provas irrefutáveis de que esta espécie é um excelente organismo modelo para estudos de diferentes áreas do saber, em especial Evolução.

Pontos de quebra das inversões: origem e distribuição

O estabelecimento de uma inversão em um estado polimórfico ou fixado requer circunstâncias pouco comuns, as quais são raramente encontradas na natureza. Sendo assim, a grande maioria das inversões recém surgidas em um organismo, não se estabelecem. As inversões observadas no presente momento são apenas uma amostra de eventos que originalmente ocorreram na história do organismo (Dobzhansky, 1949; revisões em Sperlich & Pfriem, 1986; Powell, 1997).

Em 1936, Sturtevant & Dobzhansky propuseram um método para a construção de filogenias baseado na análise de tríades de inversões nos cromossomos politênicos (no caso *D. pseudoobscura*), levando em consideração que cada inversão possui uma origem única. Sendo assim, todas as cópias de um arranjo gênico em particular existente em uma população (ou em populações da mesma espécie ou de espécies diferentes) são monofiléticas. Esta premissa fez parte da formulação do ponto de vista tradicional para a origem de uma inversão.

O ponto de vista tradicional para a origem de uma inversão considera que esta se origina por duas quebras distintas, independentes e simultâneas no cromossomo e posterior religação das partes finais em uma orientação invertida. Sendo assim, a geração de inversões sobrepostas ocorre sequencialmente e não por múltiplas quebra simultâneas. Da mesma maneira, para inversões lado a lado (*in tandem*), o compartilhamento de um ponto de quebra é devido a dois eventos independentes no tempo (Krimbas & Powell, 1992).

Estudos estimando as taxas de surgimento de alterações cromossômicas (principalmente inversões) foram realizados por Yamaguchi & Mukai (1974). Analisando o cromossomo II de cinco linhagens (*CH*, *PQ*, *RT*, *AW* e *JH*) de *D. melanogaster* (cada uma portando características gênicas diferentes), após mais de 7.000 gerações, em três das linhagens (*CH*, *PQ*, *RT*) não foi encontrada nenhuma forma de alteração. A linhagem *AW*, após mais de 4.000 gerações, apresentou 19 inversões e uma translocação, e uma taxa de 0,00041

inversões/IIcromossomo/geração. A linhagem *JH*, após mais de 4.000 gerações apresentou 89 inversões das quais seis eram pericêntricas, duas translocações e uma transposição, e uma taxa de 0,000128 inversões/IIcromossomo/geração. Em relação à distribuição dos pontos de quebras das inversões surgidas, os autores inferem que são estatisticamente não aleatórias. Outra importante inferência deste estudo é a de que estas alterações cromossômicas seriam causadas por agentes mutantes tais como as sequências *mu-F*, *hi* e provavelmente elemento *P*. Estudo semelhante foi feito por Yamaguchi *et al.* (1976), os quais também encontraram não aleatoriedade na distribuição dos pontos de quebra de inversões em linhagens de *D. melanogaster*.

De acordo com Powell (1997), poderia se esperar que o total de inversões encontradas no gênero *Drosophila*, ou em algum subgênero do mesmo, apresentasse uma distribuição de Poisson. No entanto, não é o que se tem constatado nos diversos estudos sobre polimorfismo cromossômico, e esta não aleatoriedade é devida a um excesso de espécies com considerável polimorfismo e um número bem menor com pouco polimorfismo. O mesmo se aplica à distribuição nos braços cromossômicos, onde todos os braços cromossômicos são polimórficos em algumas espécies e em outras apenas um braço ou um cromossomo o são.

A distribuição dos pontos de quebra considerando a posição ao longo do cromossomo também é aparentemente não aleatória em *Drosophila*, com as regiões mais próximas ao centrômero apresentando maior número de quebras (revisão em Krimbas & Powell, 1992).

Mather (1963) analisando o polimorfismo em *D. rubida*, constatou que as inversões eram confinadas aos cromossomos II e III e dentro destes havia um considerável agrupamento das inversões, ressaltando com isso a recorrência das quebras nestes cromossomos e a não aleatoriedade das mesmas. Olvera *et al.* (1979) analisaram 34 arranjos segregantes no III braço cromossômico em *D. pseudoobscura* e inferiram que a distribuição dos pontos de quebra ao longo deste cromossomo pode ser considerada ao acaso. Cáceres *et al.* (1997) analisaram 48 inversões paracêntricas descritas para as espécies do complexo da *D. buzzatii* e também 18 inversões induzidas por introgressão em *D. buzzatii* e

constatarem que as inversões que apresentam maior sucesso para a fixação nas espécies são as de tamanho intermediário, e que a distribuição dos pontos de quebra das inversões, levando em consideração a localização da banda envolvida na quebra não é aleatória, encontrando, em certos segmentos cromossômicos, até oito pontos de quebra na mesma banda. Considerando a ocorrência de mais de uma inversão utilizando a mesma banda cromossômica como ponto de quebra, *D. willistoni* possui considerável polimorfismo em todos seus braços cromossômicos, e também apresenta recorrência em alguns pontos para quebra de inversões, indicando não aleatoriedade (Da Cunha *et al.*, 1950; Valente & Morales, 1985).

A presença constante de estudos evidenciando a ocorrência de repetidas quebras no mesmo local para diferentes inversões em uma quantidade considerável de espécies gera dúvidas quanto à aleatoriedade da distribuição dos pontos de quebra. Estes locais, os quais apresentam esta recorrência, são chamados “hotspots”.

Evidências para o agrupamento de pontos de quebra utilizando os mesmos sítios também foram dadas para o mosquito *Anopheles* (Coluzzi *et al.*, 2002) e mamíferos (Pevzner & Tesler, 2003; Murphy *et al.*, 2005).

Recentemente Pevzner & Tesler (2003) denominaram este fenômeno como reuso. O reuso, ou seja, um ponto de quebra sendo utilizado por mais de uma inversão diferente, é o principal sinal para particularidades nestas regiões que podem favorecer a quebra, seja devido às características do local, ou à presença de sequências específicas como os elementos transponíveis (Pevzner & Tesler, 2003; Eichler & Sankoff, 2003; Murphy *et al.*, 2005; González *et al.*, 2007).

Butkar *et al.* (2008) testaram diferentes abordagens quanto ao reuso de pontos de quebra no gênero *Drosophila* utilizando os genomas das 12 espécies sequenciados. A primeira abordagem questionava se os valores de reuso de pontos de quebra observados estavam dentro dos valores esperados quando pontos de quebra são introduzidos por eventos independentes (eventos Poisson). Para isto foram simulados n eventos de inversões. Para todas as simulações, o valor de reuso observado foi significativamente maior do que o esperado em um modelo que assume todos os sítios serem livres para quebrar, considerando uma

distribuição uniforme. Isso sugere que quebras nas fitas duplas não são introduzidas como eventos independentes neste modelo simples e que algumas sequências não-codificadoras são pontos quentes ou frios para rearranjar. A segunda abordagem testou justamente estes pontos quentes ou frios para a quebra. Os mesmos n eventos de inversões foram permitidos, porém certos sítios cromossômicos foram previamente assumidos como pontos quentes para rearranjar. O modelo para quebra cromossômica com pontos quentes foi rejeitado como uma explicação para os valores de reuso observados em 16 das 105 comparações. Doze dos 16 processos rejeitaram o modelo de pontos quentes porque o reuso foi maior que o esperado. Todos esses casos tendiam a envolver comparações do componente de Muller A (Muller, 1940), que corresponde ao cromossomo X, tendendo a comparar as espécies entre as linhagens de *Sophophora* e *Drosophila*, ou tendendo a comparar *D. willistoni* com outras espécies. Em quatro dos 16 casos, foi rejeitado o modelo de pontos quentes porque o reuso dos pontos de quebra foi menor que o esperado. Essas deficiências no reuso foram encontradas nas comparações dos elementos de Muller C, D e E em espécies estreitamente relacionadas. Já a terceira abordagem relacionou a probabilidade de uma quebra com o comprimento da sequência do ponto de quebra. Quanto maior esta sequência, maior a chance de quebrar nesta mesma região. Porém, as comparações feitas falharam em evidenciar que o comprimento do ponto de quebra afeta o reuso.

Apesar dos esforços em compreender o que efetivamente origina uma inversão, muito permanece não esclarecido. Nas últimas décadas um campo crescente de evidências aponta os elementos transponíveis como agentes de quebra cromossômica (Engels & Preston, 1984; Lyttle & Haymer, 1992; Kusakabe *et al.*, 1990; Regner *et al.*, 1996; Cáceres *et al.* 1999, 2001; Casals *et al.*, 2003; Delprat *et al.*, 2009).

Elementos transponíveis

Elementos transponíveis (*TEs*) são unidades genéticas que apresentam ampla diversidade em sua estrutura e mecanismos de transposição. Eles ocupam uma grande parte dos genomas eucarióticos e sua circulação e acumulação representam uma força importante capaz de moldar os genes e os genomas dos organismos que os portam (Capy *et al.*, 1998; Feschotte & Pritham, 2007; Wicker *et al.*, 2007). Eles têm sido encontrados virtualmente em todos os eucariotos, com exceção de *Plasmodium falciparum* (Wicker *et al.*, 2007).

De acordo com a classificação clássica proposta por Finnegan (1989), os elementos transponíveis podem ser atribuídos a duas principais classes, conforme seu mecanismo de transposição. Elementos de classe I, os quais codificam uma transcriptase reversa (*RT*) e seu modo de transposição denominado “copiar e colar” utiliza um intermediário de RNA. Elementos de classe II, transposons propriamente ditos, utilizam um intermediário de DNA para transposição, com seu mecanismo de transposição comumente chamado “cortar e colar”. Elementos autônomos e não autônomos são encontrados em muitas famílias de ambas as classes (Kidwell, 2005).

Conforme classificação proposta por Capy *et al.* (1998), elementos de Classe I são retroelementos que incluem os retrotransposons e os retrovírus. Eles são amplificados pelo processo de transposição e têm um grande potencial de aumento em número de cópias. A grande maioria pode ser atribuída a duas subclasses; aos *LTRs*- retrotransposons (*Long Terminal Repeats*) e aos não *LTRs*-retrotransposons (ou retroposons), com ausência de repetições terminais. Esta última sub-classe divide-se em *LINEs* (*Long Interspersed Nuclear Elements*) e *SINEs* (*Short Interspersed Nuclear Elements*). Subsequentemente, foi reconhecido um terceiro clado filogeneticamente distinto tanto dos *LTRs* quanto dos não *LTRs*-retrotransposons. São os elementos tipo-*Penelope*, presentes em espécies do grupo da *Drosophila virilis* (Evgen'ev *et al.*, 1997; 2000; Evgen'ev & Arkhipova, 2005) (Kidwell, 2005).

Elementos de classe II são divididos em três principais subclasses: a) elementos que se transpõe via um mecanismo de copiar e colar e cujas

transposases apresentam em sua estrutura primária uma assinatura DDE (três resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico), exemplificado pelo elemento *mariner* em *Drosophila mauritiana*. b) elementos que transpõem via um mecanismo de copiar e colar, sem a presença de uma assinatura DDE em suas transposases, como os elementos *P* e *hobo* em *Drosophila*. c) elementos que se transpõem utilizando um mecanismo de círculo rolante, como os *Helitrons*, e elementos *Mavericks* (*Politons*), cujo mecanismo de transposição ainda não é bem entendido, mas provavelmente se replica utilizando uma DNA polimerase própria. Os *MITEs* (*Miniature Inverted Repeats Transposable Elements*) também são reconhecidos como membros não autônomos de classe II (Kidwell, 2005).

A família *foldback* (*FB*) pertence à classe II dos elementos transponíveis e foi primeiramente descrita em *D. melanogaster* (Potter *et al.*, 1980), subsequentemente sendo também foram encontrados em outros organismos (Yuan *et al.*, 1991; Rebatchouk & Narita, 1997; Cheng *et al.*, 2000; Windsor & Waddel, 2000).

Transposons *foldback* apresentam organização modular incomum (Figura 3) e existem como famílias estruturalmente diversas (Rebatchouk & Narita, 1997).

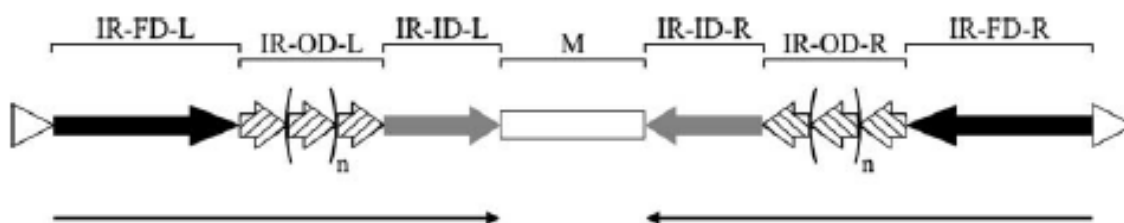


Figura 3: Estrutura esquemática dos elementos *foldback* e seus diferentes domínios. Triângulos abertos representam os sítios alvos duplicados gerados durante a inserção. L e R referem-se aos lados esquerdo e direito do elemento, respectivamente. Setas abaixo do elemento incluem as *IRs* completas. Retirado de Casals *et al.*, (2005); baseado em Rebatchouk & Narita (1997) e Simmen & Bird (2000).

Estes elementos contêm repetições terminais invertidas muito longas (*IRs*), as quais usualmente se estendem ao longo de quase todo o elemento e são

separadas por um domínio central (*M*) de comprimento e composição variáveis. Como consequência desta sua estrutura peculiar, as duas *IRs* quando desnaturadas podem se dobrar e parearem entre si, dando origem a estruturas secundárias muito estáveis, que inspiraram o seu nome (Potter *et al.*, 1980). As *IRs* tem uma organização modular com três domínios possíveis: o domínio mais externo flaqueador (*IR-FD*), o domínio externo (*IR-OD*), que inclui várias repetições imperfeitas *in tandem*, e o domínio interno (*IR-ID*), o qual normalmente contém sequências ricas em AT (Adé & Belzile 1999; Simmen & Bird, 2000).

O mecanismo de transposição dos elementos *foldback* ainda não é bem elucidado, uma vez que a maioria deles não apresenta capacidade de codificar (Yuan *et al.*, 1991; Rebatchouk & Narita, 1997; Adé & Belzile, 1999; Cheng *et al.*, 2000; Simem & Bird, 2000; Casals *et al.*, 2005). Em *D. melanogaster*, a transposição de elementos *FB* depende da presença de uma sequência de 4 kb denominada *NOF*, a qual é encontrada no domínio *M* de aproximadamente 10% dos elementos (Harden & Ashburner 1990, Smith & Corces, 1991). De acordo com Harden & Ashburner (1990) originalmente, talvez, o elemento *NOF* era uma sequência de um transposon autônomo com repetições invertidas muito longas (cerca de 300 pb). Este primeiro elemento pode ter se associado com sequências de *FB* de modo aleatório, vindo depois a perderem a sua autonomia para transposição e se basearem nas sequências de *FB* como alternativa.

Windsor & Waddell (2000) ao caracterizarem a família de elementos *FB FARE* em *Arabidopsis thaliana*, indentificaram um grupo de elementos (*FARE2*), os quais não eram compostos apenas por *IRs*; sendo que esses elementos apresentaram extremidades claramente definidas separadas por uma grande região interna que abriga três hipotéticas sequências codificadoras (*CDSs*). Esta região interna codifica até três proteínas nos elementos mais completos. O produto da *CDS1* é uma proteína e apresenta similaridade com *MURA*, que é uma das duas proteínas codificadas pelo elemento autônomo do milho *MuDR*; e que é apontada como uma transposase. Sendo assim, os autores inferem que *CDSs* podem exercer funções de transposição.

Em nível funcional, elementos *foldback* caracterizam-se pela capacidade de induzir instabilidade genética e recombinação, levando à geração de mutações

espontâneas e rearranjos cromossômicos em *D. melanogaster* (Levis *et al.*, 1982; Bingham & Zachar, 1989; Smith & Corces, 1991). Estes processos parecem ocorrer por recombinação ectópica entre diferentes cópias do elemento (Collins & Rubin, 1984). A capacidade dos elementos *foldback* de mediar esses rearranjos é provavelmente devida à presença de longas *IRs*, as quais têm sido demonstradas como sendo fonte de instabilidade genômica (Zhou *et al.*, 2001). *IRs* possuem a habilidade de formarem estruturas secundárias, que por sua vez, estimulam a produção de quebras em fitas duplas e recombinação (Lobachev *et al.*, 1998; revisão em Casals *et al.*, 2005).

Com o aumento do número de genomas sequenciados, uma maior abundância e diversidade de *TEs* vêm sendo descoberta, requisitando uma classificação ainda mais abrangente. Em vista disso, Wicker *et al.* (2007) propuseram uma nova classificação, onde são incluídos os níveis de classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília, cada uma seguindo os seguintes critérios:

- Classe: segue a classificação anterior, sendo ainda dividida pela presença ou ausência de um intermediário de RNA (Classes I e II).
- Subclasse: antes usada para separar retrotransposons *LTRs*, dos retroposons que não possuem *LTRs* que eram divididos em *LINEs* e *SINEs* na Classe I. Nesta nova classificação são usados para distinguir os *TEs* que se replicam antes de se transpôr, daqueles que levam o sítio doador e o reintegra em outros locais.
- Ordem: marca maiores diferenças no mecanismo de inserção, aumentando a chance de classificação.
- Superfamília: dentro de uma ordem, partilham uma estratégia de replicação, mas são distintos em outras características, tais como a estrutura de proteína e domínios não codificantes. Também diferem quanto à presença e o tamanho da duplicação do sítio alvo (*TSD – Target Site Duplication*), uma pequena repetição direta que é gerada em ambas as extremidades do *TE* inserido na sequência alvo. Uma superfamília bastante estudada em *Drosophila* é superfamília de DNA *P*.
- Família: grupos de *TEs* que têm alta similaridade (80% ou mais) na sequência de DNA de suas regiões codificadoras (se presente), ou do domínio interno, ou em sua região terminal repetida.

- Subfamília: em casos específicos, podem distinguir *TEs* autônomos de não autônomos.

Conforme os autores, estes termos foram escolhidos espelhando-se na classificação filogenética dos organismos, a qual é bastante difundida no meio científico. Também reconhecem o fato de que alguns termos (como superfamília) já são amplamente usados por grupos que trabalham com *TEs*.

Embora os *TEs* tenham sido disseminados como DNA lixo por décadas, eles parecem ser uma fonte significativa de mutações adaptativas em *Drosophila*. *TEs* adaptativos parecem estar mais frequentemente associados a genes envolvidos com resposta a estímulos. A maioria destes *TES* se encontra próximo, mas não dentro das regiões codificadoras de proteínas e parecem afetar a expressão desses genes; sendo assim, os *TEs* estão mais frequentemente envolvidos em mudanças regulatórias do que codificantes (revisão em González & Petrov, 2009).

Elementos Transponíveis e Heterocromatina

A definição de heterocromatina tem sido baseada tradicionalmente em critérios morfológicos (Weiler & Wakimoto, 1995). Heitz (1928) introduziu o termo para se referir às regiões cromossômicas que aparecem profundamente coradas, como corpos compactos ao longo do ciclo celular, inclusive na intérfase. Estas regiões são distintas da eucromatina em nível de microscopia óptica, a qual condensa na metáfase, mas aparecem difusas na intérfase.

Heitz (1934) forneceu evidências iniciais de que as regiões de heterocromatina tinham comportamentos e morfologias distintos. Ele observou que a heterocromatina em núcleos das glândulas salivares coalescem em um único cromocentro e formam dois tipos morfológicamente distinguíveis denominados α -heterocromatina e β -heterocromatina. A α -heterocromatina foi definida como um corpo compacto pequeno no meio do cromocentro. Posteriormente, estudos com hibridização *in situ* mostraram que a α -

heterocromatina é composta em grande parte por sequências satélites (Gall *et al.*, 1971). Já a β -heterocromatina foi definida como o material principal que é semelhante à eucromatina por ser capaz de politenizar e expandir, mas que difere por formar uma malha difusa ao invés de cromômeros bem estruturados. É composta por sequências medianamente repetitivas bem como sequências de cópia única. Pelo menos algumas sequências β -heterocromáticas são transcritas ativamente nos núcleos da glândula salivar (Weiler & Wakimoto, 1995).

De acordo com a revisão de González & Petrov (2009) um conjunto de propriedades distintas, antagônicas em relação ao resto do genoma, têm sido historicamente reconhecido para a heterocromatina em praticamente todos os animais e espécies de plantas: (1) nível de recombinação fortemente reduzido na meiose, (2) baixa densidade de genes, (3) inativação em *cis* da expressão de genes eucromáticos quando estes são movidos a regiões adjacentes à heterocromatina devido a rearranjos cromossômicos, um fenômeno denominado efeito de posição variegação; (4) replicação tardia durante a fase S; (5) inatividade transcricional e (6) riqueza de sequências satélites altamente repetitivas e restos de elementos transponíveis. Juntas, estas propriedades levaram a visualização da heterocromatina como um "deserto" ou um "cemitério" de funções genéticas. Entretanto, nas últimas três décadas, estudos realizados principalmente em *D. melanogaster* demonstraram que a heterocromatina desempenha na verdade, papéis importantes em funções celulares chaves, como a organização de cromossomos, bem como contém genes essenciais para a viabilidade e fertilidade.

Sob a hipótese do DNA egoísta, *TEs* se acumulariam na heterocromatina porque há menos genes nesta região, ou seja, elementos inseridos são menos propensos a serem deletérios. Sob a mesma hipótese, outra interpretação prevê uma cadeia de eventos que começa com a transposição e que termina com o acúmulo na heterocromatina. O primeiro passo é a transposição e consequente aumento do número de exemplares de elementos. Isto aumenta a probabilidade de recombinação na meiose em sítios não-homólogos (recombinação ectópica), que produz rearranjos cromossômicos dando origem a gametas inviáveis. A ação da seleção contra estes rearranjos fará com que estes *TEs* sejam abundantes na

heterocromatina onde a recombinação é fortemente reduzida em comparação com a eucromatina. Sob o ponto de vista de ambas as interpretações acumularem-se na heterocromatina seria consequência da seleção contra os efeitos deletérios na eucromatina trazidas pela instabilidade dos *TEs* quando inseridos nesta (Dimitri & Junakovic, 1999).

Entretanto, a hipótese contrária ao DNA egoísta também é bastante difundida. Uma vez na heterocromatina, elementos podem adquirir um novo papel e tornarem-se sujeitos à seleção positiva. Em *D. melanogaster* elementos *Het-A* e *TART* mantêm a integridade das extremidades cromossômicas (telômeros) (Pardue *et al.*, 2005). Transcritos de diferentes *TEs* na heterocromatina podem ter ação na repressão da transposição em células somáticas e na função de genes relacionados à fertilidade em *Drosophila* (revisão em Dimitri, 1997). Sequências reguladoras de *TEs* podem se tornar uma parte funcional de genes heterocromáticos, similar aos casos deste tipo documentados na eucromatina (McDonald, 1995). Sendo assim, a dinâmica de acumulação dos *TEs* e os papéis que eles podem adquirir dentro da heterocromatina está em desacordo com a visão de que eles são abundantes nesta região devido aos danos que causam. Portanto, o acúmulo de *TEs* na heterocromatina pode vir a ser um aspecto relevante da interação evolutiva entre esses dois componentes do genoma eucariótico (revisão em Dimitri & Junakovic, 1999; Biémont, 2010).

Elementos Transponíveis e Rearranjos cromossômicos

Segundo Ashburner (1989), a existência de *hotspots* deve ser consequência de uma falha estrutural nos cromossomos, ou de um agente capaz de produzir trocas com ação preferencial sobre certos sítios cromossômicos.

Há dois possíveis mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos associados à *TEs* podem ocorrer: (1) indiretamente por recombinação homóloga, ou (2) diretamente por um processo de transposição alternativo. A ação indireta dos *TEs* promove rearranjos cromossômicos mediante a presença

no genoma de múltiplas cópias semelhantes, se não idênticas, entre as quais trocas podem ocorrer. Estas trocas podem ocorrer por recombinação de sequências homólogas ou por meio de reparação defeituosa das quebras em fitas duplas formadas durante a excisão do elemento transponível, utilizando sequências homólogas ectópicas como molde para reparar. Já a ação direta dos *TEs* na geração de rearranjos cromossômicos é um mecanismo que pode explicar rearranjos não causados por recombinação homóloga. *TEs* induzem rearranjos cromossômicos diretamente por uma versão alternativa da transposição tradicional, na qual a região final dos *TEs* envolvidos é proveniente de elementos distintos ao invés de um único elemento (revisão em Gray, 2000). Este mecanismo também é conhecido como transposição aberrante. Sendo assim, dois *TEs* podem participar de um evento de transposição aberrante, através do qual um elemento híbrido formado pela região 5' terminal de uma cópia e pela região 3' terminal da outra cópia se transpõe para um novo sítio cromossômico. O resultado deste processo é uma inversão flanqueada por duas cópias de *TEs* em orientação oposta acompanhada por deleções ou duplicações que se formaram quando as cópias originais foram inseridas em sítios cromossômicos separados (Delprat *et al.*, 2009).

Os estudos relacionados à associação dos *TEs* com pontos de quebra para rearranjos cromossômicos no gênero *Drosophila* começaram principalmente com análises em linhagens que apresentavam disgenesia híbrida, as quais apresentam altas frequências de prole inviável, recombinação em machos, mutações, aberrações cromossômicas e distorção da razão de transmissão (Kidwell, 1977). A causa da disgenesia híbrida tem sido reportada à ativação de diversas famílias de *TEs*, incluindo elementos *P*, *I* e *hobo* em *D. melanogaster* e *Penelope*, *Ulisses*, *Helena*, *Paris* e *Telemac* em *D. virilis* (Kidwell, 2005).

Um trabalho clássico envolvendo mobilização de elemento transponível em uma linhagem disgênica foi o de Engels & Preston (1984). Neste, a análise citológica e por hibridização *in situ* de 746 rearranjos independentes gerados no cromossomo X de cruzamentos entre linhagens π_2 de *D. melanogaster* demonstrou que o processo de formação de rearranjos envolve, em diferentes

casos, o ganho, a perda ou a conservação dos elementos *P* nos pontos de quebra destes.

O envolvimento do elemento transponível *hobo* com pontos de quebra para inversões foi estudado por Lim (1988) e por Lyttle & Haymer (1992). No primeiro trabalho os autores encontraram a presença do elemento *hobo* em 29 pontos de quebra de 16 diferentes rearranjos detectados no cromossomo X designado *Uc* de *D. melanogaster*. Este cromossomo apresenta instabilidades sítio-específicas peculiares e também a capacidade de formar rearranjos idênticos de maneira recorrente. Os autores inferiram que todos os rearranjos podem ser explicados por pareamento intracromossômico e posterior troca entre as cópias do elemento *hobo*. Também que as cópias preexistentes do elemento em orientação direta mediam deleções, enquanto que as cópias em orientação invertida mediam inversões. O segundo trabalho analisou quatro inversões paracêntricas endêmicas de *D. melanogaster* das ilhas Hawaii e Oahu: *In(2R)Df891*, *In(2R)Df892*, *In(2R)Ko877*. O elemento *hobo* estava presente nos, ou muito próximo aos pontos de quebra de três destas inversões. A inversão *SD Kon871* apresentou sítio de inserção do elemento *hobo* em apenas um de seus pontos de quebra. Eventuais inversões cosmopolitas também presentes nas linhagens destas ilhas não apresentaram associação entre o elemento *hobo* e seus pontos de quebra. Este trabalho foi de grande importância, pois foi o primeiro a buscar associação de *TEs* com pontos de quebra de inversões ocorrendo na natureza.

Em vista das poucas informações sobre a associação dos *TEs* com inversões ocorrendo em populações naturais, Regner *et al.* (1996) analisaram duas linhagens de *D. willistoni*: WIP-11A, uma subcultura de uma população mantida há muito tempo no laboratório (WIP-4 Salvador/Bahia, já bastante endocruzada e praticamente monomórfica) e estabelecida aproximadamente três anos antes do trabalho, e 17A2 (Guaíba/Rio Grande do Sul) uma população que havia sido recentemente coletada e que apresentava polimorfismo considerável; com a proposta de identificar os sítios de inserção cromossomal de elementos *P* e verificar sua correspondência com os pontos de quebras das inversões. Através de análises de hibridização *in situ*, os autores verificaram uma considerável diferença na distribuição genômica de elementos *P* nas linhagens. Enquanto em

WIP-11A as sequências homólogas ficaram praticamente confinadas à heterocromatina centromérica, 17A2 mostrou sítios de inserção na eucromatina. Foram encontrados 24 sítios de inserção de elementos *P* em 17A2 e quando comparados com os pontos de quebras de inversões segregantes descritas para populações naturais da espécie, 15 correspondiam. Em 10 destes casos houve absoluta coincidência entre sítios de inserção de elementos *P* e pontos de quebra de rearranjos; nos outros cinco casos, eles estavam marcando, aparentemente, uma banda cromossômica antes ou depois do ponto de quebra (Figura 4).

Apesar das crescentes evidências do envolvimento dos *TEs* com pontos de quebra para inversões, o verdadeiro papel que estes elementos exercem na geração destes polimorfismos permanece pouco esclarecido, sendo o conhecimento na área baseado em evidências indiretas. Este quadro começou a mudar após o trabalho de Cáceres *et al.* (1999), que mostrou que a formação de uma inversão bastante comum em *D. buzzatii* era devida a um *TE* isolado nesta espécie, chamado de *Galileo* pelos autores.

Transposon *Galileo*: agente causador de rearranjos cromossômicos em populações naturais de *Drosophila*

O trabalho de Cáceres *et al.* (1999) apresentou uma prova sem precedentes sobre a geração de uma inversão devido a um *TE* em *D. buzzatii*, a qual pertence ao grupo *repleta* do subgênero *Drosophila*. Dois arranjos cromossômicos são geralmente observados em *D. buzzatii*: o arranjo padrão (*2st*) e o arranjo *2j*, que se originou de *2st* pela inversão *2j*. Para a análise dos pontos de quebra da inversão *2j*, estes foram clonados e sequenciados. Primeiramente, a região proximal do ponto de quebra do cromossomo (denominada *CD*) foi obtida de uma linhagem homozigota para o arranjo *2st* (*st-1*). Após, os pontos de quebra das regiões proximal e distal no cromossomo *2j* (*BD* e *AC* respectivamente) foram

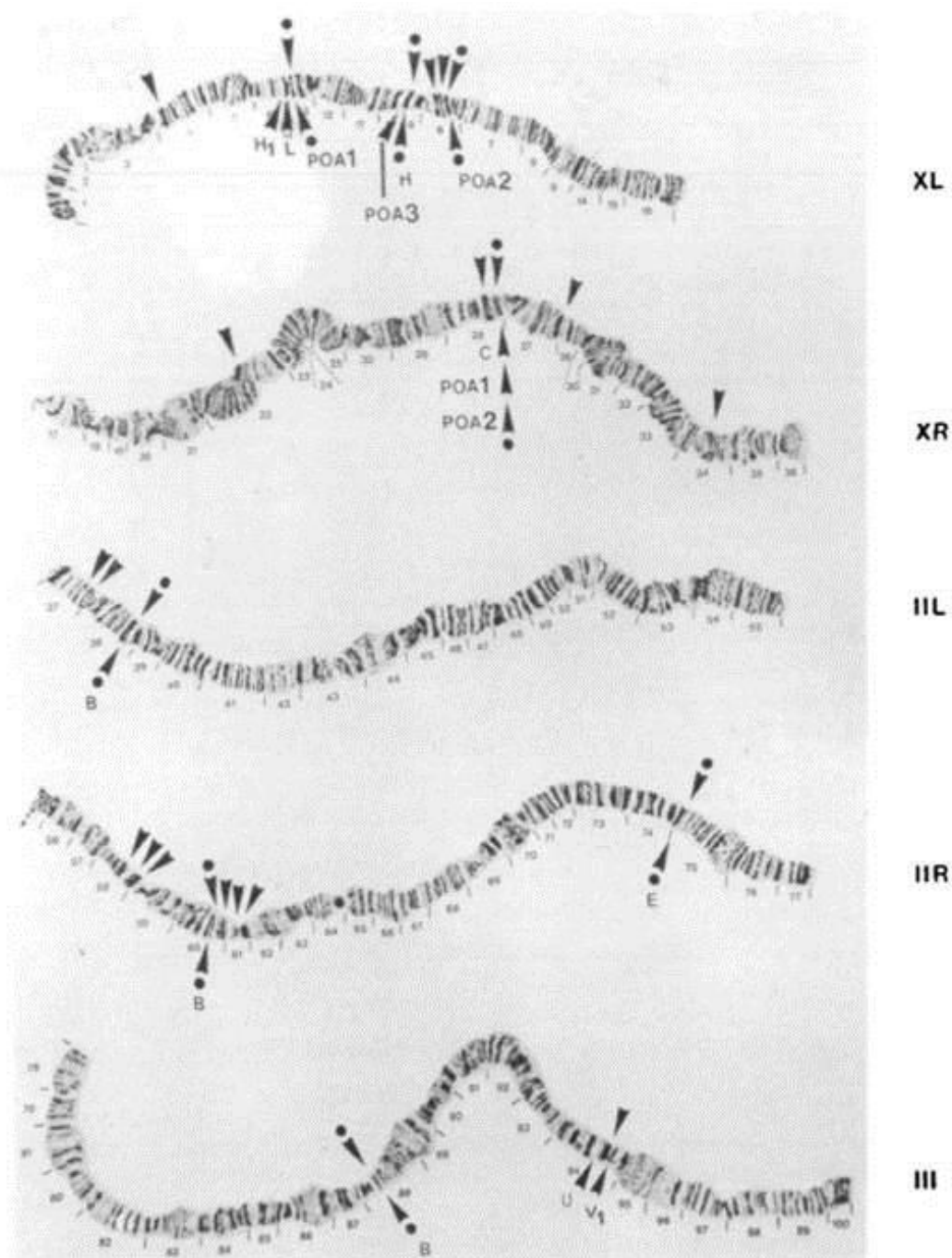


Figura 4: Fotomapa dos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* subdividido de acordo com Dobzhansky (1950). Setas acima de cada cromossomo representam os 24 sítios de inserção de elementos *P* detectados. Setas abaixo de cada cromossomo representam os pontos de quebra de inversões coincidindo com sítios *P* (distinguidas por pontos) ou sendo localizadas

perto delas (menos de uma banda politêmica de distância). Letras designam os nomes das inversões. Extraído de Regner *et al.* (1996).

isolados de uma linhagem homozigota para o arranjo $2j$ ($j-1$). Com isto, a região proximal do ponto de quebra do cromossomo $2st$ (AB) foi obtida da linhagem $st-1$.

O alinhamento das sequências AB e CD em $st-1$ (perfazendo 2086 nucleotídeos) com AC e BD em $2j$ (com 8668 nucleotídeos) mostraram que há grandes inserções presentes em ambos os pontos de quebra da inversão $2j$ que não estão presentes no arranjo $2st$. A inserção entre A e C possui 392 pb com longas $TIRs$ de 106 pb. A inserção entre B e D apresenta 4319 pb, com uma estrutura interna complexa, incluindo $TIRs$ como aquelas da inserção AC de 106 e 47 pb; esta última correspondendo ao começo de uma repetição da ITR de 106 pb. Os 180 pb centrais da inserção AC e da sequência BD que segue a ITR proximal apresentaram 95% de homologia; porém, estão em direções opostas. As sequências flanqueadoras de cada inserção possuem 7 pb e assemelham-se a sítios alvos duplicados que foram produzidos durante o evento de inserção. Entretanto, os sítios alvos duplicados são separados e invertidos, o que sugere fortemente que a inversão $2j$ gerou-se por pareamento intracromossomal e recombinação entre as duas sequências homólogas inseridas em sítios distantes em orientações opostas. Segundo os autores, apesar de a estrutura original destas inserções ainda não ser precisamente conhecida, pode-se considerar que elas eram homólogas em aproximadamente 274 pb e mesmo sendo relativamente pequenas, parecem ser longas o suficiente para sustentar uma recombinação ectópica em *Drosophila* (Figura 5).

A duplicação da sequência de 7 pb sobre a inserção, a presença de $TIRs$, e o padrão de hibridização *in situ* moderadamente repetitivo, identificam as inserções dos pontos de quebra como cópias de um TE de classe II , o qual foi denominado *Galileo*. Foi encontrada também variação no número de sinais de hibridização *in situ* e nas suas localizações no cromossomo, o que sugere uma recente atividade transposicional desse TE . A inserção AC é provavelmente uma cópia defectiva, mas que retém as sequências terminais necessárias para a transposição.

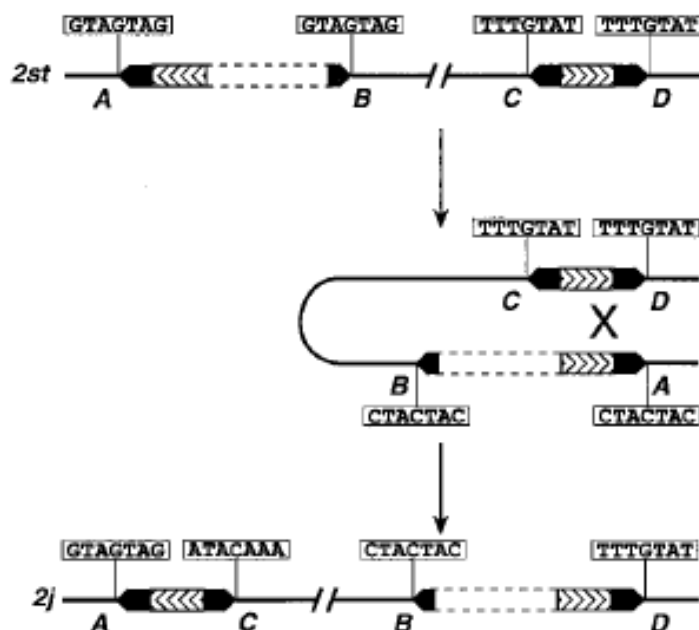


Figura 5: Modelo para a geração da inversão $2j$. Primeiramente, duas seqüências homólogas inseriram-se entre as seqüências A e B e as seqüências C e D de um cromossomo $2st$, gerando duplicações diretas de 7 nucleotídeos (seqüências nos quadrados). Depois, recombinação ectópica entre seqüências homólogas em orientação oposta geraram a inversão. Como resultado desse processo, duplicações do sítio alvo foram trocadas entre as inserções e adquiriram sua orientação atual em cromossomos $2j$, com cada inserção flanqueada por seu original sítio alvo e o sítio alvo invertido de outro elemento. Linhas tracejadas referem-se às seqüências não desenhadas em escala real. Extraído de Cáceres *et al.* (1999).

A cópia encontrada entre B e D pode ter degenerado parcialmente, mas contém regiões de leitura abertas (*ORFs*) que poderiam codificar uma proteína envolvida na transposição. A *ORF* maior prediz uma seqüência de 172 aminoácidos apresentando 32% de identidade com a *ORF* maior do elemento *Gandalf* de *D. koepferae*, uma espécie críptica de *D. buzzatii*.

Ainda no mesmo estudo, os pontos de quebra de linhagens $2st$ e $2j$ de *D. buzzatii* de diferentes origens tiveram seus produtos de *PCR* amplificados e sequenciados. O sequenciamento de 521 pb das regiões A , B , C e D em três linhagens $2st$ e em cinco linhagens de $2j$ mostrou uma diversidade nucleotídica de 0 e 0,0279 para $2st$ e $2j$ respectivamente. Já o sequenciamento de 800 pb das inserções do elemento *Galileo* nas linhagens $2j$ mostrou uma diversidade

nucleotídica de 0,0053. Isso indica que todos os arranjos $2j$ possuem uma origem monofilética.

Dando continuidade aos estudos para maior conhecimento do envolvimento do transposon *Galileo* e seu envolvimento com a geração da inversão $2j$ em *D. buzzatii*, Cáceres *et al.* (2001), através de análises por *Southern blot*, *PCR* e sequenciamento dos pontos de quebra em nove linhagens com o arranjo $2st$ e 30 linhagens com o arranjo $2j$ encontraram um extraordinário grau de reestruturação nesses pontos. Nas linhagens portando o arranjo $2st$, nenhuma variação estrutural foi encontrada. *Southern blots* com sondas *AB* e *CD* revelaram as mesmas bandas com 1,7K kb e 5,4 kb respectivamente, correspondendo aos pontos de quebra distal e proximal de $2j$. Amplificações por *PCR* também não mostraram variação nas linhagens $2st$.

Em relação às linhagens portando o arranjo $2j$, resultados contrastantes foram encontrados. Análises por *Southern blot* foram primeiramente feitas utilizando a enzima de restrição *PstI* e hibridização com uma sonda *CD*. Com isto, duas bandas foram observadas, as quais correspondiam aos pontos de quebra distal e proximal, bem como mais 11 bandas de diferentes tamanhos correspondentes ao ponto de quebra proximal e seis bandas correspondentes ao ponto de quebra distal. Posteriormente, foram utilizadas as enzimas de restrição *Clal*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *Sall* e *XbaI* e hibridização com sondas *AB* e *CD*. Isto resultou na identificação de nove principais tipos estruturais no ponto de quebra proximal e seis no ponto de quebra distal. As análises por *PCR* confirmaram os resultados obtidos nas hibridizações por *Southern blot*. Após o sequenciamento de todas as bandas encontradas pelas técnicas empregadas, os autores inferiram a estrutura presente nos pontos de quebra da inversão $2j$ das 30 linhagens estudadas. No geral, 10 tipos estruturais diferentes foram encontrados no ponto de quebra proximal (*BD*) e sete no ponto de quebra distal (*AC*), dos quais a maior parte diferia por mudanças relativamente simples, tais como, inserções e deleções.

De posse destas informações, os autores foram capazes de postular uma sequência plausível de mudanças evolutivas entre as estruturas encontradas nos pontos de quebra (Figura 6).

Nos pontos de quebra da inversão $2j$, além das inserções originais do *TEs Galileo-1* e *Galileo-2*, as quais são implicadas na própria origem da inversão $2j$, há também mais duas cópias inseridas, *TE Galileo-3* e *TE Galileo-4*. Estas últimas cópias são basicamente compostas de longas *TIRs*, com uma região central relativamente pequena e heterogênea que parece não codificar alguma proteína envolvida na sua transposição. Outras cinco inserções correspondentes a *TEs* também correspondem aos *TEs Kepler* e *Newton*, os quais compartilham muitas características com o *TE Galileo*, sugerindo que todos pertençam à mesma família. Foram encontradas ainda, sete inserções correspondentes a quatro *TEs* que foram denominados como transposons de *D. buzzatii* (*BuTs*) e outras cinco inserções que não apresentaram homologia com nenhuma família de *TEs* conhecida.

Além das 22 inserções de *TEs*, outros tipos de rearranjos genéticos foram encontrados nos pontos de quebra da inversão $2j$, incluindo 13 deleções, uma duplicação e uma inversão. Os autores inferiram que a maior probabilidade é de que todos estes eventos tenham ocorrido após a entrada dos *TEs Galileo-1* e *Galileo-2*. Estes achados, somados ao fato de que as diferentes estruturas encontradas nos pontos de quebra da inversão $2j$ das linhagens analisadas foram geradas a partir de um ancestral comum em um período de tempo de aproximadamente 84 mil anos, qualificam os pontos de quebra da inversão $2j$ como *hotspots*.

O mesmo trabalho analisou ainda o tempo de origem da inversão $2j$ através das variações nucleotídicas fixadas entre os cromossomos portando os arranjos $2st$ e $2j$ em comparação com *Drosophila martensis* (grupo externo). O tempo de origem estimado foi de aproximadamente um milhão de anos, o que é consistente com a sua ampla distribuição.

O estudo dos pontos de quebra de outra inversão ocorrente em *D. buzzatii* forneceu outro exemplo da ação do elemento *Galileo* como agente causador de rearranjo cromossômico. Casals *et al.* (2003) analisaram os pontos de quebra da inversão $2q^7$, a qual difere da inversão $2j$ por ser mais proximal, com um ponto de quebra muito próximo ao centrômero; por não ter se originado de um arranjo $2st$, e sim de um arranjo $2j$; por ter uma distribuição geográfica mais restrita e menor

frequência, indicando origem mais recente. Do sequenciamento dos pontos de quebra da inversão $2q^7$ em uma linhagem portando o arranjo $2j$ (a qual deu origem ao arranjo $2q^7$) foram obtidos 2.993 pb e 3.095 pb dos pontos de quebra *AB* e *CD* respectivamente. Já da linhagem portando o arranjo $2q^7$ foram obtidos 4.695 pb e 6.751 pb dos pontos de quebra *AC* e *BD* respectivamente. Isto permitiu a comparação dos pontos de quebra em cromossomos não invertidos e invertidos e assim determinar os limites precisos do segmento invertido e identificar sequências repetitivas inseridas nas junções *AC* e *BD*. Como resultado, grandes inserções foram encontradas nos pontos de quebra *AC* e *BD* do cromossomo $2q^7$. No ponto de quebra distal (*AC*) havia uma inserção de 1,8 kb na junção *A-C*, a qual consistia de uma cópia truncada de um elemento *BuT5* e um elemento *Galileo* (*Galileo-10*); e uma inserção de 387 pb em *A*, a qual correspondia à uma sequência desconhecida, mas que mostrou todas as características de um transposon e foi designado como *BuT6*.

Já no ponto de quebra proximal (*BD*) havia duas inserções de 2,4 e 3 kb separadas por somente 11 pb (CTTGTTCCCAG), correspondendo aos 11 primeiros nucleotídeos da sequência de *D*. A primeira inserção consistia de três cópias parciais e uma cópia completa do elemento *BuT5*, uma cópia do elemento *Kepler-5*, e duas pequenas sequências correspondentes ao término do elemento *Galileo* (*Galileo-11*). A segunda inserção continha uma longa cópia do elemento *Galileo* (*Galileo-12*). A localização das inserções de 1,8 kb (*TE Galileo-10*) e 2,4 kb (*TE Galileo-11*) em orientação direta nas junções *A-C* e *B-D* respectivamente, implica no envolvimento destas com a origem da inversão $2q^7$. As outras duas inserções nos pontos de quebra não estão diretamente envolvidas na geração da inversão e foram igualmente causadas por inserções secundárias de *TEs*.

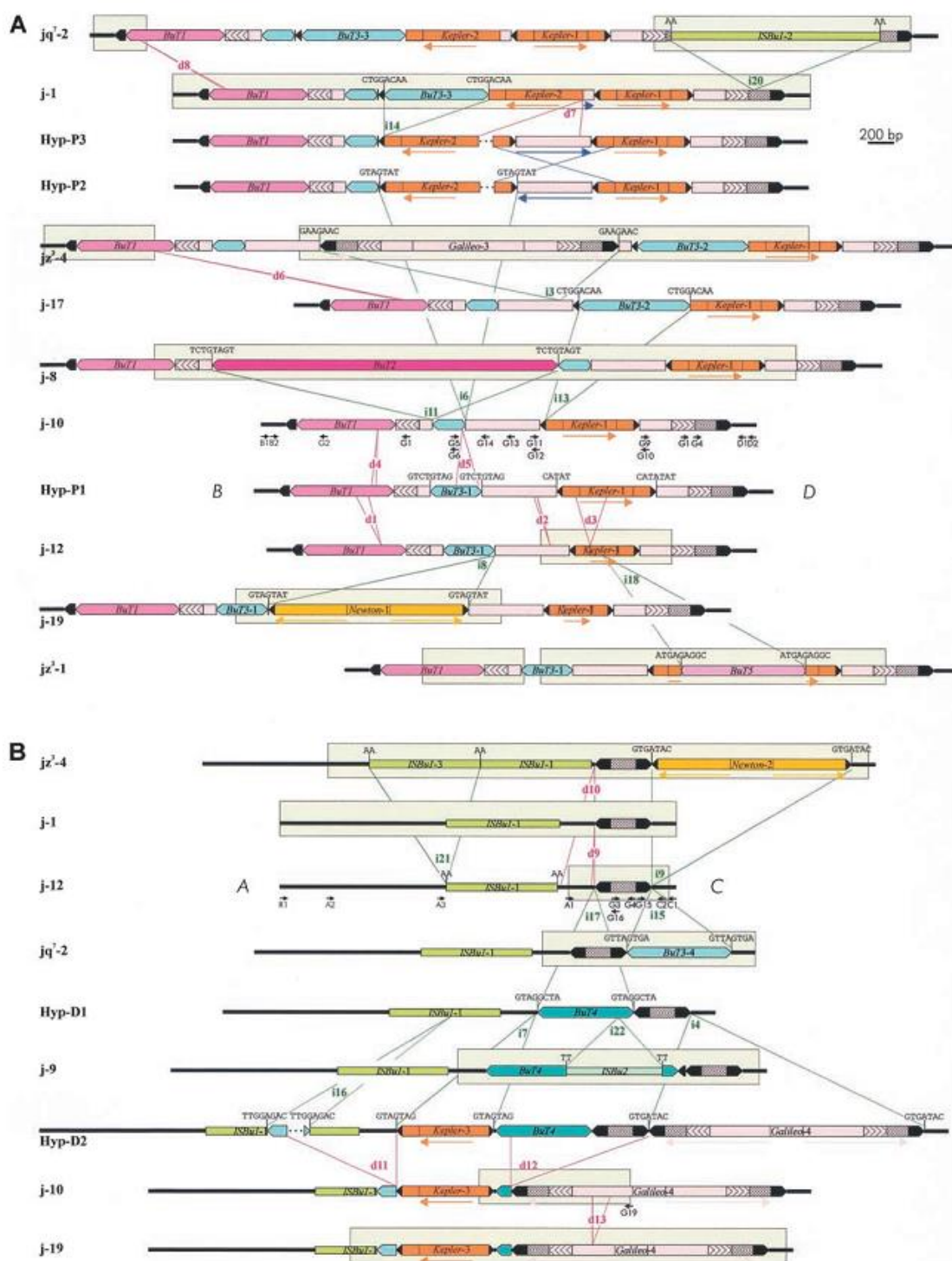


Figura 6: Representação esquemática das estruturas encontradas nos pontos de quebra proximal (A) e distal (B) da inversão 2j em 30 linhagens. Linhas cheias representam as sequências de cópia única A, B, C, D. TEs estão representados por quadrados coloridos com pontas finais correspondentes às TIRs. Inserções e deleções são delimitadas por linhas verdes e vermelhas, respectivamente, e são nomeadas de i a d, seguido por um número. Sítios alvos duplicados flanqueando

as inserções são mostrados acima delas. Linhas azuis indicam a inversão de um segmento interno. Setas abaixo dos diagramas informam a orientação de alguns segmentos homólogos. Os fragmentos sequenciados em cada estrutura estão dentro de retângulos claros. **Hyp** são estruturas hipotéticas não encontradas nas linhagens $2j$ analisadas. Pequenas setas pretas indicam os *primers* de PCR utilizados no estudo. Modificado de Cáceres *et al.* (2001)

Dentre os *TEs* inseridos, o elemento *Galileo* é o mais provável indutor da inversão $2q^7$ através de recombinação ectópica. De acordo com Cáceres *et al.* (2001), o elemento *Galileo* duplica sete nucleotídeos de seus sítios alvos ao se inserir. Sendo assim, se o elemento *Galileo* originou a inversão $2q^7$, os 7 pb flanqueando o elemento *Galileo-10* na região C devem ser a versão invertida e complementar da sequência de 7 pb flanqueando o elemento *Galileo-11* na região D. De fato, esta foi a situação encontrada nas análises. Houve também a ocorrência de uma evidência adicional que forneceu suporte para a geração da inversão $2q^7$ devido à recombinação ectópica entre duas cópias do elemento *Galileo*. O *TE Galileo-10* parece ser um elemento quimérico que provavelmente foi gerado por recombinação entre duas cópias levemente diferentes deste *TE*. Através da comparação das *TIRs* de ambas as extremidades do elemento *Galileo-10* com as do elemento *Galileo-12* e com as outras cópias do elemento *Galileo* já anteriormente descritas, *TE Galileo-3* e *TE Galileo-4* (Cáceres *et al.*, 2001), foi encontrado alto grau de divergência em relação às *TIRs* das demais cópias, o que foi um resultado inesperado, já que as *TIRs* do mesmo elemento sempre apresentam muito menos divergência entre si do que entre elementos diferentes. No caso do elemento *Galileo-10*, o padrão de divergência foi semelhante ao observado entre *TIRs* de diferentes elementos e seis vezes mais divergente quanto às *TIRs* pertencentes ao mesmo elemento.

Embora as diferenças entre as duas *TIRs* do elemento *Galileo-10* possam ter surgido por mutação, a taxa de mutação deve ser excessivamente elevada para explicar tal nível de divergência. Assim, a provável natureza quimérica do elemento *Galileo-10* fornece outro suporte para o modelo de recombinação ectópica.

A datação dessa inversão também foi analisada utilizando a divergência nucleotídica entre os pontos de quebra nos cromossomos invertidos e não

invertidos comparados com a divergência entre *D. buzzatii* e *D. koepferae*. Esta análise estimou a idade da inversão 2q7 como sendo 490 mil anos (Casals *et al.* 2003).

No estudo de Casals *et al.* (2005) foram analisadas 14 cópias do elemento *Galileo*, seis do elemento *Kepler* e três do elemento *Newton* em 23 linhagens de *D. buzzatii* (Figura 7) na tentativa de caracterizar molecularmente estes três elementos *foldback*. As cópias do elemento *Galileo* variaram de 20 a 2340 pb em tamanho. O domínio mais externo de suas *IRs* (*IR-FD*) contem 479 pb, os quais foram conservados em todas as cópias. Esta região é seguida por até três repetições imperfeitas *in tandem* de 136 pb com identidade média entre as cópias de 91%, mais uma repetição incompleta de 43 pb (*IR-OD*). Tipicamente há duas ou três repetições por *IR*, sendo que este número difere entre ambos os lados do elemento. O domínio interno da *IR* (*IR-ID*) é extremamente heterogêneo em comprimento e na composição da sequência, sendo caracterizado por um alto conteúdo de AT (mais de 75%). Muitos dos elementos também apresentam uma região central de 81 a 158 pb que não tem sido encontrada como fazendo parte das *IRs*, podendo assim ser considerada como o domínio *M*.

Os TEs *Kepler* e *Newton* mostraram uma identidade nucleotídica de 90% e diferem do elemento *Galileo* por aparentemente possuírem apenas os domínios *IR-FD* e *M*, mas não as repetições *in tandem* (*IR-OD*) nem o domínio *IR-ID*. As *IRs* dos três elementos apresentaram alto grau de homologia nas suas sequências, sendo que em média os primeiros 600 pb do elemento *Galileo* (*IR-FD* e uma parte da primeira repetição *in tandem*), do elemento *Kepler* (*IR-FD* e a maior parte da região *M*) e do elemento *Newton* (*IR-FD*) apresentam 73% de homologia. Outra característica também compartilhada entre os três elementos é a duplicação dos sítios alvos durante a inserção. Comparações entre as 19 sequências flanqueadoras destes elementos sugerem que seu sítio preferencial de inserção corresponde a uma sequência consenso de 7 pb (G₁₆T₁₆A₁₀G₁₀T₁₅A₁₈C₉). Interessantemente, esta sequência é palindrômica e as primeiras duas bases de cada lado são complementares às extremidades dos elementos (CA...TG) (Casals *et al.*, 2005).

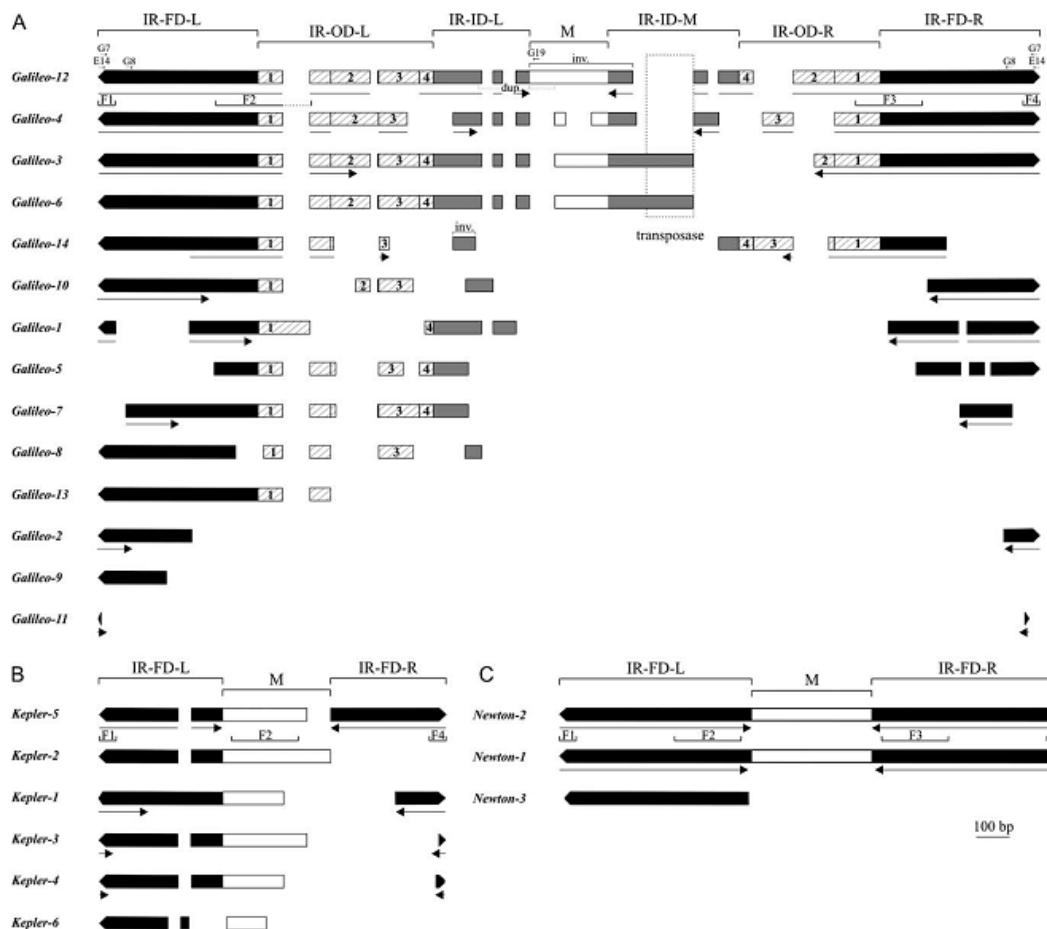


Figura 7: Representação esquemática das variantes de elemento transposnível *Galileo* (A), Elemento *Kepler* (B) e Elemento *Newton* caracterizadas em *D. buzzatii*. Extraído de Casals *et al.* (2005).

As cópias dos três elementos caracterizados em *D. buzzatii* não mostraram qualquer evidência de capacidade de codificação, nem *ORFs* com homologia a uma proteína conhecida.

As relações filogenéticas entre os *TEs Galileo*, *Kepler* e *Newton* foram determinadas através das comparações das *IRs* (totalizando aproximadamente 250 pb). Somente os elementos que continham ambas as *IRs* completas foram incluídos na análise, sendo então consideradas independentemente. A árvore contruída mostrou dois clados altamente divergentes, um incluindo as cópias do elemento *Galileo* e outro incluindo as cópias dos elementos *Kepler* e *Newton* (Casals *et al.*, 2005).

A distribuição cromossômica dos três *TEs* também foi analisada, incluindo outras 10 espécies do complexo *buzzatii* de *Drosophila* e duas outras espécies do grupo *repleta*. De uma forma geral, os elementos *Galileo*, *Kepler* e *Newton* não se distribuem aleatoriamente e tendem a se acumular na região proximal dos cromossomos e no cromossomo pontual em todas as espécies do complexo. Os autores apontam que este padrão é consistente a ação da taxa de recombinação em determinar a distribuição dos *TEs* nos genomas (Casals *et al.*, 2005).

As idades dos *TEs Galileo*, *Kepler* e *Newton* foram estimadas através de sua presença em outras espécies filogeneticamente relacionadas. Estas comparações, somadas ao padrão de distribuição interespecífico destes elementos visualizados nos cromossomos, sugerem que eles estavam presentes antes da radiação do complexo *buzzatii*, sendo transmitidos verticalmente durante os eventos de especiação subsequentes (Casals *et al.*, 2005).

Marzo *et al.* (2008) realizaram buscas *in silico* de sequências similares ao elemento *Galileo* no genoma das 12 espécies de *Drosophila* disponíveis (Clark *et al.*, 2007) e encontraram um padrão mais amplo de distribuição no gênero do que anteriormente esperado. Primeiramente, através de inúmeras *PCRs*, os autores isolaram a maior cópia do elemento *Galileo* em *D. buzzatii*, a qual possuía 5.406 pb, com *TIRs* de 1.229 pb, e um *intronless* de 2.738 pb que codifica uma proteína de 912 aminoácidos. Após, uma busca utilizando *BLASTX* revelou significativa similaridade da *Tpase* do elemento *Galileo* em *D. buzzatii* com a dos elementos *P* e *1360* em *D. melanogaster*.

A análise da distribuição dos elementos *Galileo* e *1360* nos genomas sequenciados de *Drosophila* encontrou a presença sequências similares ao elemento *Galileo* também em *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. virilis* e *D. mojavensis*. Já sequências similares ao elemento *1360* estavam presentes em *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta* (todas do subgrupo *melanogaster*); e também em *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* e *D. virilis*.

A caracterização das cópias mais completas do elemento *Galileo* nos genomas feita por Marzo *et al.* (2008), encontrou desde cópias com 4.386 pb em *D. willistoni* a com 5.989 em *D. mojavensis*. Todas as cópias encontradas (46

cópias) possuíam uma ou duas *TIRs* longas similares às de *D. buzzatii* e nove eram flanqueadas por 7 pb pertencentes à duplicação do sítio alvo. Entretanto, nenhuma destas cópias apresentavam uma *ORF* codificando uma *Tpase* totalmente funcional. Já a caracterização das cópias menores e defectivas do elemento *Galileo* nos genomas, levou ao encontro de mais de 100 cópias em cada uma das seis espécies, sendo que em *D. willistoni* foi encontrado o número máximo (495 cópias). Das 109 variantes defectivas do elemento *Galileo* encontradas, todas apresentavam duas longas *TIRs* separadas por um segmento médio relativamente curto e 97 destas variantes mostraram duplicações do sítio alvo de 7 pb. As análises da duplicação do sítio alvo em ambos os tipos de cópias (longas e defectivas) semelhantes ao elemento *Galileo* apresentaram como consenso a sequência GTANTAC.

A estimativa do tempo decorrido desde a mais recente atividade transposicional do elemento *Galileo* foi medida através da divergência média entre as cópias defectivas de cada espécie. Em *D. ananassae*, a divergência média entre 20 cópias foi 2,8%, o que implica um tempo de divergência de 1,8 milhões de anos. No entanto, provas para eventos de transposição mais recentes foram encontradas em um subgrupo de 13 cópias mostrando uma variação média de 0,36%, equivalente a um tempo de divergência de apenas 225 mil anos. Para *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* e *D. willistoni* foram encontrados subgrupos com 1% de divergência média (600 mil anos) Em *D. virilis*, a análise de 13 cópias defectivas mostrou dois grupos altamente divergentes, os quais foram denominados A e B. Cópias dentro de cada grupo foram alinhadas e analisadas separadamente. A divergência média nos grupos A e B foram de 4,6 e 5,7%, implicando em tempos de divergência de 2,9 e 3,6 milhões de anos respectivamente. Em *D. mojavensis*, análises de 20 cópias defectivas revelou a presença de quatro grupos bem definidos, denominados C-F. Grupos de C a F apresentaram divergências médias entre 2,2%, 2,3%, 2,4% e 8,9%, correspondendo um tempo de divergência entre 1,4 a 5,5 milhões de anos. Os diferentes grupos encontrados em *D. virilis* e *D. mojavensis* representam invasões relativamente antigas nestes genomas (Marzo *et al.*, 2008).

A análise filogenética entre a *Tpase* dos *TEs Galileo*, 1360 e *P* apresentou uma origem monofilética para os três elementos, indicando assim que o elemento *Galileo* pertence à superfamília *P* de transposons de DNA.

Já a análise filogenética considerando a sequência da transposase dos elementos *Galileo* em sete espécies do gênero *Drosophila* neste estudo (Marzo *et al.*, 2008) mostrou-se claramente inconsistente com a filogenia das espécies (Clark *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2008). Os elementos de *D. willistoni* e *D. virilis*, pertencentes a subgêneros diferentes (*Sophophora* e *Drosophila* respectivamente) são muito próximos um do outro. Da mesma forma, os elementos *Galileo* de *D. mojavensis* e *D. buzzatii* (subgênero *Drosophila*) são mais relacionados aos de *D. ananassae*, *D. pseudoobscura* e *D. persimilis* (subgênero *Sophophora*) do que aos de *D. virilis*, uma espécie do mesmo subgênero. Existem duas possíveis explicações para essas disparidades topológicas: *lineage sorting* e transferência horizontal. *Lineage sorting* refere-se à diversificação vertical de linhagens de *TEs* e suas perdas diferenciais ao longo dos ramos da árvore das espécies. Transferência horizontal é o processo de invasão de um novo genoma por um *TE*, o qual é um evento comum entre os transposons e é considerada como uma fase integrante do ciclo de vida de um transposon que permite a sobrevivência a longo prazo. No entanto, as evidências disponíveis para transferência horizontal do elemento *Galileo* entre as diferentes espécies do gênero não são convincentes, e *lineage sorting* deve ser considerada como a mais provável explicação (Marzo *et al.*, 2008).

Ainda para aumentar a compreensão dos mecanismos subjacentes à geração de inversões em *Drosophila* ocorrentes na natureza, Delprat *et al.* (2009) isolaram e caracterizaram os pontos de quebra de uma outra inversão polimórfica em *D. buzzatii*, $2z^3$. Essa inversão originou-se de um cromossomo portando a inversão $2j$, dando origem ao arranjo $2jz^3$. O segmento $2z^3$ abrange cerca de um terço do cromossomo 2 (11 Mb) e se sobrepõe à inversão $2j$ de modo que as duas inversões não podem ser separadas por recombinação. Assim, três arranjos no cromossomo 2 são comumente encontrados em populações naturais de *D. buzzatii*: 2-padrão ($2st$), $2j$ e $2jz^3$. O arranjo $2jz^3$ apresenta uma ampla distribuição

geográfica e está presente em populações naturais da Argentina, sul do Brasil, Chile e Velho Mundo.

Delprat *et al.* (2009) propõem uma classificação para os três *TEs* tipo *foldback* encontrados em *D. buzzatii*: *Galileo*, *Kepler* e *Newton*. Devido ao alto grau de similaridade nucleotídica encontrada entre suas *TIRs*, bem como a geração de uma duplicação 7 pb dos seus sítios alvos com a mesma sequência consenso, o que sugere que eles são mobilizados pela mesma transposase, estes *TEs* poderiam ser considerados como diferentes subfamílias do elemento *Galileo*, sendo denominados *GalileoG* (*TE Galileo*), *GalileoN* (*TE Newton*) e *GalileoK* (*TE Kepler*).

Seguindo as análises anteriores de pontos de quebra de inversões (Cáceres *et al.*, 1999; Casals *et al.*, 2003), os pontos de quebra distal e proximal foram denominados *AB* e *CD* em cromossomos não invertidos e *AC* e *BD* em cromossomos invertidos. Foram sequenciados no total 4.067 pb e 12.520 pb dos pontos de quebra distal (*AC*) e proximal (*BD*) respectivamente, em uma linhagem portando a inversão $2z^3$. A comparação destas sequências com os pontos de quebra de linhagens sem a inversão permitiu a localização precisa dos pontos de quebra. Inserções relativamente grandes foram encontradas em *AC* (2.870 pb) e *BD* (4.786 pb) que não estavam presentes nas junções *AB* e *CD* dos cromossomos não invertidos. A inserção de 2.870 pb era composta de uma cópia do elemento *GalileoN* (*TE GalileoN-4*), com duas outras inserções agrupadas: uma cópia do elemento *BuT5* flanqueada por uma duplicação do sítio alvo de 8 pb, e uma cópia de um elemento tipo *LINE* com 261 pb. Esta última cópia aparentemente não apresenta nenhuma *ORF* e nenhuma homologia significativa com elementos já descritos. Sendo assim, esta inserção foi classificada como um elemento parcial tipo *LINE* devido à presença de uma cauda poli-A de 41 pb de comprimento e duas *TSDs* de 13 pb. A inserção de 4.786 pb na junção *BD* inclui também uma cópia do elemento *GalileoN* (*TE GalileoN-5*) com outras duas inserções de *TEs* agrupados: uma cópia do elemento *BuT4* flanqueada por *TSDs* de 8 pb e uma cópia do elemento *BuT3* flanqueada também por *TSDs* de 8 pb. As duas cópias do elemento *GalileoN* inseridas nos pontos de quebra (*TE GalileoN-4* e *TE GalileoN-5*) apresentam *TIRs* relativamente longas e são muito

semelhantes aos exemplares da subfamília do *TE Newton* anteriormente descrito em *D. buzzatii*. Após a inserção, o elemento *Galileo* gera *TSDs* de 7 pb com uma sequência consenso GTAGTAC. A sequência de 7 pb que acompanha o elemento *GalileoN-4* na região C (GTAGTAC) é a versão inversa e complementar à sequência de 7 pb que acompanha o elemento *GalileoN-5* na região D (GTACTAC). Da mesma forma, a sequência de 7 pb flanqueando o elemento *GalileoN-4* na região A (GTACTAT) é a versão invertida e complementar da região flanqueadora do elemento *GalileoN-5* na região B (ATAGTAC). Apenas uma única cópia da sequência de 7 pb GTACTAT está presente no ponto de quebra distal (AB) e uma cópia da sequência alvo GTACTAC é encontrada no ponto de quebra proximal (CD) nos cromossomos não invertidos. Este padrão de *TSDs* trocado é consistente com a ação de recombinação ectópica como geradora da inversão $2z^3$ (Delprat *et al.*, 2009).

Várias inserções de outros *TEs* foram encontradas nas regiões de pontos de quebra no cromossomo com a inversão $2z^3$ que não estavam presentes em cromossomos não invertidos. Surpreendentemente, apenas o elemento *GalileoN* estava presente nos dois pontos de quebra (AC e BD). Este fato, somado ao padrão de complementaridade entre as *TSDs* destes elementos e a orientação em posição oposta da região central das duas cópias indicam que o elemento *GalileoN* é o elemento responsável pela geração da inversão $2z^3$ (Delprat *et al.*, 2009).

O envolvimento de elementos *Galileo* na origem de três inversões polimórficas em *D. buzzatii* forneceu, pois, novas perspectivas para o estudo das origens de inversões em *Drosophila* e por extensão, de outros organismos. A detecção de cópias quiméricas, conforme encontrado por Marzo *et al.* (2008), no genoma de *D. mojavensis*, *D. pseudoobscura* e *D. willistoni* indica que o elemento *Galileo* também pode estar envolvido na origem de inversões em outras espécies do gênero *Drosophila*. Sendo assim, um promissor caminho espera os estudos dos pontos de quebra de inversões em diferentes espécies, facilitado pelo sequenciamento dos genomas e ferramentas de detecção e análises cada vez mais aprimoradas.

OBJETIVOS

- Objetivo geral

Analisar, por hibridização *in situ*, a presença e a localização cromossômica do elemento transponível *Galileo* nos núcleos politênicos de indivíduos de populações naturais de *Drosophila willistoni*, em paralelo com o registro de seu polimorfismo cromossômico para inversões paracêntricas, na tentativa de se obter pistas para o estabelecimento de uma relação de causa e efeito entre inserção do elemento transponível *Galileo* e pontos de quebra de inversões. A partir desta primeira abordagem, um amplo caminho poderá se abrir para o entendimento da dinâmica dos genomas.

- Objetivos específicos

- Estabelecer a coincidência dos sítios de inserção do elemento transponível *Galileo* com os do elemento *P*, a fim de encontrar associações entre diferentes elementos transponíveis nos mesmos sítios cromossômicos;

- Analisar, sob o ponto de vista evolutivo, o quadro obtido com as análises dos sítios de inserções do elemento transponível *Galileo* nos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni*.

CAPÍTULO II

Distribuição do elemento transponível *Galileo* nos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* e possíveis implicações evolutivas.

Carolina Flores Garcia¹, Alfredo Ruiz², Vera Lúcia da Silva Valente¹

- 1- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Porto Alegre, Brasil
- 2- Departamento de Genética e Microbiologia, Universitat Autònoma de
Barcelona, Espanha

Trabalho em preparação a ser submetido à publicação.

Resumo

O presente estudo analisou a presença do transposon *Galileo* nos cromossomos politênicos de três linhagens oriundas de locais distintos da distribuição geográfica de *Drosophila willistoni*. Para tal, realizou-se a técnica de hibridização *in situ* nos cromossomos politênicos de glândulas salivares, utilizando como sonda um fragmento do elemento transponível *Galileo* de 2441 pb obtido da linhagem Gd-H4-1 de *D. willistoni* utilizada no sequenciamento, e que não engloba suas *TIRs*. Foram encontrados 100 sítios de inserção do elemento transponível *Galileo* ao longo de todos os cromossomos da espécie. Destes sítios, 20 coincidem com pontos de quebra de inversões paracêntricas descritas e dois coincidem com pontos de quebra de uma rara inversão pericêntrica. O padrão de distribuição dos sítios de inserção do elemento transponível *Galileo* foi semelhante nas três linhagens estudadas. Associações estatisticamente significativas entre sítios de inserções do elemento transponível *Galileo* com pontos de quebra de inversões foram encontradas nos braços cromossômicos XR, IIL e III. Sinais de hibridizações também ocorreram nos cromocentros. O padrão preservado da distribuição do elemento transponível *Galileo*, bem como a sua presença nos cromocentros de linhagens geograficamente distantes, indica que *Galileo* é um *TE* relativamente antigo no genoma de *D. willistoni*. Sendo assim, ou o elemento transponível *Galileo* invadiu mais de uma vez o genoma da espécie, ou este elemento uma vez que se inseriu se manteve ativo por bastante tempo. Ambas explicariam a considerável quantidade de sítios de inserção visíveis nos braços cromossômicos, considerando apenas as cópias mais completas.

Abstract

We analyzed the presence and the polytene chromosomal insertion sites of the *Galileo* transposable element in three strains of *Drosophila willistoni* from different geographical origins. For this, we used *in situ* hybridization of polytene chromosomes in the salivary glands, using as a probe a 2441pb fragment, without the *TIRs*, of *Galileo* transposable element obtained of the Gd-H4-1 sequenced strain of *D. willistoni*. We found 100 insertion sites of *Galileo* transposable element along all the chromosomal arms of *Drosophila willistoni*. Twenty of these sites coincided with breaking points of paracentric inversions and two with those of a rare pericentric inversion. The pattern of distribution of the insertion sites of *Galileo* transposable element was similar in all the three strains. Significant associations between insertion sites of the *Galileo* transposable element and inversion breaking points were found in the chromosomal arms XR, IIL and III. Signals of hybridization were also detected in the chromocenters of all the strains. The conserved pattern of the *Galileo* transposable element distribution, as well as its presence in the chromocenters of geographically distant strains, suggests that the *Galileo* transposable element is an ancient TE in the genome of *Drosophila willistoni*. Therefore, either *Galileo* transposable element invaded the genome of *D. willistoni* several times, or this element, after the first invasion, remained itself active for a long time, Both alternatives can explain the high quantity of insertion sites detectable in the euchromatic chromosomal arms, considering only the more complete copies of the *Galileo* transposable element.

Introdução

Elementos transponíveis (*TEs*) são unidades genéticas que apresentam ampla diversidade em sua estrutura e mecanismos de transposição. Eles ocupam uma grande parte dos genomas eucarióticos e sua circulação e acumulação representam uma força importante capaz de moldar os genes e os genomas dos organismos que os portam (Capy *et al.*, 1998; Feschotte & Pritham, 2007; Wicker *et al.*, 2007). Eles têm sido encontrados virtualmente em todos os eucariotos, com poucas exceções (Wicker *et al.*, 2007).

A entrada de um *TE* no genoma hospedeiro pode acarretar efeitos tanto benéficos, como por exemplo, a conhecida domesticação de três retroelementos (*HeT-A*, *TART* e *TAHRE*) que realizam a manutenção das extremidades teloméricas em *Drosophila* (Biessmann *et al.*, 1992; Sheen & Levis, 1994; Pardue *et al.*, 2005; Ciapponi & Cenci, 2008); quanto, na sua grande maioria, deletérios. Neste último caso, a transposição e a entrada de um *TE* no genoma hospedeiro podem corromper genes, recombinar com outra cópia e assim gerar rearranjos deletérios, bem como ser uma atividade custosa para seu hospedeiro (Finnegan, 1992; McDonald *et al.*, 1997; Nuzhdin *et al.*, 1997).

Diversas evidências têm encontrado a prevalência de inserções de *TEs* em locais de baixa recombinação nos genomas hospedeiros, tais como centrômeros, telômeros e regiões invertidas. Em *D. melanogaster* as regiões heterocromáticas, tais como as dos cromossomos pontual e Y, e a β -heterocromatina são consideravelmente compostas por *TEs*, bem como as regiões de heterocromatina intercaladas ao longo dos braços eucromáticos (Vaury *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1990; Charlesworth *et al.*, 1994; Carmena & González 1995; Pimpinelli *et al.*, 1995; Dimitri, 1997; Junakovic *et al.*, 1998; Dimitri *et al.*, 2003; 2009; Casals *et al.*, 2005). Sendo assim, tem sido postulado que a taxa de recombinação seria um fator determinante na manutenção dos *TEs* nos genomas.

A capacidade de condicionar diferentes tipos de rearranjos cromossômicos mais comumente do que outros processos celulares, seja por recombinação homóloga entre cópias idênticas ou pela ação da transposição, vem tornando os *TEs*, de uma maneira crescente, alvo de estudos na tentativa de encontrar associações entre estes e os rearranjos cromossômicos (Gray, 2000).

Diferentes *TEs* têm sido associados a pontos de quebras de inversões no gênero *Drosophila*. Exemplos desta associação ocorrendo em populações naturais foram apresentados para o transposon *hobo* (Lyttle & Haymer, 1992) em *D. melanogaster*, o transposon *P* (Regner *et al.*, 1996) em *D. willistoni*, e os retroelementos *Penelope* e *Ulysses* (Zelentsova *et al.*, 1999) em *D. virilis*. A primeira prova circunstancial da geração de uma inversão devido à ação de um *TE* foi dada por Cáceres *et al.* (1999). Neste estudo, os autores analisaram através de clonagem e sequenciamento os pontos de quebra de uma inversão bastante difundida nas populações de *D. buzzatii* (subgênero *Drosophila*), a inversão *2j*. Os autores encontraram grandes inserções em ambos os pontos de quebra da inversão *2j*, as quais não estão presentes em linhagens que não possuem esta inversão. Estas inserções não apresentaram homologia com nenhuma sequência até então depositada em bancos de dados, e suas características moleculares as identificaram como sendo um *TE* de classe II, o qual foi denominado *Galileo*. O mecanismo proposto para a origem da inversão *2j* pelo transposon *Galileo* seria recombinação ectópica entre as suas grandes repetições terminais invertidas (*TIRs*). Estudos posteriores encontraram associação de elementos *Galileo* com outras duas inversões de *D. buzzatii*: $2q^7$ (Casals *et al.*, 2003) e $2z^3$ (Delprat *et al.*, 2009). Novamente as análises dos pontos de quebra evidenciaram que a mais provável origem destas inversões tenha sido por recombinação ectópica entre diferentes cópias do *TE Galileo*. Buscas *in silico* no genoma das 12 espécies de *Drosophila* sequenciadas (Clark *et al.*, 2007) feitas por Marzo *et al.* (2008) evidenciaram que o *TE Galileo* está presente no genoma de mais seis espécies: *D. ananassae*, *D. willistoni*, *D. pseudoobscura*, *D. persimillis*, *D. mojavensis* (todas cromossomicamente polimórficas) e *D. virillis*.

Drosophila willistoni é uma espécie de origem neotropical pertencente ao subgrupo da *D. willistoni*, subgênero *Sophophora*, a qual apresenta diversas peculiaridades que a tornam um excelente organismo experimental. Dentre estas peculiaridades estão menor nível de uso preferencial de códons (Vicario *et al.*, 2007), maior números de rearranjos no “cluster” dos genes *Hox* (Negre *et al.*, 2005), virtual ausência de selenoproteínas (Chapple & Guigó, 2008) segunda

maior proporção de *TEs* de diferentes famílias (Clark *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2007) e altas taxas de rearranjos cromossômicos (Bhutkar *et al.*, 2008). Sob o ponto de vista cromossômico, *D. willistoni* é uma das espécies mais polimórficas do gênero *Drosophila* e a mais polimórfica do grupo *willistoni* (revisões em Ehrman & Powell, 1982; Krimbas & Powell, 1992, Da Cunha *et al.*, 1950; Townsend, 1952; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Da Cunha, 1955; Dobzhansky, 1957; Da Cunha *et al.*, 1959; Valente & Morales, 1985; Valente & Araújo, 1985; 1986; Valente *et al.*; 1993; Regner & Valente, 1993; Valente *et al.*, 2001), tendo em torno de 70 inversões paracêntricas segregantes devidamente descritas para a espécie e uma inversão pericêntrica (Rohde *et al.*, 2005). Nesta espécie, foram encontradas 495 cópias defectivas do *TE Galileo* através da análise *in silico* dos 12 genomas (Marzo *et al.*, 2008). Assim, esses achados abriram um amplo campo de estudos sobre a ligação entre o *TE Galileo* e a geração destes polimorfismos, bem como da sua relevância evolutiva, como agente promotor de variabilidade genética.

O presente trabalho avaliou a distribuição de cópias mais completas de *Galileo* nos cromossomos politênicos de *D. willistoni* através de hibridização *in situ*, na tentativa de se obter pistas para o estabelecimento de uma relação de causa e efeito entre a inserção do *TE Galileo* e os pontos de quebra de inversões, podendo assim auxiliar no direcionamento ao entendimento da dinâmica dos genomas.

Materiais e Métodos

Populações estudadas e condições de cultura

Foram utilizadas três linhagens de *D. willistoni*, oriundas de três locais distintos da distribuição da espécie (Figura 1).

- Gd-H4-1: linhagem coletada em 1990, em Guadaloupe, Caribe. Esta linhagem foi propositalmente endocruzada por nove gerações e por ter sido diagnosticada como homocariotípica pela especialista nesta espécie em nosso grupo (Vera L. S. Valente) foi a linhagem utilizada para o sequenciamento (Clark *et al.*, 2007) de *D. willistoni*.

- WIP-4: linhagem coletada em 1961, na localidade de Ibirapitanga, Bahia (12°54'S-38°19'W), pelos Drs. Antonio R. Cordeiro e Helga Winge. Desde então vem sendo mantida em nosso laboratório. Conforme estudos prévios de Dobzhansky (1950), linhagens desta região do país apresentavam baixo grau de polimorfismo cromossômico, o qual é o caso da linhagem em questão.
- 17A2: linhagem oriunda da cidade de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (30°05'S-51°39'W). Coletada em 1990, caracterizou-se por ser altamente polimórfica (Regner & Valente, 1993) e desde então vem sendo mantida em nosso laboratório.

Todas as populações são mantidas em meio de cultura padrão (Marques *et al.*, 1966) em câmara de 17°C ± 1°C.

Preparações cromossômicas para hibridização *in situ* nos cromossomos politênicos

A técnica utilizada no presente estudo foi a mesma usada por todos os grupos participantes do *Drosophila* 12 Genomes Consortium (Clark *et al.*, 2007) e do estudo cromossômico dele decorrente (Schaeffer *et al.*, 2008), uma vez que os preparados são permanentes e permitem a localização exata das bandas hibridizadas, possibilitando verificações posteriores.

Para os preparados cromossômicos, os adultos foram mantidos em meio de cultura padrão (Marques *et al.*, 1966), em baixa densidade, por dois dias em câmara de 25° ± 1°C. Após, estes adultos eram transferidos para outro recipiente e os recipientes anteriores, nos quais foram depositados ovos, eram passados para a câmara de 17°C ± 1°C para um desenvolvimento mais lento, e as larvas eram fartamente alimentadas com uma solução de levedura fresca a cada dois dias. As glândulas salivares foram obtidas de larvas em terceiro estágio de desenvolvimento. Estas glândulas foram dissecadas em solução fisiológica Ephrussi & Beadle (1936), transferidas para uma lâmina com uma gota de ácido acético 45%, onde permaneciam por pelo menos um minuto para a fixação. Após, eram acrescentadas duas gotas de fixador ácido acético: água: ácido láctico (3:2:1) e deixado agir por no mínimo 10 minutos. Sobre os preparados era colocada uma lamínula e com o auxílio de uma tampa de caneta esferográfica,

eram feitas leves batidas sobre o material seguido de leve esmagamento (*squash*). Após, o material foi analisado em fotomicroscópio de contraste de fase Zeiss e os melhores preparados foram então fixados com álcool 95° para as posteriores etapas da hibridização *in situ*.

Sonda utilizada para hibridização *in situ*

A sonda utilizada foi obtida por Gonçalves (2010) usando primers que anelam nas posições 846 pb e 3247 pb da maior variante de *Galileo* encontrada *in silico* na linhagem Gd-H4-1 de *D. willistoni* (Marzo *et al.*, 2008; GenBank número de acesso BK006360). Após sequenciamento do fragmento obtido (MacroGen Korea) e a identidade da sequência confirmada por BLAST (NCBI site), foi feita clonagem utilizando o vetor *pGEM®-T Easy Vector System* e a linhagem *TOP 10* de *Escherichia coli*. A extração foi feita através de lise alcalina, de acordo Sambrook *et al.* (1989). A marcação da sonda foi feita pelo método de *nick translation* com biotina (Bio-14-dATP) conforme especificações do *Kit BioNick™ DNA Labeling System* da *Invitrogen*. A revelação da mesma foi feita através do *kit* de revelação *Vector Laboratories*, sistema enzimático *ABC® Elite Vectastain*. Como esta sonda não inclui as *TIRs* do elemento, as quais são responsáveis pelo seu pareamento ectópico e recombinação, possivelmente dando origem às inversões (Cáceres *et al.*, 1999, Casals *et al.*, 2003; Delprat *et al.*, 2009); a mesma não alcança as cópias mais defectivas e somente tem a capacidade de captar as cópias mais completas e recentes de *Galileo* no genoma de *D. willistoni*. As sequências das *TIRs* serão utilizadas em etapas subsequentes do presente trabalho.

Hibridização *in situ*

Para a hibridização *in situ*, foi utilizado, essencialmente, o protocolo de Lim (1993), com algumas modificações: A concentração de NaOH para a desnaturação do material em Gd-H4-1 foi 0,0014M e em WIP-4 e 17A2 foi 0,07M. O tempo de desnaturação do material foi 1' 30" para todas as linhagens e a concentração do corante Giemsa foi 1%, bem como o tempo de coloração foi 1'30" para todas elas. Estes ajustes foram necessários, pois o material

cromossômico de *D. willistoni* é muito frágil, principalmente o da linhagem Gd-H4-1, que foi sequenciada.

Análises de inserções do elemento transponível Galileo e coincidência com pontos de quebra e inserções do elemento transponível P

Os preparados cromossômicos foram fotografados em fotomicroscópio Zeiss, sob contraste de fase. Foram analisados de quatro (WIP-4 e 17A2) a seis (Gd-H4-1) preparados cromossômicos por população. A determinação precisa dos pontos de inserções do transposon *Galileo* foi feita utilizando o último fotomapa aprimorado de *D. willistoni* (Schaeffer *et al.*, 2008). Seguindo um critério parcimonioso, somente foram considerados como locais de inserções do *TE Galileo*, os sítios que apresentavam 40% de marcações do total de braços (XL, XR, IIL e IIR) e cromossomo (III) analisados em cada população. A análise da coincidência destas inserções com os pontos de quebra para inversões paracêntricas e para a inversão pericêntrica foi baseada na descrição das inversões presentes na bibliografia (Da Cunha *et al.*, 1950; 1959; Townsend, 1952; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Da Cunha, 1956; Valente & Morales, 1985; Valente *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2005). Também foram determinados os sítios coincidentes de inserção do *TE Galileo* com os do elemento *P* conforme Regner *et al.* (1996), com a intenção de verificar a possível associação entre diferentes *TEs* em um mesmo local.

Com a finalidade de melhor visualizar as similaridades/dissimilaridades quanto aos sítios de inserções do *TE Galileo* em Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2 considerando cada braço cromossômico isoladamente, foram feitas análises através do coeficiente de similaridade *SM* (*Simple matching coefficient*) e pela construção de dendrogramas baseados no algoritmo *UPGMA* (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) (Sneath e Sokal, 1973). Tais análises foram feitas no programa NTSYS-pc v. 2.1 (Rohlf, 2000).

Os cromocentros dos núcleos fotografados também foram analisados quanto à presença de sinais de hibridizações do *TE Galileo*. Para tal, calculou-se a porcentagem de cromocentros com marcações visíveis do total de centrômeros analisados em cada população. Cada população somente foi considerada como

tendo sequências com homologia ao *TE Galileo* em seus cromocentros, se a sua porcentagem de centrômeros marcados alcançou pelo menos 40% do total de centrômeros observados, o que é um critério bastante rigoroso.

As análises estatísticas foram feitas por Teste Exato de Fisher no Programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). Para isto foi considerado o número total de pontos de quebras para inversões paracêntricas e pericêntricas, o número total de bandas visíveis ao nível ótico; o total de inserções do *TE Galileo*; e deste total, quantas inserções coincidiam com pontos de quebra para cada cromossomo em cada população. Também foi realizado o Teste Exato de Fisher considerando as inversões paracêntricas que compartilham (reuso do ponto de quebra por inversões distintas) alguns de seus pontos de quebra (as inversões que apresentaram algum ponto de quebra compartilhado com os de outras inversões, contaram como apenas um ponto de quebra). Desta maneira, o número total de pontos de quebra diminuiu em cada cromossomo. Os demais critérios citados acima permaneceram inalterados.

Alguns braços cromossômicos precisaram ser divididos em três partes de tamanhos semelhantes (proximal, média e distal) em Gd-H4-1 e 17A2 para facilitar a análise. A razão disto é que estes braços cromossômicos não se mantiveram íntegros em quase todos os preparados cromossômicos feitos nestas populações, não permitindo que estes fossem analisados quanto a sítios de inserção do *TE Galileo* em todo seu complemento cromossômico. As regiões melhor representadas nestes casos foram a distal e a proximal. Sendo assim, os registros dos sítios de inserção do *TE Galileo* e a análise estatística consideraram para o braço XR de 17A2 a região distal, e para o braço IIL, as regiões proximal e distal. Em Gd-H4-1, as análises do braço XR abrangem as regiões distal e média, para o braço IIL a região distal e para o braço IIR a região distal.

De acordo com Dobzhansky (1965) as inversões de *D. willistoni* podem ser classificadas de acordo com as suas distribuições geográficas em raras, restritas e universais. Sendo assim, as inserções do *TE Galileo* correspondentes a pontos de quebra nas populações analisadas foram classificadas seguindo este critério, incluindo análises prévias de Valente & Morales (1985) sobre o polimorfismo cromossômico de *D. willistoni*.

Resultados

Distribuição do elemento transponível Galileo nos cromossomos de D. willistoni

Sítios de inserções do *TE Galileo* foram encontrados em todos os cromossomos das três linhagens de *D. willistoni* estudadas (Figura 2). A Tabela 1 mostra o total de inserções encontradas em cada cromossomo juntamente com o total de coincidências com pontos de quebra para inversões paracêntricas e uma inversão pericêntrica em cada população. Destes, somente o braço cromossômico XL não apresentou coincidência entre o *TE Galileo* e pontos de quebra de inversões paracêntricas conhecidas. As inserções do *TE Galileo* foram mais abundantes no cromossomo III em todas as populações.

A Figura 3 mostra no fotomapa de *D. willistoni* (Schaeffer *et al.*, 2008) os sítios de inserção do *TE Galileo*, nos braços cromossômicos XR, XL, IIR e IIL e no cromossomo III, bem como os sítios que coincidem com pontos de quebra de inversões nas populações estudadas (Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2) além das inserções do elemento *P* em 17A2 (Regner *et al.*, 1996).

O braço cromossômico XL apresentou 14 sítios de inserção do *TE Galileo*. Não houve associação entre o *TE Galileo* com ponto de quebra para inversão paracêntrica, porém houve associação com um ponto de quebra da inversão pericêntrica XLXR-p (3D) (Rohde *et al.*, 2005) em Gd-H4-1 e WIP-4. As bandas das subseções 4A e 6D apresentaram também coincidências com inserções do elemento *P*.

O braço cromossômico XR apresentou 13 sítios de inserção do *TE Galileo*, dos quais três correspondem a pontos de quebra para inversões paracêntricas (30C, 31D e 35C), bem como um sítio corresponde ao outro ponto de quebra da inversão pericêntrica XLXR-p (19A) em WIP-4. As bandas marcadas nas subseções 28B e 34B apresentaram coincidências com inserções do elemento *P*.

O braço cromossômico IIL apresentou 11 sítios de inserção do *TE Galileo*, sendo dois destes correspondendo a pontos de quebra das inversões paracêntricas (55A e 55C). As subseções 37B e 38A apresentaram bandas marcadas, coincidentes com inserções do elemento *P*.

O braço cromossômico IIR apresentou 18 sítios de inserções do *TE Galileo* dos quais três correspondem a pontos de quebra para inversões paracêntricas (nas subseções 69C, 71A e 77C). O sinal na subseção 69A é ponto de quebra para mais de uma inversão descrita (IIR-F e IIR-RN). Nas subseções 59A e 61A as marcações apresentaram coincidências com inserção do elemento *P*, anteriormente detectadas por Regner *et al.* (1996).

O cromossomo III apresentou 43 sítios de inserção do *TE Galileo*, sendo que destes 12 correspondem a pontos de quebra para inversões paracêntricas (nas subseções 81C, 84A, 84D, 86D, 90A, 91A, 94D, 95B, 97B, 98B, 100B e 100C). Quatro subseções são utilizadas como pontos de quebra para mais de uma inversão: 81C (III-N, III-O, III-V), 84A (III-P₁ e III-X), 90A (III-C e III-D) e 95B (III-Q e III-V₁). Na subseção 94D, a inserção do *TE Galileo* também coincide com a inserção do elemento *P*.

Considerando as três linhagens, foram encontrados 100 sítios de inserção do *TE Galileo*, dos quais 20 correspondem a pontos de quebra de inversões paracêntricas, dois sítios correspondem a pontos de quebra para uma inversão pericêntrica e 10 sítios coincidem com inserções do elemento *P*.

As similaridades/dissimilaridades das linhagens Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2 quanto ao compartilhamento de sítios de inserção do *TE Galileo* estão apresentadas na Figura 4. Dos cinco dendrogramas gerados, os correspondentes ao braço XL e o cromossomo III são os que revelaram maior similaridade quanto aos sítios de inserção do *TE Galileo* entre Gd-H4-1 e WIP-4. Estas populações compartilham marcações nas subseções 1B, 3D, 4A e 16B no braço cromossômico XL e nas subseções 79A, 81C, 83A, 84C, 87E, 90A, 91A, 94D, 95B, 99C, 99D e 100C do cromossomo III. Já os dendrogramas correspondentes aos braços XR, IIL e IIR apresentaram maiores similaridades entre Gd-H4-1 e 17A2. As marcações em bandas de subseções compartilhadas entre estas populações ocorreram em 30C e 35C no braço cromossômico XR, 55C no braço cromossômico IIL e 71A, 77B e 77C no braço cromossômico IIR, cabendo ressaltar que justamente estes braços não foram amostrados igualmente nestas populações. Os sítios marcados nos braços cromossômicos XL, XR, IIL e IIR apresentaram entre todas as populações, mais de 80% de similaridade. Já o

cromossomo III apresentou a maior variação quanto aos sítios de inserção entre as três populações (68% de similaridade).

A análise de hibridização *in situ* do *TE Galileo* revelou ainda que 48%, 97% e 85% dos cromocentros, considerando Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2 respectivamente, apresentaram forte marcação com a sonda utilizada (Tabela 2). Estas marcações foram predominantemente encontradas na região de β -heterocromatina (Figura 5).

As análises estatísticas da coincidência entre bandas marcadas para a presença do *TE Galileo* e pontos conhecidos de quebras de inversões, considerando o total de pontos de quebra, foram significativas apenas para os braços cromossômicos XR em Gd-H4-1 e WIP-4 e IIL em Gd-H4-1. Considerando o reuso dos pontos de quebra, os resultados também foram significativos para as inserções do *TE Galileo* no cromossomo III em Gd-H4-1 e WIP-4. Em 17A2 não houve associação significativa entre os sítios de inserção do *TE Galileo* e os pontos de quebra (Tabela 3).

As análises da distribuição geográfica das inversões descritas para *D. willistoni* mostrou maior coincidência dos sítios de inserções de *Galileo* com pontos de quebra de inversões de distribuição restrita (Tabela 4).

Discussão

A análise da presença de sítios de inserções do *TE Galileo* em todos os cromossomos de *D. willistoni* (Figura 2) aponta uma questão interessante a ser destacada que é compartilhamento destes sítios de inserção em linhagens de origem geográfica distintas. Considerando as três linhagens, as marcações das mesmas bandas nas subseções 1B do braço cromossômico XL, 30C do braço cromossômico XR, 55C do braço cromossômico IIL, 71A, 77B e 77C do braço cromossômico IIR e 79A, 81C, 87E, 90A, 91A, 94D e 100C no cromossomo III são compartilhadas quanto à sítios de inserção de *Galileo*.

Alguns estudos têm mostrado a distribuição intra-específica de *TEs* considerando origens geográficas distintas. Vieira & Biémont (1996) realizaram uma análise detalhada sobre a variação geográfica da localização e do número de inserções do retrotransposon 412 em linhagens de *D. simulans* procedentes de

diferentes partes do mundo. Através da análise por hibridização *in situ* os autores encontraram grande variação nos sítios de inserção do retrotransposon 412. Esta variação não foi associada à distribuição geográfica, mas sim à considerável taxa de transposição do elemento, que teria invadido o genoma de *D. simulans* há pouco tempo, seguida por rearranjo genômico e por migração. Por sua vez, Zelentsova *et al.* (1999), analisaram a distribuição das famílias de *TEs Penelope* e *Ulysses* em espécies do grupo da *D. virilis*. Nos cromossomos politênicos, a vasta maioria dos sítios de inserção eucromáticos destes elementos (79 sítios de inserção para o *TE Penelope* e 47 sítios para o *TE Ulysses*, considerando todas as espécies do grupo, exceto *D. virilis*) foi encontrada em apenas uma linhagem geográfica de cada uma das espécies (*D. lummei*, *D. texana*, *D. americana*, *D. novamexicana*, *D. montana*, *D. kanekoi*, *D. flavomontana*, *D. borealis*, *D. lacicola*, *D. littoralis*, *D. ezoana*). Assim, os autores não detectaram qualquer sítio de inserção destes elementos comum a todas as linhagens da distribuição geográfica de todas as espécies estudadas, sugerindo a ocorrência de mais de uma invasão destes elementos no genoma das espécies do grupo da *D. virilis*.

As análises das similaridades/dissimilaridades entre as três populações avaliadas no presente estudo (Figura 3) quanto ao compartilhamento de sítios de inserção do elemento *Galileo* nos cromossomos de *D. willistoni* mostraram altas taxas de similaridade entre bandas hibridizadas, principalmente nos cromossomos X e II. Estas análises não consideraram apenas os sítios comuns às três populações, mas sim, todos os sítios presentes. Estes resultados reforçam nossa inferência de que as três linhagens, apesar de origens geográficas distintas, são consideravelmente semelhantes quanto aos sítios de inserção do *TE Galileo*, diferentemente do que foi encontrado pelos estudos anteriores (Vieira & Biémont, 1996; Zelentsova *et al.*, 1999). O compartilhamento de sítios de inserção do *TE Galileo*, assim, parece estar indicando, que ele é muito antigo no genoma de *D. willistoni*.

Outro resultado visível relacionado a estas semelhanças quanto aos sítios de inserção do *TE Galileo* é que dos 13 sítios citados acima e que são compartilhados entre as três linhagens, nove coincidem com pontos de quebra para inversões paracêntricas já descritas (bandas marcadas em 30C no braço

cromossômico XR, 55C no braço cromossômico IIL, 71A e 77C no braço cromossômico IIR e 81C, 90A, 91A, 94D e 100C).

Destes resultados, chama a atenção ainda, a presença de maior número de sítios de inserção do elemento *Galileo* no cromossomo III. Também foi neste cromossomo, que ocorreu o maior número de coincidências entre sítios de inserção do *TE Galileo* e pontos de quebra de inversões nas três linhagens, em comparação com os outros braços cromossômicos. Desde a descrição dos cromossomos politênicos de *D. willistoni* por Dobzhansky (1950), o III tem sido considerado como um dos melhores para se analisar o complemento cromossômico da espécie devido ao seu maior tamanho em relação aos demais. Uma peculiaridade do cromossomo III é estar fusionado com o IV cromossomo (pontual), segundo a classificação de Muller (1940), na sua região proximal de acordo com estudo de Papaceit & Juan (1998). Nossos resultados mostram a presença do *TE Galileo* na seção 78 em WIP-4 e 17A2, justamente a seção inferida pelas autoras como correspondente ao cromossomo pontual, presente em várias espécies de *Drosophila*. Conforme Schaeffer *et al.* (2008), análises genômicas da junção III/IV revelaram a presença de repetições com 107 e 141 pb, as quais se assemelham a um elemento *P* de *D. sturtevantii*, sugerindo a ação de *TEs* nessa fusão e subsequente rearranjo. Nossos dados com o elemento *Galileo* dão suporte a esta hipótese.

Seguindo as análises da Figura 3, é possível visualizar também a coincidência entre sítios de inserção do *TE Galileo* e sítios de inserção do elemento *P* (Regner *et al.*, 1996). Estudos em diferentes linhagens de *D. buzzatii* portando a inversão 2j revelaram que a entrada do transposon *Galileo* foi seguida por uma alta reestruturação não reportada anteriormente, sendo encontradas 22 inserções de 10 outros *TEs*, 13 deleções, uma duplicação e uma pequena inversão interna nos pontos de quebra desta inversão (Cáceres *et al.*, 2001). Nossas análises apenas permitem inferir que há associação visível entre sítios compartilhados pelos elementos *Galileo* e *P*. No presente estudo, dos 100 sítios de inserção do elemento *Galileo* encontrados, 10 correspondem a sítios de inserção do elemento *P* e destes, uma inserção corresponde a um ponto de quebra da inversão III-U (em 94D, no cromossomo III). Explorando mais o estudo

sobre elemento *P* em *D. willistoni* (Regner *et al.*, 1996), até mesmo o padrão de distribuição entre os cromossomos foi diferente do padrão do *TE Galileo* (considerando cópias mais completas), uma vez que o elemento *P* teve maior prevalência nos braços cromossômicos XL e IIR (Regner *et al.*, 1996) e o *TE Galileo* teve maior prevalência no III cromossomo, seguido pelo braço cromossômico IIR.

Os resultados obtidos nas análises dos cromocentros se mostraram bastante interessantes. Todas as linhagens tiveram seus cromocentros marcados com a sonda do *TE Galileo* utilizada (Figura 5), sendo que a região preferencial foi a β -heterocromatina. Isto implica que existem muitas outras cópias do *TE Galileo* no genoma de *D. willistoni* do que as reportadas pela análise *in silico* (Marzo *et al.*, 2008). Alguns outros trabalhos exploraram a distribuição de diferentes *TEs* nos cromossomos e evidenciaram sua maior prevalência em regiões de baixa recombinação, tais como as regiões heterocromáticas nos cromossomos.

No trabalho da Carmena & González (1995), os autores analisaram a distribuição de oito elementos transponíveis em *D. melanogaster*: *mdg1*, *mdg3*, *copia*, *gypsy*, *hobo*, *Doc*, *FB* e *I* nos seus cromossomos. Todos os elementos transponíveis analisados, com exceção do elemento *hobo*, estavam amplamente distribuídos em blocos ao longo da heterocromatina mitótica. De uma maneira geral, eles foram encontrados tanto na α -heterocromatina quanto na β -heterocromatina, com maior predominância nesta, algumas vezes muito próximos ao centrômero, e até mesmo no meio da constrição primária. O elemento *hobo* só foi encontrado na β -heterocromatina do cromossomo X. O padrão de distribuição destes *TEs* foi uniforme em diferentes linhagens de *D. melanogaster*, sendo que geralmente esta uniformidade é alterada quando um rearranjo cromossômico ocorre.

Um elemento da família *Hoppel* de *TEs* denominado *BBH2M*, bem como uma sequência conservada de dois outros componentes desta família: *DmHoppel* e *DmIS1630* tiveram seu padrão de distribuição analisado por Coelho *et al.* (1998), através de hibridização *in situ* em cromossomos politênicos e cromossomos mitóticos em *D. melanogaster*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. teissieri*, *D. yakuba* e *D. virilis*. Os resultados

mostraram que esta família de transposons hibridiza em uma porção substancial do cromocentro e em quase todo o quarto cromossomo (pontual) em *D. melanogaster*. Esta família também estava presente em *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. teissieri* e *D. yakuba*, mas ausente em *D. erecta* (mesmo subgrupo), *D. ananassae*, *D. pseudoobscura* e *D. virilis*. *Drosophila teissieri* e *D. yakuba* mostraram sinais fracos ao longo dos cromossomos politênicos. *Drosophila simulans* e *D. mauritiana* mostraram sinais mais fortes nos cromossomos politênicos e um padrão de hibridização semelhante ao de *D. melanogaster* nos cromossomos mitóticos. Entretanto, o cromossomo X de *D. simulans* mostrou apenas um sinal muito fraco perto da transição heterocromatina-eucromatina. Os autores inferem que este elemento está distribuído *in tandem* na heterocromatina e que a identificação desta família de transposons exclusivamente dentro de espécies do subgrupo da *D. melanogaster* e seu padrão conservado de localização na heterocromatina mitótica pode sugerir que ele estava presente em uma espécie ancestral comum ao subgrupo. Uma análise posterior do *TE Galileo* na heterocromatina centromérica das demais espécies do grupo *willistoni*, poderá nos fornecer informações desta natureza.

Já o trabalho de Casals *et al.* (2009) analisou a distribuição cromossômica de seis transposons em *D. buzzatii*, os quais foram caracterizados por serem inserções secundárias ao *TE Galileo* em pontos de quebras de inversões nesta espécie (Cáceres *et al.*, 2001; Casals *et al.*, 2003): *BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT4*, *BuT5* e *BuT6*. A distribuição destes *TEs* seguiu o padrão encontrado para *D. melanogaster* no estudo anterior, uma vez que estes se inseriram preferencialmente no cromossomo VI (pontual) da espécie e nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos. Sendo assim, os autores inferem que seus resultados suportam o papel da taxa de recombinação em determinar a distribuição dos *TEs*.

Em relação às análises estatísticas, apesar de nem todas as associações entre inserções do *TE Galileo* e pontos de quebra para inversões serem significativas (Tabela 3), a baixa significância estatística já era previsível *a priori*, devido à grande quantidade de pontos de quebras presentes; por esse motivo é que quando consideramos o reuso dos pontos de quebra, estas associações no

cromossomo III também se tornam significativas. O reuso de pontos de quebra de inversões tem sido implicado com a presença de “hotspots” para a ocorrência de quebras cromossômicas (Cáceres *et al.*, 1997; Butkar *et al.*, 2008). Novamente esta característica é uma peculiaridade do cromossomo III, com poucos casos descritos nos cromossomos X e II de *D. willistoni*. Cabe ressaltar que os resultados significativos estatisticamente, ou não, referem-se somente às cópias do elemento que a sonda utilizada resgata: as mais completas.

Supõe-se que, caso uma inversão seja consequência da atividade de *TEs*, haja maior visualização destes em pontos de quebra de inversões endêmicas ou raras em populações naturais, por estas serem provavelmente mais recentes na história evolutiva do organismo, representando assim atividades recentes destes *TEs* (Lyttle & Haymer, 1992; Regner *et al.*, 1996; Zelentsova *et al.*, 1999). Conforme visto na Tabela 4, *D. willistoni* apresenta grande parte da sua associação do *TE Galileo* com inversões de distribuição restrita e endêmica, de acordo com o critério estabelecido por Dobzhansky (1965). Uma característica do *TE Galileo* é o fato de ele não necessitar estar ativo para que ocorra recombinação ectópica entre as suas cópias e assim dar origem a um rearranjo cromossômico. A associação do *TE Galileo* com inversões de distribuição mais restrita, entretanto, não depende exclusivamente da atividade mais recente deste elemento, mas pode também depender das suas características estruturais e moleculares capazes de formar estrutura secundária e de promover quebras (Casals *et al.*, 2005). Conclusões definitivas, portanto, ainda não podem ser feitas sobre a origem destas inversões baseadas em nossos resultados.

Com base em todos os pontos citados até então, nossos resultados permitem inferir uma pista sobre a história do *TE Galileo* em *D. willistoni*. O padrão consideravelmente preservado da distribuição dos sítios de inserção de *Galileo* em linhagens de origem distintas da distribuição geográfica da espécie, bem como a sua presença nos cromocentros indica que *Galileo* é um *TE* relativamente antigo no genoma desta espécie. Sendo assim, deste pressuposto, duas trajetórias podem ter ocorrido: ou ocorreram mais de uma invasão no genoma da espécie, ou este elemento uma vez que se inseriu se transpôs por bastante tempo. Ambas explicariam a considerável quantidade de sítios de

inserção (100 sítios de inserção) visíveis nos braços cromossômicos, considerando apenas as cópias mais completas. De acordo com o trabalho de Marzo *et al.* (2008), que analisou o tempo de divergência desde o mais recente evento de transposição do *TE Galileo* através da comparação das cópias mais defectivas encontradas nas análises *in silico* dos 12 genomas de *Drosophila* disponíveis, foram encontradas evidências de recente atividade do *TE Galileo* com menos de 1 milhão de anos em *D. willistoni* (e também em *D. pseudoobscura*, *D. ananassae* e *D. persimilis*, todas cromossomicamente polimórficas). Em *D. mojavensis* a atividade mais recente foi há 1,5 milhões de anos, e em *D. virilis*, a qual é na atualidade virtualmente monomórfica, há 3 milhões de anos.

Nossos achados também concordam com a hipótese da acumulação de *TEs* em regiões de baixa recombinação (Charlesworth & Langley, 1989; Charlesworth *et al.*, 1994), tais como, no nosso caso, o cromocentro e as regiões invertidas. A melhor demonstração deste quadro é visualizada no cromossomo III (Figura 2). Apesar de não se ter dados mais detalhados sobre as taxas de recombinação em *D. willistoni*, é fato notório neste cromossomo a maior prevalência de sítios de inserção do *TE Galileo*, bem como os que destes são associados a inversões. Provavelmente estas inserções alcançaram a fixação de uma forma neutra. O braço XL também é conhecidamente polimórfico em *D. willistoni*, entretanto, nossas análises não encontraram a mesma prevalência de sítios de inserções do *TE Galileo* neste braço como no cromossomo III, sugerindo com isto maior ação da seleção neste braço cromossômico (XL).

Referências bibliográficas

- Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL and Santos AS (2007) BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil de Mamirauá, Belém.
- Biessmann H, Champion LE, O'Hair M, Ikenaga K, Kasravi B, *et al.* (1992) Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* *HeT-A* transposable elements to receding chromosome ends. *Embo J* 11(12): 4459-4469.
- Bhutkar A, Schaeffer SW, Russo SM, Xu M, Smith TF, *et al.* (2008) Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. *Genetics* 179(3):1657- 1680.
- Cáceres M, Barbadilla A and Ruiz A (1997) Inversion Length and Breakpoint Distribution in the *Drosophila buzzatii* Species Complex: Is Inversion Length a Selected Trait? *Evolution* 51 (4): 1149-1155.
- Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M and Ruiz A (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science* 285: 415-418.
- Cáceres M, Puig M and Ruiz A (2001) Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. *Genome Res* 11:1353–1364
- Capy P, Bazin C, Higuete D and Langin T (1998) *Dinamics and Evolution of Transposables Elements*. 1st edition. Landes Bioscience, France, 197 pp.
- Carmena M and González C (1995) Transposable elements map in a conserved pattern of distribution extending from beta-heterochromatin to centromeres in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 103:676–684.
- Casals F, Cáceres M and Ruiz A (2003) The Foldback-like transposon *Galileo* is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. *Mol Biol Evol* 20 (5): 674-685.
- Casals F, Cáceres M, Manfrin MH, González J and Ruiz A (2005) Molecular characterization and chromosomal distribution of *Galileo*, *Kepler* and *Newton*, three foldback transposable elements of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Genetics* 169:2047–2059.
- Casals F, González J and Ruiz A (2009) Abundance and chromosomal distribution of six *Drosophila buzzatii* transposons: *BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT4*, *BuT5* and *BuT6*. *Chromosoma* 115:403–412.
- Chapple CE and Guigó RR (2008) Relaxation of Selective Constraints Causes Independent Selenoprotein Extinction in Insect Genomes. *Plos One* 3 (8): e2968.

Charlesworth B and Langley CH (1989) The population genetics of *Drosophila* transposable elements. *Annu Rev Genet* 23:251–287

Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220.

Ciapponi L and Cenci G (2008) Telomere capping and cellular checkpoints: clues from fruit flies. *Cytogenet Genome Res* 122(3-4): 365-73.

Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, *et al.* (2007) *Drosophila* 12 Genomes Consortium. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 480: 2003-218.

Coelho PA, Queiroz-Machado J, Hartl D and Sunkel SE (1998) Pattern of chromosomal localization of the *Hoppel* transposable element family in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Chromosome Res* 6: 385-395

Da Cunha AB, Burla H and Dobzhansky T (1950) Adaptive Chromosomal Polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* 4 (3): 212-235.

Da Cunha AB and Dobzhansky T (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to environment. *Evolution* 8: 119-134.

Da Cunha AB (1955) Chromosomal Polymorphism in the Diptera. *Adv in Genet* 7: 93-138.

Da Cunha AB (1956) Differential viability favoring inversion heterozygotes In *Drosophila willistoni*. *Evolution* 10:7-56.

Da Cunha AB, Dobzhansky T, Pavlovsky O and Spassky B (1959) Genetics of natural populations XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism In *Drosophila willistoni* in Its relation to the environment. *Evolution* 13: 389-404.

Delprat A, Negre B, Puig M and Ruiz A (2009) The transposon *Galileo* generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination. *PLoS One* 18:4(11): e7883.

Dimitri P (1997) Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 100:85–93

Dimitri P, Junakovic N and Arca B (2003) Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 20:503–512

Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G, *et al.* (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118:419–435.

Dobzhansky T (1950) The chromosomes of *Drosophila willistoni*. *J. Heredity* 41: 156-158.

Dobzhansky T (1957) Genetics of natural populations. XXVI. Chromosomal variability In Island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution* 11:280-293.

Dobzhansky T (1965) "Wild" and "Domestic" species of *Drosophila*. In: *The Genetics of Colonizing Species*. Baker HG and Stebbins GL (eds). Academic Press, New York, pp 533-546.

Ehrman L and Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL and Thompson Jr. JN (eds). Academic, New York, 3b: 193-225.

Ephrussi B and Beadle GW (1936) A technique of transplantation for *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 70: 6-8.

Feschotte C and Pritham EJ (2007) DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet* 41: 331–368

Finnegan DJ (1992) Transposable elements. *Curr Opin Genet Dev* 2: 861–867.

Gray YHM (2000) It takes two transposons to tango. Transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends in Genet* 16 (10): 461-468.

Gonçalves JW (2010) Elemento transponível *Galileo* no genoma de espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS. 76 pp.

Junakovic N, Terrinoni A, Di Franco C, Vieira C and Loevenbruck C (1998) Accumulation of transposable elements in the heterochromatin and on the Y chromosome of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. *J Mol Evol* 46: 661–668.

Krimbas CB and Powell JR (1992). Chromosomal Polymorphism in Natural and Experimental Populations In: *Drosophila Inversion Polymorphism*. Krimbas CB and Powell JR (eds), CRC, Florida, pp 2-52.

Lim JK (1993) *In situ* hybridization with biotinylated DNA. *DIS* 72: 73-77.

Lyttle TW and Haymer DS (1992) The role of the transposable element *hobo* in the origin of endemic inversions in wild populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 86: 113-126.

Marques EK, Napp M, Winge H and Cordeiro AR (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *DIS* 41:187.

Marzo M, Puig M and Ruiz A (2008) The Foldback-like element *Galileo* belongs to the *P* superfamily of DNA transposons and is widespread within the *Drosophila* genus. *PNAS* 105 (8): 2957-2962.

McDonald JF, Matyunina LV, Wilson S, Jordan IK, Bowen NJ, *et al.* (1997) LTR retrotransposons and the evolution of eukaryotic enhancers. *Genetica* 100: 3–13.

Muller HJ (1940) Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In *The New Systematics*, J. Huxley (ed). Clarendon, Oxford, 185 pp.

Negre B, Casillas S, Suzanne M, Sánchez-Herrero E, Akam M, *et al.* (2005) Conservation of regulatory sequences and gene expression patterns in the disintegrating *Drosophila Hox* gene complex. *Genome Res* 15(5): 692-700.

Nuzhdin SV, Pasyukova EG and Mackay TF (1997) Accumulation of transposable elements in laboratory lines of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 100: 167–175.

Papacit M and Juan E (1998) Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 6 (1):49-54.

Pardue ML, Rashkova S, Casacuberta SE, DeBaryshe PG, George JA, *et al.* (2005) Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Res* 13 (5): 443-453.

Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, *et al.* (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3804–3808.

Regner LP and Valente VLS (1993) *Drosophila willistoni* mating activity-urbanization effects and a search for its chromosomal basis. *Evolución Biológica* 7: 327-349.

Regner LP, Pereira MSO, Alonso CEV, Abdelhay E and Valente VLS (1996) Genomic distribution of *P* elements in *Drosophila willistoni* and a search for their relationship with chromosomal inversions. *J Hered* 87: 191-198.

Rohde C, Degrandi TH, De Toni DC and Valente VLS (2005) *Drosophila willistoni* polytene chromosomes. I. Pericentric inversion on X chromosome. *Caryologia* 58 (3): 249-254.

Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniats T (1989) *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 2nd edition. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory, p 1.38.

Schaeffer SW, Bhutkar A, McAllister BF, Matsuda M, Matzkin LM, *et al.* (2008) Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics*. 179(3): 1601-55.

Sheen FM and Levis RW (1994) Transposition of the *LINE*-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26): 12510-1214.

Sneath PHA and Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco, 573pp.

Stark A, Lin MF, Kheradpour P, Pedersen JS, Parts L, *et al.* (2007) Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature*. 450(7167): 219-232.

Townsend JJ (1952) Genetics of marginal populations of *Drosophila willistoni*. *Evolution* 6: 428-442.

Valente VLS and Morales NB (1985) New inversions and qualitative description of inversion heterozygotes in natural populations of *Drosophila willistoni* inhabiting two different regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Bras J Gen* 8: 167-173.

Valente VLS and Araújo AM (1985) Observations on the chromosomal polymorphism of natural populations of *Drosophila willistoni* and its association with the choice of feeding and breeding sites. *Bras J Gen* 8: 271-284.

Valente VLS and Araújo AM (1986) Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* 57: 149-159.

Valente VLS, Rusczyk A and Santos RA (1993) Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Bras J Gen* 16: 307-319.

Valente VLS, Goñi B, Valiati VH, Rohde C and Morales NB (2001) Chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* populations from Uruguay. *Genet Mol Biol* 26 (2): 163-173.

Vaury C, Bucheton A and Pelisson A (1989) The beta heterochromatic sequences flanking the I elements are themselves defective transposable elements. *Chromosoma* 98(3): 215-24.

Vicario S, Moriyama EM and Powell JR (2007) Codon usage in twelve species of *Drosophila*. *BMC Evol Biol* 15: 7:226.

Vieira C and Biémont C (1996) Geographical variation in insertion site number of retrotransposon 412 in *Drosophila simulans*. *J Mol Evol* 42(4): 443-51.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, *et al.* (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973-982.

Yamamoto MT, Mitchelson A, Tudor M, O'Hare K, Davies JA, *et al.* (1990) Molecular and cytogenetic analysis of the heterochromatin-euchromatin junction

region of the *Drosophila melanogaster* X chromosome using cloned DNA sequences. *Genetics* 125(4): 821-32.

Zelentsova H, Poluectova H, Mnjoian L, Lyozin G, Veleikodvorskaja V, *et al.* (1999) Distribution and evolution of mobile elements in the *virilis* species group of *Drosophila*. *Chromosoma* 108(7): 443-56.



Figura 1: Mapa indicando a localização geográfica das três linhagens de *Drosophila willistoni* utilizadas no presente estudo.



Figura 2: Sítios de hibridizações do transposon *Galileo* nos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni*. Sítios hibridizados são indicados por flechas e por números e letras correspondentes às seções e subseções cromossômica do fotomapa da espécie. a) braço cromossômico XL em Gd-H4-1, b) braço cromossômico XR em WIP-4, c) braço cromossômico IIL em WIP-4, d) braço cromossômico IIR em WIP-4, e) cromossomo III em Gd-H4-1 e f) cromossomo III em Gd-H4-1. Barra: 10µm.

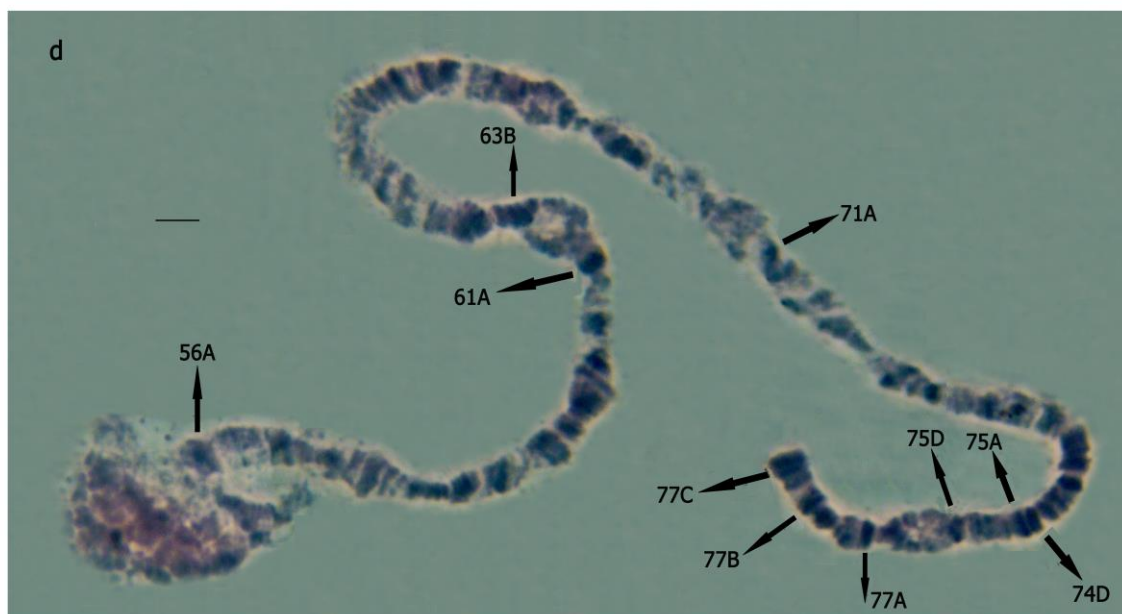


Figura 2: continuação

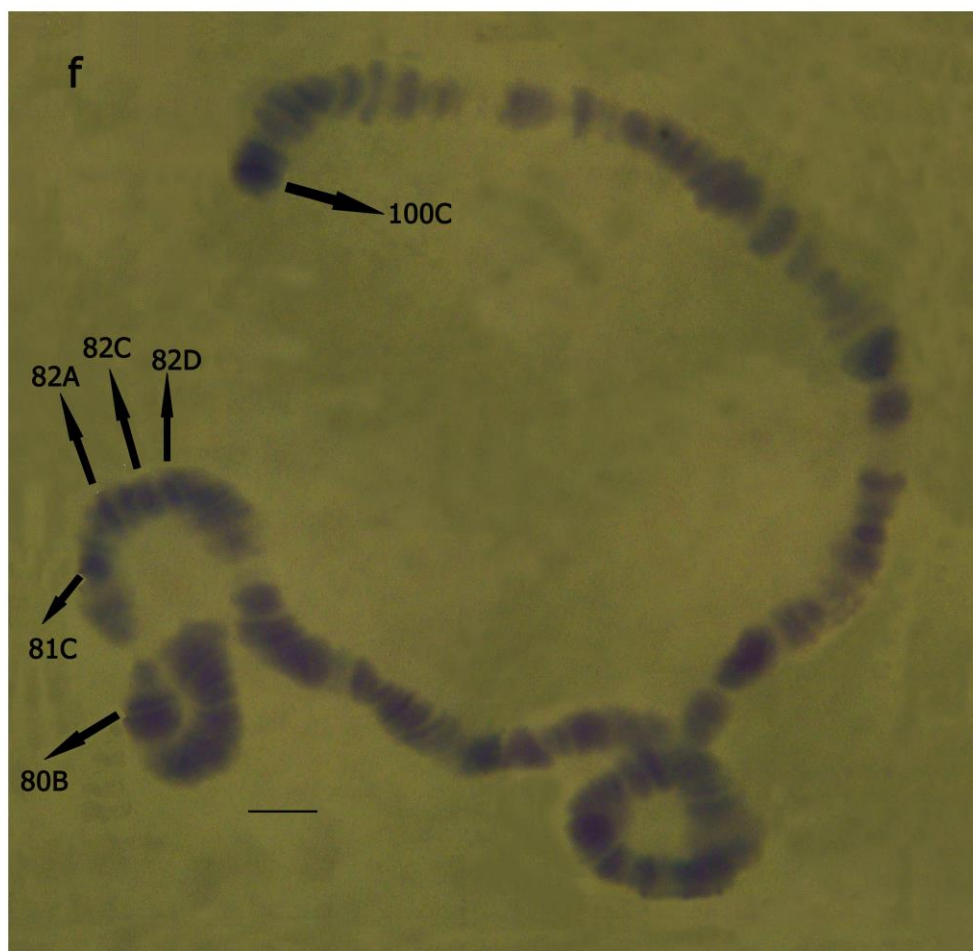
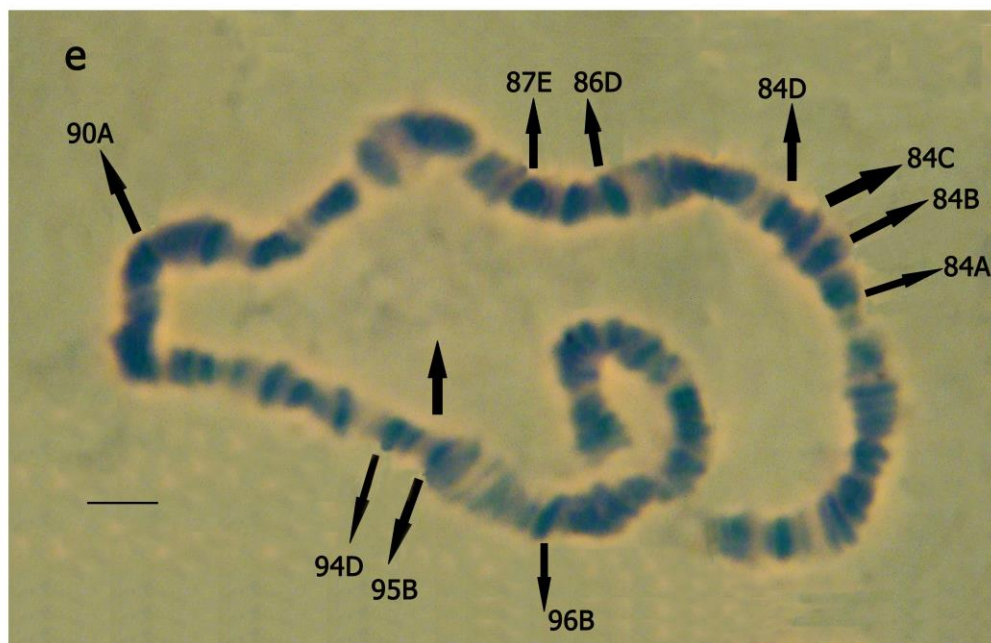


Figura 2: continuação.

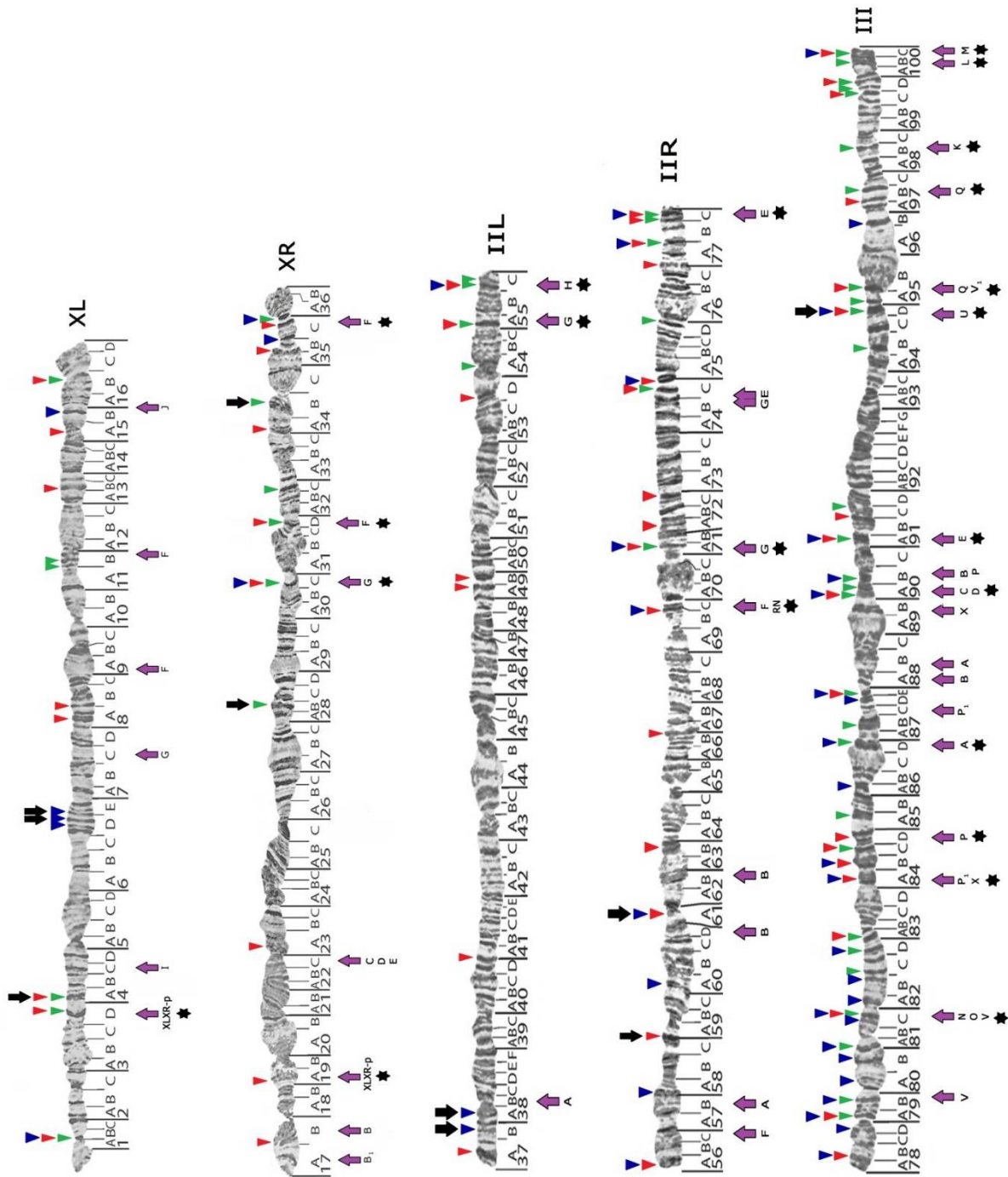


Figura 3: Sítios de inserções de *Galileo* nas populações estudadas (Gd-H4-1 triângulos verdes, WIP-4 triângulos vermelhos e 17A2 triângulos azuis) nos braços cromossômicos XR, XL, IIR e IIL e no cromossomo III. Sítios que correspondem a pontos de quebra de inversões são indicados por flechas roxas abaixo, os asteriscos abaixo destas indicam coincidência entre inserção de *Galileo* e ponto de quebra. Letras indicam o nome da inversão envolvida. Setas pretas acima indicam coincidência entre inserção de *Galileo* e inserção de elemento *P* de acordo com Regner *et al.* (1996). Fotomapa de *Drosophila willistoni* modificado de Schaeffer *et al.* (2008).

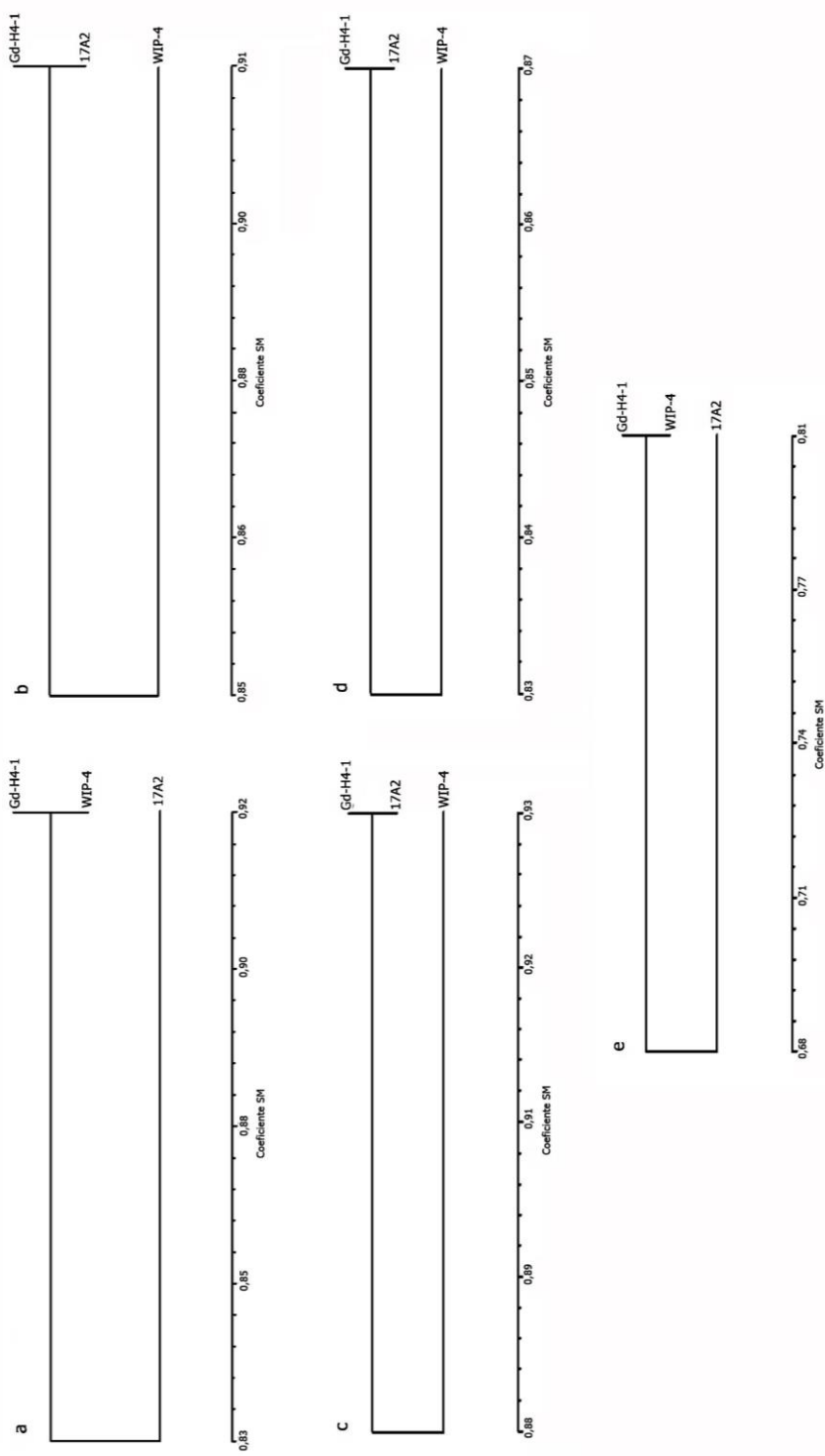


Figura 4: Similaridades/dissimilaridades dos sítios de inserção de *Galileo* nos cromossomos de *Drosophila willistoni* nas populações analisadas (Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2). a) XL, b) XR, c) IIL, d) IIR, e) III.

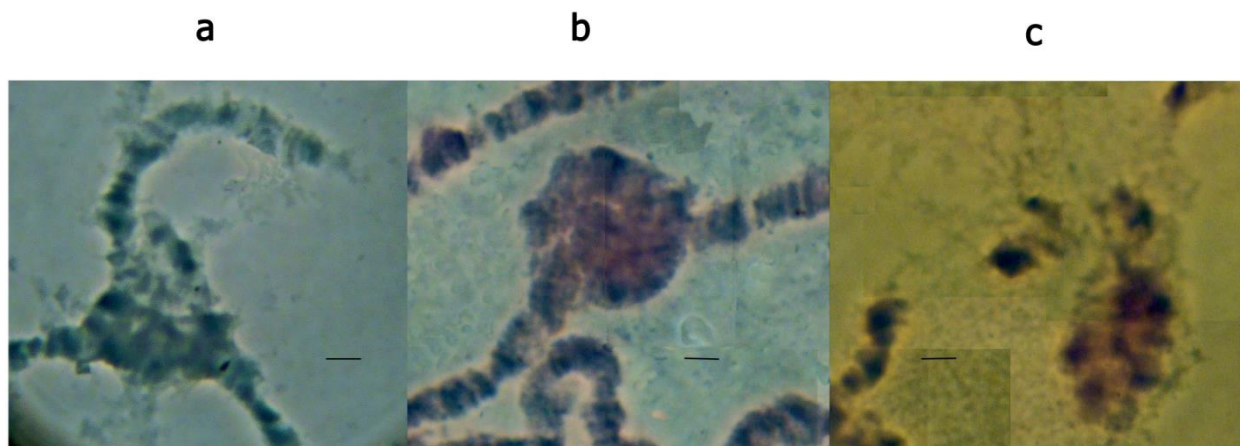


Figura 5: Cromocentros de indivíduos das populações analisadas de *D. willistoni* marcados com a sonda de *Galileo* utilizada. a) Gd-H4-1 b) WIP-4 c) 17A2. Barra: 10µm.

Tabela 1: Total de sítios de inserções do *TE Galileo* e total de sítios coincidentes com pontos de quebra de inversões em cada cromossomo das populações de *Drosophila willistoni* estudadas (Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2). IG: inserções do *TE Galileo*; CPQ: coincidência com pontos de quebra de inversões.

Populações	Gd-H4-1		WIP-4		17A2	
Braço cromossômico	IG	CPQ	IG	CPQ	IG	CPQ
XL	7	1	8	1	5	0
XR	6	2	8	3	3	1
IIL	4	2	7	2	3	1
IIR	6	2	15	3	8	3
III	28	10	18	8	24	7

Tabela 2: Cromocentros hibridizados com o *TE Galileo* nas três populações analisadas de *Drosophila willistoni* (Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2). Primeira coluna mostrando total de cromocentros analisados; segunda coluna mostrando total dos cromocentros fortemente marcados com a sonda de *TE Galileo*.

População	Total de cromocentros analisados	Total de cromocentros marcados
Gd-H4-1	25	12
WIP-4	41	40
17A2	27	23

Tabela 3: Valores de **p** obtidos por Teste Exato de Fisher bilateral para cada cromossomo em cada população de *Drosophila willistoni* analisada (Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2), considerando nas duas primeiras colunas, o número total de pontos de quebra de inversões e os sítios de inserção do *TE Galileo* e nas duas últimas, o número total de pontos de quebra de inversões, considerando como um ponto aqueles compartilhados por mais de uma inversão. * $\alpha = 0,05$; ** $\alpha = 0,01$; - sem alteração no número de pontos de quebra.

Braço cromossômico		Gd-H4-1		
XL	0,2528	0,3560	0.3852	0.5976
XR	0,0313*	0,0313*	-	-
IIL	0,0257*	0,0257*	-	-
IIR	0,1271	0,1271	-	-
III	0,2226	0,3658	0.0156*	0.0176*
Braço cromossômico		WIP-4		
XL	0,2025	0,3524	0.3348	0.5972
XR	0,0200*	0,0200*	0.0060**	0.0060**
IIL	0,2208	0,2208	0.1062	0.1062
IIR	0,2081	0,3748	0.1835	0.1835
III	0,0911	0,1655	0.0071**	0.0071**
Braço cromossômico		17A2		
XL	0,3770	0,5876	0.5083	1.0000
XR	0,1759	0,1759	-	-
IIL	0,3363	0,3363	-	-
IIR	0,0587	0,0587	0.0504	0.0504
III	0,5312	0,9998	0.1260	0.1644

Tabela 4: Inserções do *TE Galileo* correspondentes a pontos de quebras de inversões paracêntricas descritas em heterozigose em *Drosophila willistoni* (populações Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2). A classificação de cada inversão detectada de acordo com a sua distribuição geográfica foi estabelecida pelo critério de Dobzhansky (1965). § universal; §§ restrita, §§§ rara ou endêmica.

Braço cromossômico	Inserções de <i>Galileo</i> correspondente a pontos de quebra em cada população		
	Gd-H4-1	WIP-4	17A2
XL	XLXR-p	XLXR-p	-
XR	XR-G ^{§§§}	XR-G ^{§§§} , XR-F ^{§§}	
	XR-F ^{§§}	XR-E ^{§§§}	XR-G ^{§§§}
IIL	IIL-G	III-G	
	IIL-H ^{§§}	IIL-H ^{§§}	IIL-H ^{§§}
IIR	IIR-G	IIR-F, RN ^{§§§}	IIR-G,
	IIR-E ^{§§}	IIR-G	IIR-E ^{§§}
III		IIR-E ^{§§}	
	III-N,O,V ^{§§}	IIIN,O,V ^{§§}	IIIN,O,V ^{§§}
	III-A ^{§§}	III-P ₁ ,X ^{§§§}	III-P ₁ ,X ^{§§§}
	III-C ^{§§} ,D	III-P ^{§§§}	III-A ^{§§}
	III-E	III-C ^{§§} ,D	III-C ^{§§} ,D
	III-U ^{§§}	III-E	III-E
	III-V ₁ ^{§§} ,Q	III-U ^{§§}	III-U ^{§§}
	III-F	III-V ₁ ^{§§} , Q	III-M ^{§§}
	III-L	III-M ^{§§}	
	III-M ^{§§}		

CAPÍTULO III

Discussão geral e perspectivas

Drosophila willistoni apresenta diversas peculiaridades que a tornam um excelente organismo experimental para os diversos âmbitos do conhecimento científico. Sendo assim, ela despertou o interesse de diversos pesquisadores em todo o mundo ao longo do tempo, tendo sua ascensão inicial no final da década de 40 no Brasil, com os trabalhos de Theodosius Dobzhansky juntamente com demais pesquisadores (e seus alunos) brasileiros e estrangeiros.

Nosso grupo de pesquisa do Laboratório de *Drosophila* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o qual começou com o Professor Antonio R. Cordeiro, um dos pesquisadores brasileiros integrantes da equipe de Dobzhansky no Brasil, possui mais de 60 anos de estudos com esta espécie, construindo assim uma base experimental e de saber científico não existente sobre este organismo, em qualquer outra Universidade.

O trabalho prévio sobre o envolvimento do elemento transponível *P* com pontos de quebra para inversões paracêntricas de populações naturais de *D. willistoni* por Regner *et al.* (1996), desenvolvido em nosso laboratório, causou um forte impacto no meio acadêmico. Até então, pouco se conhecia sobre o papel dos elementos transponíveis em populações naturais. Esta análise pioneira na espécie mostrou que havia considerável associação do elemento *P* com pontos de quebras de inversões segregantes, abrindo assim um grande campo de estudo sobre o envolvimento dos *TEs* com a gênese das inversões em *D. willistoni*, permitindo assim melhor compreender o seu tão vasto polimorfismo do ponto de vista de novas tecnologias.

O presente estudo teve seu estímulo maior decorrente de dois fatos principais e de igual importância: 1°- os achados de Marzo *et al.* (2008), através de buscas *in silico* do transposon *Galileo* nos 12 genomas de *Drosophila* disponíveis (Clark *et al.*, 2007), onde encontraram em *D. willistoni* 495 cópias defectivas deste elemento, sendo esta espécie a que possui o maior número de cópias dentre as 12 espécies sequenciadas; 2°- o fato de *D. willistoni* figurar entre

as espécies mais polimórficas do gênero. Sendo assim, visualizar nos cromossomos de *D. willistoni* onde o *TE Galileo* se encontra é um primeiro passo imprescindível para compreender sua associação com as inversões e também com a sua história evolutiva e assim melhor direcionar estudos posteriores sobre o genoma desta espécie.

O padrão de distribuição consideravelmente uniforme visto nas análises dos sítios de inserção do *TE Galileo* nos cromossomos foi algo que nos surpreendeu, justamente por estar utilizando uma sonda correspondente a uma variante do *TE Galileo* mais completa (Gonçalves, 2010), e como tal, poderia estar detectando, apenas hipotéticas inserções mais recentes deste elemento. Sendo assim, este achado foi importante para a nossa inferência sobre a antiguidade do *TE Galileo* no genoma de *D. willistoni*.

Apesar de os cromossomos X e II não terem sido ainda igualmente amostrados em Gd-H4-1 e 17A2, cabe ressaltar que a tendência da distribuição dos sítios de inserção do *TE Galileo* nestes cromossomos tem se mostrado uniforme também. Conclusões sobre estes resultados, entretanto, ainda não podem ser tiradas, devido ao critério utilizado de obter 40% de marcações para inferir como sítio de inserção. Análises posteriores serão feitas até cobrir igualmente todos os cromossomos.

Outro fator que reforçou a provável antiguidade do *TE Galileo* foi a presença de sinais de hibridização nos cromocentros analisados nas três populações, embora esta análise tenha sido influenciada pela qualidade do material, como visto em Gd-H4-1, a linhagem que tem o material mais frágil e teve menor porcentagem de cromocentros visivelmente marcados. Na linhagem WIP-4, que tem o melhor material cromossômico, o efeito foi oposto e obtivemos quase 100% dos seus cromocentros marcados. A presença de *TEs* nos cromocentros, em diversos estudos tem fornecido uma base para inferir a antiguidade destes. O mesmo trabalho de Zelentsova *et al.*, (1999) citado anteriormente, reporta a grande prevalência das marcações dos elementos *Penelope* e *Ulysses* no centrômero das espécies do grupo da *D. virilis*. Com base neste resultado os autores justamente inferem a antiguidade destes *TEs* no grupo.

O cromocentro é um local reconhecidamente de baixa recombinação e a manutenção da presença do *TE Galileo* neste local pode estar associada a isto.

Em estudos futuros, procuraremos utilizar sondas que reconheçam sequências altamente defectivas de *Galileo* (suas *TIRs*), na tentativa de detectar sinais de inserções mais antigas.

De todo o complemento cromossômico de *D. willistoni*, o cromossomo que mais se destacou em diferentes aspectos foi o III. Tradicionalmente ele é conhecido por ser o mais polimórfico da espécie, o que pode estar associado ao seu maior tamanho. Este cromossomo mostrou o maior número de inserções do *TE Galileo*, bem como o maior número destas inserções coincidentes com pontos de quebra para inversões. O reuso de pontos de quebra por diferentes inversões também é muito comum neste cromossomo, apontando-o como um local repleto de *hotspots* muito interessantes de serem estudados. A manutenção das muitas cópias do *TE Galileo* neste cromossomo pode também estar associada à baixa recombinação devido às muitas inversões presentes.

A coincidência de sítios de inserção do *TE Galileo* com inversões de distribuição restrita estaria em perfeito acordo com o pressuposto da origem de inversões mais novas estarem associadas à ação recente de *TEs*, não fosse um ponto intrigante. Apesar de as inserções do *TE Galileo* encontradas no presente estudo serem coincidentes, na sua maioria, com pontos de quebras de inversões supostamente mais “novas” na história evolutiva da espécie, o padrão de distribuição destas inserções nos cromossomos é muito semelhante nas três linhagens estudadas, as quais são oriundas de três locais distintos e distantes entre si, da distribuição geográfica da espécie. Seria mais aceitável, de acordo com a hipótese de inversões mais recentes devido às atividades mais recentes de um determinado *TE*, que se encontrasse maior variação dos sítios de inserções dos que os visualizados em nossos resultados. Entretanto, o elemento *Galileo* não necessita estar ativo para proporcionar recombinação ectópica, tornando-o totalmente capaz de originar inversões mais recentes, mesmo sendo inativo.

Uma questão importante em nosso trabalho a ser ressaltada é que as três linhagens utilizadas no presente estudo não são totalmente representativas do polimorfismo cromossômico existente na espécie. Gd-H4-1 e WIP-4 são

reconhecidamente monomórficas desde sua captura na natureza. Já 17A2, a qual inicialmente apresentou alto grau de polimorfismo, com considerável número de inversões registradas somente para a região do sul do Brasil (ou seja, endêmicas até então) (Regner *et al.*, 1993; 1996), já se encontra há 20 anos mantida em nosso laboratório, e nossas análises encontraram um nível baixo de polimorfismo ainda visível nesta população. Análises posteriores em linhagens recém capturadas da natureza e de diferentes locais da distribuição geográfica seriam muito interessantes, a fim de melhor elucidar o padrão de distribuição do *TE Galileo* em *D. willistoni* e sua associação com pontos de quebra de inversões e outros rearranjos cromossômicos.

Um vasto campo de estudo sobre a gênese dos polimorfismos foi aberto com a presença do elemento *P* no genoma de *D. willistoni* e sua associação com pontos de quebra. A presença do *TE Galileo* e o sequenciamento do genoma desta espécie expandem ainda mais este território. É muito promissora a continuidade dos estudos do *TE Galileo* em *D. willistoni*, não apenas para conhecer sua história evolutiva associada à espécie, ou ao subgrupo *willistoni*; mas também para melhor conhecer a gênese dos polimorfismos presentes nesta espécie, que sem dúvida é um dos melhores organismos existentes para o estudo de inversões.

Conclusões

Diante dos resultados do presente trabalho, conclui-se que:

- Cópias mais completas do transposon *Galileo* estão amplamente distribuídas em todos os cromossomos de *D. willistoni*;
- Dos 100 sítios de inserções encontrados, 22 correspondem a pontos de quebra de inversões descritas e 10 a sítios de inserções de elemento *P*;
- O cromossomo III é o que apresenta maior predominância de sítios de inserções, bem como de coincidência destes com pontos de quebra de inversões;
- O padrão de distribuição dos sítios de inserção do transposon *Galileo* nos cromossomos foi visivelmente semelhante nas três linhagens (Gd-H4-1, WIP-4 e 17A2) de *D. willistoni*, oriundas de locais distintos da distribuição geográfica da espécie;
- Os cromocentros das três linhagens analisadas também apresentaram sinais de hibridizações com a sonda do transposon *Galileo* utilizada, indicando assim que muitas outras cópias do elemento existem na heterocromatina centromérica;
- As associações do transposon *Galileo* com pontos de quebras de inversões somente foram estatisticamente significativas para o braço cromossômico XR de Gd-H4-1 e WIP-4 e para o IIL de Gd-H4-1. Porém quando foi considerado o reuso dos pontos de quebra para inversões, o cromossomo III (o mais polimórfico de todos) também teve suas associações estatisticamente significativas em Gd-H4 e WIP-4;
- *Galileo* pode ser considerado um *TE* relativamente antigo no genoma de *D. willistoni*;
- O transposon *Galileo* pode tanto ter invadido o genoma de *D. willistoni* mais de uma vez, quanto ter se transposto por muito tempo, ambas as hipóteses explicariam a considerável quantidade de sítios de inserções ainda visíveis nos cromossomos;

- A associação do transposon *Galileo* com pontos de quebras de inversões na sua maioria com distribuição restrita (e sendo assim, mais novas) não necessariamente implica atividade mais recente deste elemento, uma vez que ele possui como característica a capacidade de pareamento ectópico entre cópias idênticas, e assim possibilita rearranjos cromossômicos, sem a necessidade de estar ativo;
- A hipótese da manutenção de *TEs* em regiões de baixa recombinação também é respaldada pelos nossos resultados, principalmente para o cromossomo III.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Adé J and Belzile FJ (1999) Hairpin elements, the first family of *foldback* transposons (*FTs*) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 19: 591-597.

Anderson WW, Arnold J, Baldwin DG, Beckenbach AT, Brown CJ, *et al.* (1991) Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *PNAS* 88 (22): 10367- 10371.

Araújo AM and Valente VLS (1981) Observações sobre alguns lepidópteros e drosofilídeos do Parque do Turvo, RS. *Ciência e Cultura* 33: 1485-1490.

Ashburner M (1989) *Drosophila*. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 434 pp.

Aulard S, David JR and Lemeunier F (2002) Chromosomal inversion polymorphism in Afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 79(1):49-63.

Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL and Santos AS (2007) BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil de Mamirauá, Belém.

Bächli G (2010). Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. <<http://www.taxodros.unizh.ch/>>.

Balanyà J, Huey RB, Gilchrist GW and Serra L (2009) The chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*: a microevolutionary weapon to monitor global change. *Heredity* 103: 364–367.

Battaglia B and Birch LC (1956) Crossing-over in *Drosophila willistoni*. *Nature* 3: 1005.

Biémont C (2010) A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics* 186(4):1085-93.

Biessmann H, Champion LE, O'Hair M, Ikenaga K, Kasravi B, *et al.* (1992) Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster HeT-A* transposable elements to receding chromosome ends. *Embo J* 11(12): 4459-4469.

Bingham PM and Zachar Z (1989) Retrotransposons and the *FB* transposon from *Drosophila melanogaster*. In: *Mobile DNA*. Berg DE and Howe MM (eds), American Society for Microbiology, Washington, DC; pp. 485–502.

- Bhutkar A, Schaeffer SW, Russo SM, Xu M, Smith TF, *et al.* (2008) Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. *Genetics* 179(3):1657- 1680.
- Brcic D (1957) A Comparative Study of Chromosomal Variation in Species of the *mesophragmatica* Group of *Drosophila*. *Genetics* 42(6):798-805.
- Brcic D (1958) Evolución en el grupo *mesophragmatica* del género *Drosophila*. *Biológica (Chile)* 26: 3-46.
- Brcic D (1966) Ecological and Cytogenetic Studies of *Drosophila flavopilosa*, a Neotropical Species Living in *Cestrum* Flowers. *Evolution* 20: 16-29.
- Burla H, Cunha AB, Cavalcanti AGL, Dobzhansky T and Pavan C (1950) Population density and dispersal rates in Brazilian *Drosophila willistoni*. *Ecology* 31:393-404.
- Cáceres M, Barbadilla A and Ruiz A (1997) Inversion Length and Breakpoint Distribution in the *Drosophila buzzatii* Species Complex: Is Inversion Length a Selected Trait? *Evolution* 4: 1149-1155.
- Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M and Ruiz A (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a *transposable element*. *Science* 285: 415-418.
- Cáceres M, Puig M and Ruiz A (2001) Molecular characterization of two natural *hotspots* in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. *Genome Res* 11(8): 1321-1322
- Campos JRC, Ananias F, Brasileiro CA, Yamamoto M, Haddad CFB, *et al.* (2009) Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas* 146: 104-111.
- Capy P, Bazin C, Higuier D and Langin T (1998) *Dynamics and Evolution of Transposable Elements*. 1st edition. Landes Bioscience, France, 197pp.
- Carmena M and González C (1995) Transposable elements map in a conserved pattern of distribution extending from beta-heterochromatin to centromeres in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 103:676–684.
- Carson HL and Stalker HD (1947) Gene Arrangements in Natural Populations of *Drosophila robusta* Sturtevant. *Evolution* 3: 113-133.
- Carson HL and Stalker HD (1949) Seasonal Variation in Gene Arrangement Frequencies Over a Three-Year Period in *Drosophila robusta* Sturtevant. *Evolution* 3 (4): 322-329.
- Carson HL (1953) The Effects of Inversions on Crossing over in *Drosophila robusta*. *Genetics* 38(2): 168-86.

- Casals F, Cáceres M and Ruiz A (2003) The *Foldback-like* transposon *Galileo* is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. *Mol Biol Evol* 20 (5): 674-685.
- Casals F, Cáceres M, Manfrin MH, González J and Ruiz A (2005) Molecular Characterization and chromosomal distribution of *Galileo*, *Kepler* and *Newton*, three *Foldback* transposable elements of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Genetics* 169: 2047-2059.
- Casals F, González J and Ruiz A (2009) Abundance and chromosomal distribution of six *Drosophila buzzatii* transposons: *BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT4*, *BuT5* and *BuT6*. *Chromosoma* 115:403–412.
- Chapple CE and Guigó RR (2008) Relaxation of Selective Constraints Causes Independent Selenoprotein Extinction in Insect Genomes. *Plos ONE* 3 (8): e2968.
- Charlesworth B and Langley CH (1989) The population genetics of *Drosophila* transposable elements. *Annu Rev Genet* 23:251–287
- Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220.
- Cheng CS, Tsuchimoto S, Ohtsubo H and Ohtsubo E (2000) *Tnr-8*, a *foldback* transposable element from rice. *Genes Genet Syst* 75:327-333.
- Ciapponi G and Cenci LG (2008) Telomere capping and cellular checkpoints: clues from fruit flies. *Cytogenet Genome Res* 22:365-73.
- Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, *et al.*, 2007 *Drosophila* 12 Genomes Consortium. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 480: 2003-218.
- Coelho PA, Queiroz-Machado J, Hartl D and Sunkel SE (1998) Pattern of chromosomal localization of the *Hoppel* transposable element family in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Chromosome Res* 6: 385-395
- Colares MCS, Degrandi, TH and Valente VLS (2004) Cytological detection of male recombination in *Drosophila willistoni*. *Cytologia (Tokyo)* 68 (4): 359-365.
- Collins M and Rubin GM (1984) Structure of chromosomal rearrangements induced by the *FB* transposable elements in *Drosophila*. *Nature* 308: 323-327.
- Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA and Petrarca V (2002) A polytene chromosome analysis of *the Anopheles gambiae* species complex. *Science* 15: 1415-1418.
- Da Cunha AB, Burla H and Dobzhansky T (1950) Adaptive Chromosomal Polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* 4 (3): 212-235.
- Da Cunha AB and Dobzhansky T (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to environment. *Evolution*, 8: 119-134.

- Da Cunha AB (1955) Chromosomal Polymorphism in the Diptera. *Advances in Genetics* 7: 93-138.
- Da Cunha AB (1956) Differential viability favoring inversion heterozygotes In *Drosophila willistoni*. *Evolution* 10:7-56.
- Da Cunha AB, Dobzhansky T, Pavlovsky O and Spassky B (1959) Genetics of Natural Populations. XXVIII. Supplementary Data on the Chromosomal Polymorphism in *Drosophila willistoni* in its Relation to the Environment. *Evolution* 13(3): 389-404.
- Da Silva GM, Bione EG, Cabral-de-Mello DC, Moura RC de, Simões ZLP, *et al.* (2009) Comparative cytogenetics of three species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Genet Mol Biol* 32 (2): 276-280.
- De Souza HML, Da Cunha AB and Dos Santos EP (1970) Adaptive Polymorphism of Behavior Evolved in Laboratory Populations of *Drosophila willistoni*. *The American Naturalist* 104: 175-189.
- Delprat A, Negre B, Puig M and Ruiz A (2009) The transposon *Galileo* generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination. *PLoS One* 18;4(11): e7883.
- Dimitri P (1997) Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 100(1-3):85-93.
- Dimitri P and Junakovic N (1999) Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet* 15(4):123-124.
- Dimitri P, Junakovic N and Arca B (2003) Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 20:503–512.
- Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G and Giuseppe Biamonti G (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118:419–435.
- Dobzhansky T and Sturtevant AH (1938) Inversions in the Chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 23(1): 28-64.
- Dobzhansky T (1943) Genetics of Natural Populations IX. Temporal Changes in the Composition of Populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 28(2): 162-86.
- Dobzhansky T and Epling C (1944) Contributions to the Genetics, Taxonomy, and Ecology of *Drosophila pseudoobscura* and Its Relatives. Carnegie Institution of Washington, Washington, 554 pp.
- Dobzhansky T and Epling C (1948) The suppression of crossing over in inversion heterozygotes of *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* 34(4):137-41.

- Dobzhansky T (1949) Towards a modern synthesis. *Evolution* 3(4): 376.
- Dobzhansky T (1950) The chromosomes of *Drosophila willistoni*. *J Heredity* 41: 156-158.
- Dobzhansky T and Pavan C (1950) Local and Seasonal Variations in Relative Frequencies of Species of *Drosophila* in Brazil. *J Anim Ecol* 19: 1-14.
- Dobzhansky T (1957) Genetics of natural populations. XXVI. Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution* 11: 280-293.
- Dobzhansky T and Pavlovsky O (1962) A comparative study of the chromosomes in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 13:196-218.
- Dobzhansky T (1965) "Wild" and "Domestic" species of *Drosophila*. In: *The Genetics of Colonizing Species*. Baker HG and Stebbins GL (eds). Academic Press, New York, pp 533-546.
- Dobzhansky T (1970) *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University, New York, pp 433-484.
- Ehrman L and Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL and Thompson, Jr. JN (eds). Academic Press, New York, vol 3b: 193-225.
- Eichler EE and Sankoff D (2003) Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 8: 793-797.
- Engels WR and Preston CR (1984) Formation of chromosome rearrangements by *P* factors in *Drosophila*. *Genetics* 107: 657-678.
- Ephrussi B and Beadle GW (1936) A technique of transplantation for *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 70: 6-8.
- Evgen'ev MB, Zelentsova H, Shostak N, Kozitsina M, Barskyi V, *et al.* (1997) *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(1):196-201.
- Evgen'ev M, Zelentsova H, Mnjoian L, Poluectova H and Kidwell MG (2000) Invasion of *Drosophila virilis* by the *Penelope* transposable element. *Chromosoma* 109(5):350-357.
- Evgen'ev MB and Arkhipova IR (2005) *Penelope*-like elements- a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenet Genome Res* 110(1-4): 510-21.
- Faria R and Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* 25(11): 660-669.

- Feschotte C and Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* 41:331-68.
- Finnegan DJ (1989) Eucaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genet* 5: 103-107.
- Finnegan DJ (1992) Transposable elements. *Curr Opin Genet Dev* 2: 861–867.
- França ZM and Da Cunha AB (1968) Crossing-over between heterozygous inversions and its relation with polymorphism in "*Drosophila willistoni*". *Rev Bras Biol* 28(4): 495-497.
- França ZM, Da Cunha AB and Garrido MC (1968) Recombination in *Drosophila willistoni*. *Heredity* 23(2):199-204.
- Gall JG, Cohn EH and Polan ML (1971) Reptitive DNA sequences in *Drosophila*. *Chromosoma* 33:319-324.
- Gardner EJ and Snustad DP (1984) **Genética**. 2ª edição. Interamericana, Rio de Janeiro, 497pp.
- Gonçalves JW (2010) Elemento transponível *Galileo* no genoma de espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS. 76 pp.
- Goñi B, Matsuda M and Tobarí YN (2006) Chiasmata and chromosome breakages are related to crossing over in *Drosophila ananassae* males. *Genome* 49(11): 1374-83.
- González J, Casals F and Ruiz A (2007) Testing chromosomal phylogenies and inversion breakpoint reuse in *Drosophila*. *Genetics* 175(1):167-77.
- González J and Petrov DA (2009) The adaptive role of transposable elements in the *Drosophila* genome. *Gene* 15 (2):124-33.
- Gray YH (2000) It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 16: 461–468.
- Griffiths AJF, Suzuki DT, Miller JH, Lewontin RC and Gelbart WM (2002) *An Introduction to Genetics Analysis*. 7th. W.H. Freeman and Company, New York, pp 492-520.
- Harden N and M Ashburner (1990) Characterization of the *FOB-NOF* transposable element of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126: 387–400.
- Hartl DL and Jones EW (2009) Genetics of Chromosomal Inversions. In: *Genetics: analysis of genes and genomes*. 7th edition. Jones and Bartlett, London, pp. 275-277.
- Heitz E (1928) Das Heterochromtin der Moose. *Jb Wiss Bot* 69:762-818.

Heitz E (1934) Über α and β Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromosomen bei *Drosophila*. Biol Zentralbl 45:588-609.

Hinton CW and Downs JE (1975) The mitotic polytene and meiotic chromosomes of *Drosophila ananassae*. J Heredity 66: 353-361.

Hiraizumi Y (1971) Spontaneous recombination in *Drosophila melanogaster* males. Proc Natl Acad Sci USA 68(2): 268-70

Hiraizumi Y, Slatko B, Langley C and Nill A (1973) Recombination in *Drosophila melanogaster* male. Genetics 73(3): 439-44.

Inoue Y, Watanabe T and Watanabe TK (1984) Evolutionary Change of the Chromosomal Polymorphism in *Drosophila melanogaster* Populations. Evolution 4: 753-765

Junakovic N, Terrinoni A, Di Franco C, Vieira C and Loevenbruck C (1998) Accumulation of transposable elements in the heterochromatin and on the Y chromosome of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. J Mol Evol 46: 661–668.

Kastritsis CD (1966) A comparative chromosome study in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. Chromosoma 19(2): 208-22.

Kidwell MG (1977) Reciprocal differences in female recombination associated with hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. Genet Res 30(1):77-88.

Kidwell MG (2005) Transposable elements and the Evolution of Dipteran Genomes. In: The evolutionary biology of flies. Yeates DK and Wiegmann BM (eds), Columbia University, New York, pp 145-173.

Kikkawa H (1938) Studies on the genetics and cytology of *Drosophila ananassae*. Genetica (*The Hague*) 20: 458-516.

Kirkpatrick M and Barton N (2006) Chromosome inversions, local adaptation and speciation. Genetics 173: 419–434.

Knibb WR, Oakeshott JG and Gibson JB (1981) Chromosome Inversion Polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. I. Latitudinal Clines and Associations between Inversions in Australasian Populations. Genetics 98(4):833-47

Krimbas CB and Powell JR (1992). Chromosomal Polymorphism in Natural and Experimental Populations In: *Drosophila* Inversion Polymorphism. Krimbas CB and Powell JR (eds), CRC, Florida, pp 2-52.

Kulemzina AI, Trifonov VA, Perelman PL, Rubtsova NV, Volobuev V, *et al.* (2009) Cross-species chromosome painting in Cetartiodactyla: Reconstructing the karyotype evolution in key phylogenetic lineages. Chromosome Res 17:419–436.

Kusakabe S, Harada K and Mukai T (1990) The rare inversion with a *P* element at the breaking point maintained in a natural population of *Drosophila melanogaster*. Genetica 82: 111-115.

- Lemskaya NA, Romanenko AS, Golenishchev FN, Rubtsova NV, Sablina OV, *et al.* (2010) Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia).III. Karyotype relationships of ten *Microtus* species. *Chromosome Res*18: 459–471.
- Levis RM, Collins IG and Rubin M (1982) *FB* elements are the common basis for the instability of the w^{DZL} and w^c *Drosophila* mutations. *Cell* 30: 551–565.
- Levitan M (1951) Experiments on chromosomal variability in *Drosophila robusta*. *Genetics* 36(3): 285-305.
- Lim JK (1988) Intrachromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(23):9153-9157.
- Lim JK (1993) *In situ* hybridization with biotinylated DNA. *DIS* 72: 73-77.
- Lobachev KS, Shor BM, Tran HT, Taylor W, Keen JD, *et al.* (1998) Factors affecting inverted repeat stimulation of recombination and deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148: 1507–1524.
- Lyttle TW and Haymer DS (1992) The role of the transposable element *hobo* in the origin of endemic inversions in wild populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 86: 113-126.
- Marques EK, Napp M, Winge H and Cordeiro AR (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *DIS* 41:187.
- Martins MB (1987) Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 3: 195-218.
- Martins MB (2001) *Drosophilid* fruit-fly guilds in forest fragments. In: Bierregard Jr. RO, Gascon C, Lovejoy TE & Mesquita R (eds), *Lessons from Amazonia: The ecology and conservation of a fragmented forest*. Yale University, New Haven, pp 175-186.
- Marzo M, Puig M and Ruiz A (2008) The *Foldback-like* element *Galileo* belongs to the *P* superfamily of DNA transposons and is widespread within the *Drosophila* genus. *PNAS* 105 (8):2957-2962.
- Mather WB (1963) Patterns of Chromosomal Polymorphism in *Drosophila rubida*. *The American Naturalist* 97: 59-63
- Matsuda M, Imai H and Tobar YN (1983) Cytogenetic analysis of recombination in males of *Drosophila ananassae*. *Chromosoma* 88(4): 286-92.
- McDonald JF (1995) Transposable elements: possible catalysts of organismic evolution. *Trends Ecol Evol* 10: 123–126.
- McDonald JF, Matyunina LV, Wilson S, Jordan IK, Bowen NJ, *et al.* (1997) LTR retrotransposons and the evolution of eukaryotic enhancers. *Genetica* 100: 3–13.

Merrel DJ (1981) Chromosomal Polymorphism. In: Ecological genetics. University of Minnesota, Minneapolis, pp 199-223.

Mettler LE, Voelker RA and Mukai T (1977) Inversion Clines in Populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87(1):169-76.

Metz CW (1916). Chromosome studies in the *Diptera*. I. A preliminary survey of five different types of chromosome groups in the genus *Drosophila*. *J Exp Zool* 17: 45-49.

Moriwaki D (1940) Enhanced crossing over in the second chromosome of *Drosophila ananassae*. *Jpn J Genet* 16: 37-48.

Muller HJ (1940) Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: The New Systematics, J. Huxley (ed). Clarendon, Oxford, 185 pp.

Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A, Bourque G, Tesler G, *et al.* (2005) Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 22: 613-617.

Negre B, Casillas S, Suzanne M, Sánchez-Herrero E, Akam M, *et al.* (2005) Conservation of regulatory sequences and gene expression patterns in the disintegrating *Drosophila Hox* gene complex. *Genome Res* 15(5): 692-700.

Novitski E and Braver G (1954) An Analysis of Crossing over within a Heterozygous Inversion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 39(2): 197-209.

Nuzhdin SV, Pasyukova EG and Mackay TF (1997) Accumulation of transposable elements in laboratory lines of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 100: 167-175.

Olvera O, Powell JR, de la Rosa ME, Salceda VM, Gso MI, *et al.* (1979) Populations genetics of Mexican *Drosophila*. VI. Cytogenetics aspects of the inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 33: 381-395.

Papacit M and Juan E (1998) Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 6 (1):49-54.

Pardue ML, Rashkova S, Casacuberta SE, DeBaryshe PG, George JA, *et al.* (2005) Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Res* 13 (5): 443-453.

Patterson JT and Stone WS (1952) Evolution in the genus *Drosophila*. Macmillan, New York, 610 pp.

Pevzner P and Tesler G (2003) Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 24(13): 7672-7677.

- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, *et al.* (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3804–3808.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, *et al.* (2010) Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics* 11: 50.
- Potter SS, Truet M, Phillips M and Maher A (1980) Eukaryotic transposable genetic elements with inverted terminal repeats. *Cell* 20: 639-647.
- Powell JR (1997) Population Genetics: Inversions. In: *Progress and prospects in evolutionary biology: the Drosophila model*. Oxford University, New York, pp 48-80.
- Price PW (1997) *Ecological Genetics In: Insect Ecology*. 3th edition. John Wiley & Sons, New York, pp 413-430.
- Rebatchouk D and Narita JO (1997) *Foldback* transposable elements in plants. *Plant Mol Biol* 34:831-835.
- Regner LP (1992) Polimorfismos e evidências de Elementos *P* em *Drosophila willistoni*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 197 pp.
- Regner LP and Valente VLS (1993) *Drosophila willistoni* mating activity-urbanization effects and a search for its chromosomal basis. *Evol Biológica* 7:327-349.
- Regner LP, Pereira MSO, Alonso CEV, Abdelhay E and Valente VLS (1996) Genomic distribution of *P* elements in *Drosophila willistoni* and a search for their relationship with chromosomal inversions. *Journal of Heredity* 87: 191-198.
- Richards S, Liu Y, Bettencourt BR, Hradecky P, Letovsky S, *et al.* (2005) Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene, and cis-element evolution. *Genome Res* 15:1-18.
- Rieger TT (1999) Mapeamento por hibridização *in situ* e expressão no desenvolvimento de genes de resposta a estresses e ao hormônio ecdisona em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 138pp.
- Robe LJ, Cordeiro J, Loreto EL and Valente VL (2010) Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 138(6): 601-17.
- Rohde C, Pinto H Jr, Valiati VH, Schrank A and Valente VL (1994) Localization of the *Cu/Zn* superoxide dismutase gene in the *Drosophila willistoni* species group by *in situ* hybridization. *Cytobios* 80(323):193-8.

- Rohde C, Abdelhay E, Pinto Júnior H, Schrank A and Valente VL (1995) Analysis and in situ mapping of the *Adh* locus in species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Cytobios* 81(324):37-47.
- Rohde C, Degrandi TH, De Toni DC and Valente VLS (2005) *Drosophila willistoni* polytene chromosomes. I. Pericentric inversion on X chromosome. *Caryologia* 58(3): 249-254.
- Rohde C, Garcia AC, Valiati VH, and Valente VL (2006) Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B). *Genetica* 126(1-2): 77-88.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 2nd edition. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory, p 1.38.
- Santos RA and Valente VLS (1990) On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae) in urban environment: ecological and cytological observations. *Evol Biol* 4: 253-268.
- Schaeffer SW, Bhutkar A, McAllister BF, Matsuda M, Matzkin LM, *et al.* (2008) Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics*. 179(3):1601-55.
- Sene FM, Val FC, Vilela CR and Pereira MAQR (1980) Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morpho-climatic domains of Brazil. *Papéis Avuls Zool* 33: 315–326.
- Sheen FM and Levis RW (1994) Transposition of the *LINE*-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26): 12510-1214.
- Simmen MW and Bird A (2000) Sequence analysis of transposable elements in the sea squirt, *Ciona intestinalis*. *Mol Biol Evol* 17:1685-1694.
- Singh BN (1974) Quantitative variation of chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila ananassae*. *Cytologia (Tokyo)* 39(2): 309-14.
- Singh BN (1982) Persistence of chromosomal polymorphism in various strains of *Drosophila ananassae*. *Genetica* 59 (2): 151-156.
- Singh BN and Das A (1992) Further evidence for latitudinal inversion clines in natural populations of *Drosophila melanogaster* from India. *J Hered* 83(3): 227-230.
- Singh BN (1996) Population and behaviour genetics of *Drosophila ananassae*. *Genetica* 97(3): 321-9.

- Singh BN (1998) Population genetics of inversion polymorphism in *Drosophila ananassae*. Indian J Exp Biol 36(8):739-48.
- Smith PA and Corces VG (1991) *Drosophila* transposable elements: mechanisms of mutagenesis and interactions with the host genome. Adv Genet 29: 229–300.
- Sneath PHA and Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, 573pp.
- Spassky B and Dobzhansky T (1950) Comparative genetics of *Drosophila willistoni*. Heredity 4(2): 201-15.
- Sperlich D and Pfriem P (1986) Chromosomal polymorphism in natural and experimental population. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Ashburner M, Carson HL and Thompson Jr. JN (eds.). Vol. 3c. Academic Inc., London, pp. 257-309.
- Stalker HD (1980) Chromosome Studies in Wild Populations of *Drosophila melanogaster*. II. Relationship of Inversion Frequencies to Latitude, Season, Wing-Loading and Flight Activity. Genetics 95(1):211-23.
- Stark A, Lin MF, Kheradpour P, Pedersen JS, Parts L, et al. (2007) Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. Nature. 450(7167): 219-232.
- Steinberg AG and Fraser FC (1944) Studies on the Effect of X Chromosome Inversions on Crossing over in the Third Chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics 29(1): 83-103.
- Sturtevant AH and Dobzhansky Th (1936) Inversions in the third chromosome of wild races of *Drosophila pseudoobscura* and their use in the study of the history of the species. Proc Natl Acad Sci USA 22:517-541.
- Sturtevant AH and Nivitski E (1941) The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. Genetics 26: 517-541.
- Townsend JJ (1952). Genetics of marginal populations of *Drosophila willistoni*. Evolution 6: 428-442.
- Val FC, Vilela CR and Marques MD (1981). *Drosophilidae* of the Neotropical Region. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds), Vol 3a, Academic Press, London, pp. 123-16.
- Valente VLS and Morales NB (1985) New inversions and qualitative description of inversion heterozygotes in natural populations of *Drosophila willistoni* inhabiting two different regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Braz J Genet 8: 167-173.
- Valente VLS and Araújo AM (1985) Observations on the chromosomal polymorphism of natural populations of *Drosophila willistoni* and its association with the choice of feeding and breeding sites. Braz J Genet 8: 271-284.

Valente VLS and Araújo AM (1986) Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* 57: 149-159.

Valente VLS, Rusczyk A and Santos RA (1993) Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Bras J Gen* 16: 307-319.

Valente VLS, Rohde C, Valiati VH, Morales NB and Goñi B (2001) Chromosome inversions occurring in Uruguayan populations of *Drosophila willistoni*. *DIS* 84:55-59.

Valiati VH and Valente VLS (1997) Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Braz J Genet* 20 (4): 567-581.

Vaury C, Bucheton A and Pelisson A (1989) The beta heterochromatic sequences flanking the *I* elements are themselves defective transposable elements. *Chromosoma* 98(3): 215-24.

Vicario S, Moriyama EM and Powell JR (2007) Codon usage in twelve species of *Drosophila*. *BMC Evol Biol* 15: 7:226.

Vieira C and Biémont C (1996) Geographical variation in insertion site number of retrotransposon 412 in *Drosophila simulans*. *J Mol Evol* 42(4): 443-51.

Watanabe T (1967) Chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Mem Fac Sci Kyushu Univ* 4: 159-182.

Weiler KS and Wakimoto BT (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 29: 577-605.

White MJD (1977) Chromosomal polymorphism in natural populations. I. Inversions. In: *Animal cytology and evolution*. 3th edition. Cambridge University Press, London, pp. 231-284.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, *et al.* (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Reviews Genet* 8:973-982.

Windsor AJ and Waddel CS (2000) *FARE*, a new family of *foldback* transposons in *Arabidopsis*. *Genetics* 156:1983-1995.

Woodruff RC and Thompson Jr JN (1977) An analysis of spontaneous recombination in *Drosophila melanogaster* males. *Heredity* 38: 291-307.

Yamaguchi O and Mukai T (1974) Variation of spontaneous occurrence rates of chromosomal aberrations in the second chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 78(4): 1209-1221.

Yamaguchi O, Cardellino RA and Mukai T (1976) High Rates of Occurrence of Spontaneous Chromosome Aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 83(2):409-22.

Yamamoto MT, Mitchelson A, Tudor M, O'Hare K, Davies JA, *et al.* (1990) Molecular and cytogenetic analysis of the heterochromatin-euchromatin junction region of the *Drosophila melanogaster* X chromosome using cloned DNA sequences. *Genetics* 125(4): 821-32.

Yuan J, Finney M, Tsung N and Horvitz R (1991) *Tc4* *Caenorhabditis elegans* transposable element with an unusual *fold-back* structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3334-3338.

Zelentsova H, Poluectova H, Mnjoian L, Lyozin G, Veleikodvorskaja V, *et al.* (1999) Distribution and evolution of mobile elements in the *virilis* species group of *Drosophila*. *Chromosoma* 108(7): 443-56.

Zhou ZH, Akgün E and Jasin M (2001) Repeat expansion by homologous recombination in the mouse germ line at palindromic sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8326- 8333.