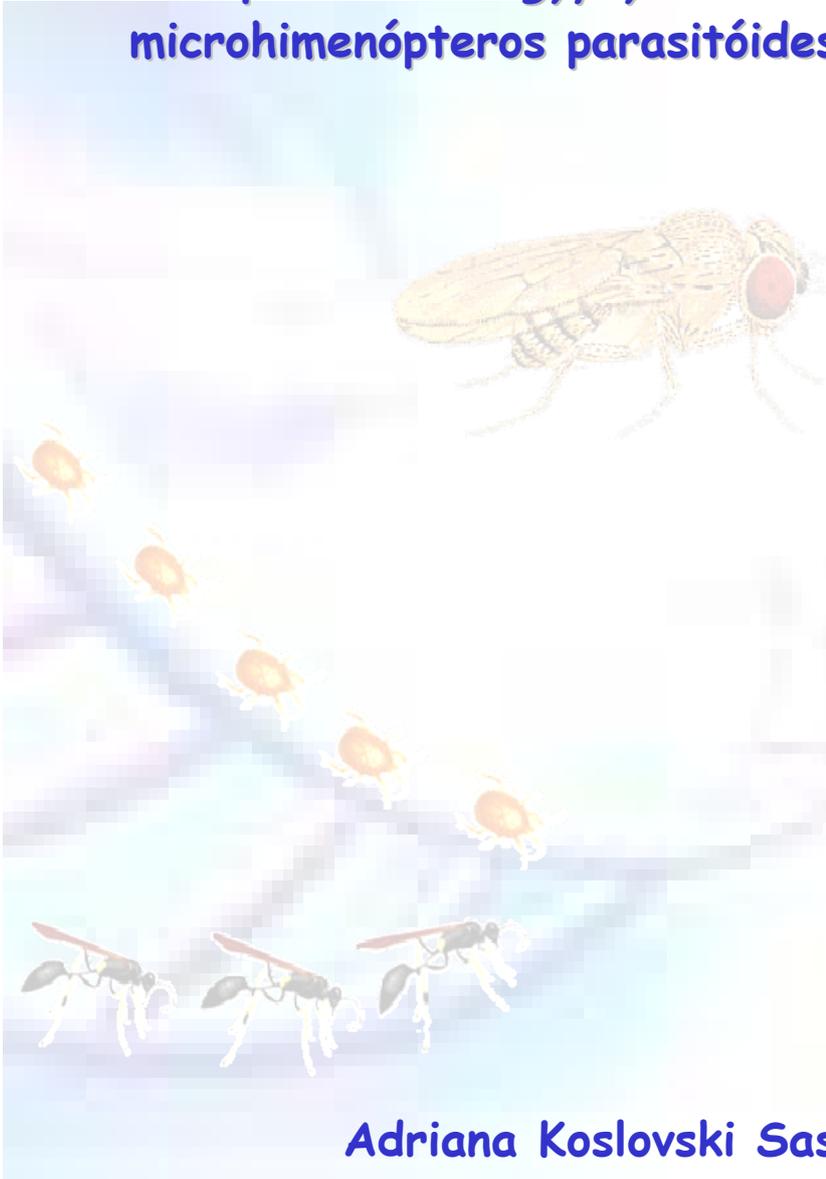


Avaliação da presença dos elementos transponíveis P e *gypsy* em ácaros parasitas e microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Adriana Koslovski Sassi

Orientadora: Dra. Vera Lúcia Valente Gaiesky

Co-Orientador: Dr. Élgion Loreto

Porto Alegre, 2003

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Verinha, por me acolher nestes anos todos no laboratório e sempre confiar em mim, além de me “pegar no colo” nos momentos difíceis e principalmente; ser um exemplo pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Élgion, uma mente brilhante e um grande exemplo de profissional; por todo material, sugestões, orientação e por acreditar que eu podia realizar este trabalho!

Ao Dr. Milton Mendonça pelo auxílio na identificação dos microhimenópteros.

Ao Dr. Noeli Juarez Ferla pelo curso, material e apoio na identificação dos ácaros e suas bolsistas, Marla e Marisa pelo mate, a maravilhosa acolhida e a amizade feita em Lajeado.

Ao colega Marco pela ajuda na identificação das “vespinhas” e captura das imagens.

À Sílvia Richter pela paciência e determinação para tirar as fotos dos microhimenópteros.

Aos amigos do laboratório de Imunogenética: Mel, Andres e Eduardo, pelo uso do termociclador e todas as dicas e disposição para ajudar em todos os momentos.

À Larissa pela ajuda com as imagens dos southernns.

Ao amigo, apesar de Colorado, Elmo, sempre disposto a ajudar (sempre muito além das suas atribuições), obrigado pela força e incentivo nestes anos de genética.

Às gurias do futebol, nossa “válvula de escape” de todas as tensões, por todas as risadas (a gente ri mais do que joga, claro!) e pela amizade conquistada nestes dois anos de treino.

Para todo pessoal do Laboratório de *Drosophila*, amigos inesquecíveis e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Lizandra, Tiago, Mônica, Rodolfo, Luís, Cláudia, Rosane, Marisa (nossa sábia conselheira e quem admiro muito, entre outros, pelo gosto musical!), Chirlei (tentei te superar, amiga!), Victor, Luciano . “É bem o tipinho” de vocês serem tão legais!

Ao Fá pelos tererês e mates, companheirismo e ajuda nesta correria dos últimos dias (e a gente escapou até do crime na madrugada!).

À Fabi muito obrigada pela amizade e colaboração de sempre, principalmente a força para o delineamento dos experimentos e alguns “puxões de orelha”...

À Norminha, obrigada por ser tão amiga e um exemplo de colega, sempre me incentivando e ajudando no que fosse preciso. Obrigada também pelo material das coletas e dicas em todas as etapas deste trabalho.

À minha amiga Anita, que além de ter a maior imaginação do mundo ainda tem muito talento para confeccionar capas de dissertações, obrigada pela obra de arte!

Obrigada, Mari, por ter paciência para ouvir minhas histórias (Jesus!) e ser uma amiga muito parceira e divertida.

Obrigada também ao Léo e o Dé (o barbudinho charmoso e cheiroso) pela amizade, companhia, ajuda e muitas risadas (e choro) nestes momentos finais.

À Taia, pela amizade de sempre e força em todos os momentos (Tá lôco, como a gente já se divertiu!).

Com muito amor, agradeço ao Márcio, Milena e toda a família, que me acolheram de coração aberto em POA. Obrigada por toda amizade, carinho, “colo” e por ter passado alguns dos momentos mais felizes da minha vida ao lado de vocês!

E o obrigada mais especial vai para meu pai, minha mãe e meu irmão, que apesar de estarem a quilômetros de distância (física) estão sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Estou apenas colhendo os frutos de muito incentivo e confiança depositados em mim nesses anos todos, e é a quem dedico esta dissertação. Amo vocês, minha vida!

ÍNDICE

I INTRODUÇÃO	5
I.1 ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS	5
I.2 ELEMENTO TRANSPONÍVEL <i>P</i>	7
I.3 ELEMENTO TRANSPONÍVEL <i>Gypsy</i>	10
I.4 TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL	13
I.5 TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE ELEMENTOS MÓVEIS	14
I.6 ÁCAROS SEMI-PARASITAS DE <i>Drosophila</i>	19
I.7 PARASITÓIDES DE <i>Drosophila</i>	21
II OBJETIVOS	24
II.1 OBJETIVO GERAL	24
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
III MATERIAL E MÉTODOS	25
III.1 Coleta	25
III.2 Manutenção dos estoques	25
III.3 Obtenção de DNA dos ácaros	25
III.4 Preparação das lâminas para identificação dos ácaros	25
III.5 Extração de DNA	26
III.6 Obtenção de DNA de parasitóides	26
III.7 Extração de DNA	27
III.8 Controle da qualidade do DNA	28
III.9 Amplificação do elemento <i>P</i> por PCR	28
III.10 Amplificação do elemento <i>Gypsy</i> por PCR	29
III.11 Sondas	31
III.12 <i>Southern blot</i>	31
IV RESULTADOS	32
IV.1 Coleta de parasitas e parasitóides	32

IV.2 Controle da qualidade do DNA	35
IV.3 Elemento <i>P</i>	36
IV.4 Elemento <i>gypsy</i>	39
V DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	43
VI RESUMO	47
VII ABSTRACT	48
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

I. INTRODUÇÃO

I.1. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Elementos transponíveis (TEs) são encontrados em diversos organismos, de bactérias até eucariotos superiores, fazendo parte de aproximadamente 50% do genoma de milho e 15% do genoma de *Drosophila melanogaster*. O projeto Genoma mostrou que 45% do genoma humano é composto por TEs (Lander, 2001). Principal constituinte do DNA medianamente repetitivo, estas seqüências são muito antigas nos genomas, onde foram mantidas durante o processo evolutivo.

TEs são geralmente conceituados como segmentos de DNA capazes de movimentar-se ao longo do genoma. Apresentam-se em múltiplas cópias e possuem, pelo menos, algumas destas características: 1) seqüências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades que são chamadas de repetições terminais, sendo este o local de reconhecimento pela enzima que irá movimentá-los; 2) genes que codificam enzimas envolvidas em sua mobilidade; 3) duplicações resultantes de sua inserção em um sítio do genoma.

Podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com o tipo de intermediário envolvido no seu mecanismo de transposição (Cummings, 1994):

Elementos de Classe I: são TEs com transposição replicativa, envolvendo um intermediário de RNA que é transcrito reversamente antes da inserção. São denominados retrotransposons e podem incluir elementos com LTRs (*long terminal repeats*), que são estruturalmente similares a retrovírus, e sem LTRs, muitas vezes chamados de retroposons. Estes elementos parecem restritos a eucariotos. Em *Drosophila*, alguns retrotransposons bem conhecidos são *copia*, *412* e *gypsy*.

Elementos de Classe II: utilizam somente DNA como intermediário de transposição, sendo conhecidos como transposons propriamente ditos. Movimentam-se principalmente pelo mecanismo conservativo, onde a excisão do

elemento doador é seguida pela sua inserção em qualquer lugar do genoma. Têm sido encontrados tanto em procariotos como em eucariotos. Exemplos de TEs desta categoria em *Drosophila* são *mariner*, *hobo* e *P*.

Em relação à sua mobilidade, os TEs podem ser autônomos ou não-autônomos (ou defectivos). Os elementos transponíveis autônomos têm a capacidade de se auto transpor por apresentarem a forma completa do elemento. Os elementos defectivos já se encontram na sua forma incompleta, dependendo, assim, da ação da enzima responsável pela transposição de um outro elemento presente no genoma do mesmo hospedeiro.

Acredita-se que a origem dos elementos transponíveis dentro do genoma de uma espécie possa ocorrer pelo rearranjo de seqüências genômicas, por transmissão horizontal ou ainda por transmissão vertical. Uma vez estabelecido dentro do genoma, o primeiro passo é caracterizado como uma fase invasora, onde o número de cópias aumenta. A taxa na qual este fenômeno ocorre depende de vários fatores que regulam a transposição de um elemento transponível. São eles: o próprio elemento, o genoma hospedeiro, fatores ambientais e interação entre todos estes parâmetros. O segundo passo seria a inativação ou imobilização do TE que depende, em grande parte, do seu impacto sobre o valor adaptativo do hospedeiro. Assim, tais elementos podem ser mantidos em estado de latência ou podem ser perdidos estocasticamente (Pinsker *et al.* 2001).

A importância do estudo de TEs reside nas conseqüências de sua mobilidade. O mecanismo de transposição pode gerar um repertório de efeitos mutacionais, como interrupções de módulos de leitura ou modificações na regulação de genes; quebras cromossômicas e, conseqüentemente, deleções, inversões, translocações e duplicações; bem como não-disjunções e distorções na segregação dos cromossomos na divisão celular. Além disso, a simples existência de múltiplas cópias destas seqüências favorece a incidência de recombinação entre elas, produzindo perda ou inversão da porção de DNA entre elas.

Alguns elementos transponíveis como *P* e *hobo* estão envolvidos com o fenômeno de disgenesia híbrida, síndrome que aparece principalmente em células

germinais da F1 de cruzamentos entre machos que contém o elemento *P* (linhagem P) com fêmeas que não o contém (linhagem M). Podem ocorrer mutações, reversões, esterilidade, recombinação em machos, rearranjos e não-disjunções cromossômicas causadas pela elevada taxa de transposição nas células germinais dos híbridos (Matsuura *et al.*, 1993).

O impacto de TEs sobre os genomas hospedeiros pode adquirir proporções distintas, dependendo se sua localização for eucromática ou heterocromática. Cópias ativas são encontradas principalmente na eucromatina, enquanto na heterocromatina observamos muitas cópias defectivas e rearranjadas. No entanto, permanece ainda a dúvida se existe uma preferência insercional de TEs por determinadas regiões ou se este padrão é resultado de diferentes pressões seletivas (Capy *et al.* 1998).

O papel dos elementos transponíveis como fonte importante de variabilidade para o genoma vem sendo bem estabelecido. Além disso, a descoberta de seqüências que podem movimentar-se revolucionou a idéia de que o genoma era algo estático, tendo capacidade de mudar somente em uma escala evolucionária lenta (Arkipova & Ilvin, 1992).

I.2. ELEMENTO TRANSPONÍVEL *P*

A família do elemento *P* é uma das mais bem caracterizadas nos organismos eucariotos. De acordo com uma boa quantidade de evidências, este elemento invadiu recentemente o genoma de *Drosophila melanogaster*, muito provavelmente por transferência horizontal de uma espécie do grupo *willistoni*, a *Drosophila willistoni*. Observações que estão de acordo com esta hipótese incluem: a) a alta similaridade entre as seqüências do elemento *P* de linhagens de *D. melanogaster* de origens diversas; b) a não existência de elemento *P* em outras espécies do subgrupo *melanogaster*; c) a seqüência de *P* de *D. willistoni* difere por apenas um único nucleotídeo em relação ao elemento *P* de *D. melanogaster* (o

que é inesperado se levarmos em conta a divergência das duas espécies, estimada em 50 milhões de anos); d) uma recente simpatria entre *D. melanogaster* e as espécies do grupo *willistoni* (revisões em Cummings, 1994; Capy *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1994).

Estudos da distribuição de seqüências homólogas a *P* no gênero *Drosophila* havia sugerido que ele é basicamente restrito ao subgênero *Sophophora*. Dentro do subgênero *Sophophora* foram detectadas seqüências de *P* em todas as espécies do grupo *willistoni*, *obscura* e na maioria das espécies do grupo *saltans*. Sua distribuição nas espécies do grupo *melanogaster* é descontínua, da mesma forma que em espécies fora do subgênero *Sophophora* (Anxolabéhère *et al.*, 1985; Daniels *et al.*, 1990). Entretanto, um elemento *P* possuindo alta similaridade com elementos em espécies de *Sophophora* foi encontrado em espécies do grupo *tripunctata*, pertencente ao subgênero *Drosophila*, que não havia sido testada nos trabalhos anteriores (Loreto *et al.*, 1998, 2001).

Além disso, a descoberta de seqüências *P* em espécies que não pertencem ao gênero *Drosophila*, como *Lucilia cuprina* (*blowfly*) (Perkins & Howells, 1992) e *Musca domestica* (Lee *et al.*, 1999), sugere que este TE seja mais amplamente distribuído do que inicialmente parecia ser. A homologia encontrada entre o elemento *P* de *Lucilia cuprina* e o de *D. melanogaster* é estimada em 50% em nível dos nucleotídeos. Uma vez que estas duas seqüências são bastante divergentes das seqüências dos elementos *P* de drosofilídeos, e já que a amostragem tem sido limitada, torna-se difícil determinar a origem destes dois elementos. Eles podem representar elementos antigos que foram encontrados em muitas espécies de dípteros, ou podem ter sido transferidos horizontalmente a estas taxa em algum tempo no passado (Clark *et al.*, 2002).

O elemento *P* completo de *D. melanogaster* possui um tamanho de 2,9 kb, sendo flanqueado por repetições terminais invertidas (ITRs) de 31 pb em suas extremidades. Quatro exons são designados como fases abertas de leitura (ORFs) numeradas de 0 a 3 (Figura 1). Elas codificam dois polipeptídeos envolvidos na transposição do elemento: uma transposase de 87 kDa, codificada pelos quatro

exons, e uma proteína repressora de 66 kDa, codificada pelos três primeiros exons (Rio *et al.*, 1986). Poucas cópias do elemento *P* presentes no genoma de *D. melanogaster* são de elementos autônomos, e a maioria são elementos não autônomos, resultantes de deleções internas ou outras mutações, geralmente pequenos e derivados de elementos completos. Muitas espécies nas quais elementos *P* têm “residido” por longos períodos de tempo portam apenas elementos não autônomos divergentes.



Figura 1 . Esquema baseado na seqüência do elemento completo de *P* de *Drosophila melanogaster*, segundo número de acesso GeneBank X06779, modificado. (Clark & Kidwell 1997).

Muitas propriedades da biologia de elementos *P* ativos, entretanto, são consistentes com a hipótese de transferência horizontal. Primeiro, eles possuem todas as propriedades necessárias para mobilidade (como codificar uma transposase). Segundo, estudos teóricos e de laboratório demonstram que a alta eficiência de transposição em genomas desprovidos do elemento supera os efeitos deletérios associados com a transposição. Terceiro, o modo replicativo de transposição do elemento *P* leva a um acréscimo do seu número de cópias no genoma. Dadas estas propriedades, se um elemento *P* ativo é introduzido no genoma de uma espécie que não o contém, mas que pode suportar transposição, há chances razoavelmente boas de que o elemento possa se distribuir entre a população.

Uma alternativa a este tipo de explicação, seria a ocorrência de perda estocástica, defendida por Engels (1986). Segundo este autor, a existência de *P* em algumas espécies relacionadas e a sua ausência em outras seria devida à perda destas seqüências em alguns genomas e não em outros durante o tempo de evolução. O volume crescente de dados moleculares disponíveis e a comparação entre a seqüência de nucleotídeos nos últimos anos, entretanto, têm dado suporte

à idéia de transmissão horizontal. A ocorrência conjunta de ambos, no entanto, não deve ser descartada.

Elementos transponíveis são transmitidos verticalmente, de geração para geração, juntamente com o restante do genoma. Entretanto, a análise da distribuição destes elementos em diferentes espécies e a discrepância entre filogenias baseadas em seqüências de TEs e filogenias de acordo com caracteres clássicos, sugerem a possível existência de transferência horizontal entre espécies (Clark, 2002).

Um dos primeiros exemplos conhecidos de inconsistência entre filogenias de elementos transponíveis e de espécies, baseados em vários marcadores genéticos e moleculares, refere-se à particular distribuição de seqüências de elemento *P* em espécies distantemente relacionadas.

I.3. ELEMENTO TRANSPONÍVEL *GYPHY*

Gypsy (também conhecido como *mdg4*), é um retrovírus endógeno primeiramente identificado em *Drosophila melanogaster*. Possui 7,5 kb de comprimento e LTRs com 482 pb (Georgiev, 1980; Bayev *et al.* 1984), pertencendo à superfamília *gypsy*/Ty3 de retrotransposons (Capy *et al.*, 1998). A relação íntima entre este grupo de TEs e os retrovírus tem sido bastante discutida, já que mostram uma estrutura genômica similar à forma pró-viral de retrovírus de vertebrados e exibem propriedades infectivas em condições particulares (Kim *et al.*, 1994; Bucheton, 1995; Péliesson *et al.*, 1997; Lerat & Capy 1999).

Alguns cenários evolutivos têm sido sugeridos a respeito destas similaridades. Por exemplo, Xiong & Eickbush (1990) e McClure (1991) analisaram similaridades de transcriptases reversas de muitos retroelementos, incluindo retrotransposons e retrovírus. Estes autores sugerem que retrovírus podem ter evoluído de retrotransposons com LTRs por adquirirem um gene *env* funcional.

Capy *et al.*, (1996) também fazem tal sugestão tendo como base a comparação da assinatura DDE integrase/transposase.

Assim como em outros retrovírus, *gypsy* possui um genoma que codifica três genes diferentes chamados de *gag*, *pol* e *env*, que são requeridos para sua replicação e infectividade (Figura 2). Os primeiros dois genes são traduzidos como um único RNA. O produto de *gag* é o precursor de proteínas estruturais do capsídeo viral. O gene *pol* é expresso fusionado à *gag* sendo posteriormente clivado para dar origem à transcriptase reversa e enzimas como protease, RNaseH e integrase. O terceiro gene, localizado na porção 3' do genoma é expresso como um transcrito processado e codifica os componentes do envelope viral que permitem a entrada do vírus na célula por interação com receptores celulares seguido de fusão da partícula viral com a membrana da célula (Pélisson *et al.* 1994).



Figura 2 . Esquema baseado na seqüência do retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster*.

A superfamília "*gypsy-like*" constitui um grupo heterogêneo, amplamente distribuído entre os eucariotos (Marín & Lhoréns 2000). Miller *et al.* (1999) identificaram e relacionaram filogeneticamente, seqüências de retrotransposons da superfamília "*gypsy-like*" nos mais diferentes grupos de organismos, incluindo várias classes de vertebrados. Os autores não encontraram seqüências relacionadas apenas em aves e mamíferos. Os resultados obtidos evidenciaram uma relação entre seqüências homólogas a *gypsy* de vertebrados e fungos, ao invés de vertebrados e insetos (invertebrados) como seria o esperado. Eventos de transmissão horizontal ancestral entre filós ou a existência de diferentes linhagens destas seqüências podem ser possíveis explicações para estes achados.

Quando a sonda de *gypsy* de *D. melanogaster* é utilizada para investigar a presença destas seqüências em genomas de outras espécies, novamente a ampla distribuição deste elemento é evidenciada (Stacey *et al.* 1986; Alberola *et al.* 1997; Loreto *et al.* 1998a). No entanto, o sinal da hibridização é bastante variável, indicando considerável divergência das espécies analisadas.

A ampla distribuição de *gypsy* entre espécies do gênero *Drosophila* (Stacey *et al.* 1986; Loreto *et al.* 1998; Biémont & Cizeron 1999; Sassi, 2000) é atribuída, por muitos autores, à existência de elementos *gypsy* ancestrais nestes insetos. No entanto, se levarmos em consideração as características infectivas de *gypsy* de *D. melanogaster*, eventos infectivos podem ter ocorrido e propiciado esta grande expansão (Alberola & De Frutos 1996; Vázquez-Manrique *et al.* 2000). Assim, fenômenos de transmissão horizontal podem explicar o complexo cenário de distribuição deste elemento (Herédia, 2002).

Stacey *et al.* (1986) realizaram uma ampla investigação sobre a distribuição de *gypsy* de *D. melanogaster* em outras espécies do gênero *Drosophila*, através do método de *Southern blot*. Estes autores observaram a ampla distribuição com descontinuidades ocasionais e salientam que o grau de similaridade medido pelo sinal de hibridização não se correlaciona com o grau de divergência entre sonda e a espécie investigada, no que se refere à similaridade em seqüência e parentesco filogenético. Estes dados foram confirmados diante da seqüência completa de *gypsy* de *D. subobscura* e *D. virilis*. Estas seqüências são discrepantes em relação aos seus tempos de divergência e autores sugerem que eventos de transmissão horizontal podem ter ocorrido na história evolutiva de *gypsy* entre estas espécies (Alberola & De Frutos 1993).

A primeira evidência de transferência horizontal de uma linhagem contendo elementos *gypsy* transposicionalmente ativos para uma linhagem "vazia" é de Kim *et al.*, (1994), que sugerem que *gypsy* de *Drosophila melanogaster* seria um retrovírus infeccioso, devido à produção da proteína *env*.

Terzian *et al.*, (2000) analisaram filogeneticamente uma porção do gene da integrase de *gypsy* de espécies do subgrupo *melanogaster* e detectaram a

formação de duas linhagens de *gypsy*, além de um complexo padrão de transferência vertical com múltiplos eventos de transmissão horizontal.

Recentemente, o trabalho de Herédia (2002), bem mais abrangente do que todos os anteriores, incluindo 23 espécies de Drosophilidae neotropicais não estudados previamente, propiciou um corpo de dados bastante sólido a favor da ocorrência de transferência horizontal de *gypsy*.

No caso de *gypsy*, este fenômeno poderia ocorrer sem um vetor, como um parasita ou vírus, já que este retrotransposon pode codificar uma partícula infecciosa.

I.4. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL

Transferência gênica lateral ou horizontal é definida como a transferência assexuado de informação genética entre genomas, sendo tal termo geralmente restrito à transferência entre genomas nucleares de organismos de diferentes espécies. A transferência horizontal é distinta do modo normal de transmissão pelo qual a maioria dos genes, na maior parte do tempo, são transmitidas verticalmente dos pais para a prole (Kidwell, 1993).

Embora pareça apropriado que apenas uma minoria de genes, ou outras seqüências, possam ser adquiridos lateralmente, níveis extremamente baixos de transmissão ainda poderiam ter significado evolutivo considerável.

Geralmente, análises filogenéticas de seqüências de dados produzem árvores que são consistentes com a hipótese de transferência vertical estrita. Transferência gênica horizontal deve ser suspeitada, quando anomalias aparecem nas árvores produzidas por tais seqüências, apesar de outras hipóteses poderem ser ainda consideradas para explicar anormalidades, como perda estocástica nos genomas de algumas linhagens e/ou espécies derivadas.

Smith *et al.* (1992) recomendam estes critérios para o uso de dados moleculares de seqüências para estimar eventos de transferência horizontal: 1) os

dados de seqüências devem ser disponíveis de um número de organismos evolutivamente distantes; 2) além do taxon excepcional sob escrutínio, o taxa remanescente deve mostrar mudanças nas seqüências que sejam consistentes com uma filogenia convencional; 3) a árvore deve ser enraizada apropriadamente com os dados da seqüência de uma espécie mais distante cuja classificação não é disputada (grupo externo); 4) a concordância das topologias das árvores produzidas por mais de um método de análise filogenética fortalece o resultado; 5) é interessante, ainda, encontrar a mesma topologia filogenética convencional usando um diferente conjunto de seqüências do mesmo grupo filogenético.

Uma das situações mais comuns explicadas por transferência horizontal é a presença de descontinuidades em um conjunto de dados filogenéticos, isto é, uma situação na qual um gene é encontrado em uma única espécie, mas está ausente em espécies intimamente relacionadas. Ao nível populacional, a observação de distribuições descontínuas de seqüências dentro de uma única espécie pode fornecer uma evidência adicional consistente com transferência horizontal.

I.5. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE ELEMENTOS MÓVEIS

Transferência gênica horizontal é um fenômeno comum em bactérias e vem aumentando seu reconhecimento na evolução de células eucarióticas (Syvanem & Kado, 2002), mudando assim, a antiga idéia de sua não ocorrência ou de sua pouca importância entre eucariotos. Alguns dos melhores exemplos têm sido obtidos com elementos transponíveis em metazoários, como é o caso da invasão do elemento *P* de *Drosophila willistoni* em *Drosophila melanogaster* (Daniels *et al.*, 1990), um caso bem documentado de transferência horizontal, onde a extensa representatividade de coletas deste organismo modelo para estudos evolutivos permitiu o acompanhamento da invasão do elemento *P* nesta espécie.

Outro excelente exemplo de expansão de transposons envolve *mariner*, um TE encontrado originalmente em *Drosophila*, mas subsequente descoberto em muitos outros filos de metazoários (Robertson & MacLeod, 1993).

Evidências recentes indicam que *copia* (Jordan *et al.*, 1999), *gypsy* (Herédia, 2002) e outros retroelementos também têm sido horizontalmente transferidos entre espécies.

Embora difícil de se documentar rigorosamente, existem algumas evidências de que elementos transponíveis eucarióticos poderiam ser mais suscetíveis a transferência gênica horizontal do que genes do hospedeiro que são transmitidos estritamente através de herança Mendeliana (Kidwell, 1993). Tal fato não é surpreendente, porque TEs possuem a vantagem óbvia de possuírem a maquinaria molecular que facilita tal transferência. Além disso, sustenta-se que a transferência horizontal para novos hospedeiros pode ser essencial para a sobrevivência de alguns TEs através de longos períodos do tempo evolutivo (Kidwell, 1992; Lohe *et al.*, 1995).

O fato dos TEs eucarióticos se movimentarem através de dois tipos de mecanismos de transposição, entretanto, implica em certas diferenças de oportunidade para transferência lateral ou horizontal.

Os casos de transferência horizontal do elemento *P* são clássicos, uma vez que é um dos TEs eucarióticos melhor descritos (Engels, 1989); um dos primeiros casos encontrados de transferência horizontal eucariótica (Daniels *et al.*, 1990) e subsequente invasor de outras espécies (Kidwell, 1992; Anxolabéhère *et al.*, 1988). Ainda, a história evolutiva do gênero *Drosophila* tem sido extensamente estudada e existem estimativas razoáveis sobre o tempo de divergência das espécies, o que nos fornece um contexto no qual pode-se tentar estimar o espaço de tempo entre eventos de transferência horizontal.

Não é coincidência que um evento de transferência horizontal que introduziu o elemento *P* no genoma de *D. melanogaster* tenha ocorrido apenas recentemente. *Drosophila willistoni* e *D. melanogaster* têm se tornado espécies simpátricas apenas através das atividades modernas humanas, provavelmente dentro dos últimos 200 anos (Engels, 1992).

Conseqüentemente, apenas durante o último século existiu realmente a possibilidade de *D. melanogaster* compartilhar a amplitude de distribuição

geográfica de *D. willistoni*, a qual distribui-se desde o sul da Flórida ao norte da Argentina (Spassky *et al.*, 1971). Portanto, a transferência horizontal entre estas duas espécies não seria possível na natureza até apenas muito recentemente. Segundo Kidwell (1983) e Anxolabéhère *et al.*, (1988), a invasão do genoma de *D. melanogaster* pelos transposons *P*, a partir de *D. willistoni*, teria ocorrido a partir da década de 1950, em localidades mais ao sul da América do Norte (Flórida e México), onde *D. willistoni* é simpátrica com a cosmopolita *D. melanogaster*.

Baseados em estudos de evolução molecular (usando a divergência entre elementos *P* em sítios não sinônimos), a idade do mais recente ancestral comum de elementos *P* canônicos tem sido estimada em 2 –3 milhões de anos (Silva & Kidwell, 2000). Os autores também concluem que elementos *P* canônicos vêm transferindo-se horizontalmente entre espécies a uma taxa maior do que pensado anteriormente.

A existência de seqüências homólogas ao elemento *P* de *Drosophila melanogaster* foi detectada em *Drosophila mediopunctata*, um membro do grupo *tripunctata*, subgênero *Drosophila*; sendo o primeiro relato de um elemento *P* canônico fora do subgênero *Sophophora* (Loreto *et al.*, 2001). Baseado na marcante incongruência entre a filogenia no elemento *P* e a filogenia das espécies hospedeiras, a presença de um elemento *P* canônico em *D. mediopunctata* (e não em nenhuma outra espécie a ela relacionada) é melhor explicada por transferência horizontal entre espécies.

A ausência de dados adequados têm impossibilitado muitas vezes a obtenção de uma estimativa da freqüência de transferência horizontal através do tempo evolutivo, seja por seqüências de elementos transponíveis ou qualquer outro tipo de genes. Especulações a respeito de freqüência e significância deste fenômeno têm sido baseadas em observações limitadas. Por um lado, a alta proporção de congruência de muitas filogenias baseadas em múltiplas características, têm sugerido que transferência horizontal deve ter ocorrência extremamente rara. Por outro lado, um número de incongruências filogenéticas continuam inexplicadas, mas o nível de resolução de análises prévias não foi

refinado o suficiente, para escolher sem ambigüidade, a mais provável entre as explicações alternativas. Tal situação está mudando com a disponibilidade de dados abundantes de seqüências de muitos organismos, o que pode tornar possível a obtenção de estimativas de freqüência de eventos de transferência horizontal.

Embora o mecanismo exato de transferência horizontal seja desconhecido, o requerimento mínimo deve ser a sobreposição geográfica, temporal e ecológica entre a espécie doadora e a receptora de uma seqüência móvel, além da atuação de prováveis vetores. Deve ser considerado ainda, que estes pré-requisitos possam ter ocorrido em condições ambientais diferentes das encontradas no presente.

Graças a fortes barreiras naturais ao fluxo gênico em eucariotos, a transferência de seqüências nestes organismos deve ocorrer em uma baixa freqüência por conjugação entre reinos. Em poucas situações, tais como relações simbióticas, a proximidade física deve existir entre o doador e o receptor para permitir a transferência. Em outras situações, um vetor será necessário, e torna-se interessante a identificação de agentes biológicos que poderiam atuar como vetores para transporte de seqüências de DNA entre espécies isoladas reprodutivamente. Na ausência de evidências experimentais, um número de prováveis vetores têm sido considerados. A lista inclui vírus, micoplasmas, bactérias, protozoários, fungos e pequenos artrópodos (revisões em Duesberg, 1983; Ikawa, 1974; Syvanem, 1987).

Nos últimos dez anos, um vetor em potencial de transferência horizontal de seqüências de DNA entre espécies de *Drosophila* foi identificado por Houck *et al.*, (1991). O vetor candidato, *Proctolaelaps regalis* DeLeon, é um ácaro semiparasita. É considerado um vetor por causa do seu modo parasítico de alimentação; suas estruturas gnatosomais adaptadas para alimentação de fluidos e digestão pré-oral; seu trânsito veloz entre indivíduos predados; sua similaridade de utilização de habitat com *Drosophila* de frutos caídos e fermentados e sua intrínseca simpatria com *Drosophila*. O comportamento alimentar deste ácaro parece simular o método de micro-injeção usado por muitos pesquisadores de *Drosophila* para transferência

intra e interespecífica de genes por transformação mediada pelo elemento *P* (Spradling, 1982). Em qualquer de suas fases do desenvolvimento, mas especialmente no embrião inicial, que passa pela fase de blastoderme sincicial, quando muitos núcleos estão em divisão, sem a barreira da membrana plasmática, ao preda o hospedeiro com o uso de suas quelíceras o ácaro injeta um líquido anticoagulante e suga o conteúdo. Ao fazer isto, ele funciona como uma verdadeira agulha de micro-injeção, cujo potencial transformante é particularmente efetivo se em um substrato compartilhado por duas espécies, o ácaro preda o ovo de um e logo em seguida o de outro.

Além disso, ácaros *P. regalis* associados com uma linhagem *P* de *D. melanogaster* mostraram portar seqüências de elemento *P* (Houck *et. al.*, 1991). O mecanismo de transferência mais comum parece ser o de vetor mecânico, mas as possibilidades de integração do DNA de *Drosophila* no genoma do ácaro, ou o envolvimento secundário de um vírus ou bactéria não podem ser excluídos.

Numerosos trabalhos sobre provável transferência horizontal envolvendo elementos genéticos transponíveis eucarióticos têm surgido nos últimos anos, como consequência da disponibilidade do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar seqüências de DNA específicas. No entanto, a evidência de transferência horizontal é geralmente sugestiva, mas usualmente não conclusiva.

É nossa opinião que ambas as linhas de evidências estejam corretas nas suas formulações e que a ocorrência de um fenômeno (transferência de material genético através de um vetor) não exclua o outro (perda estocástica). É importante salientar ainda, que a maioria destes estudos têm usado linhagens de moscas provenientes de bancos de estoques, e como tal, coletadas há bastante tempo e mantidas em números pequenos e em condições muito diferentes das da natureza. Daí a necessidade de se realizar este tipo de estudo em condições mais próximas às que ocorrem na natureza.

Tais achados têm alta relevância evolutiva e, virtualmente, nada neste sentido foi feito com espécies e gêneros neotropicais de ácaros, nem tem sido

investigado do ponto de vista da presença ou ausência neles, de quaisquer das 20 ou mais famílias conhecidas de transposons.

Portanto, a dinâmica evolutiva de elementos transponíveis é complexa, refletindo um balanço entre o aumento do número de cópias através de transposição replicativa e decréscimo através de forças estocásticas e pela ação da seleção natural. Além disso, a situação é complicada pela aparente propensão de transferência horizontal de elementos transponíveis entre as espécies (Kidwell, 1992, 1993).

Assim, estudos de elementos transponíveis podem ajudar a identificar problemas potenciais com análises filogenéticas que estão associados com suas características e durante o processo providenciar esclarecimentos dentro da prática de filogenias moleculares.

I.6. ÁCAROS SEMI-PARASITAS DE *Drosophila*

Há bastante tempo temos observado nas moscas que coletamos na natureza junto com os seus substratos (principalmente frutos fermentados), que drosófilas de várias espécies são semi-parasitadas por muitas formas de ácaros que predam ovos, larvas, pupas e adultos. Estes ácaros são difíceis de serem eliminados das culturas e o significado evolutivo de tais associações tem nos intrigado especialmente depois que a hipótese de transmissão horizontal de genes via ácaros ganhou consistência com os trabalhos conduzidos por Margareth Kidwell e sua equipe da Universidade do Arizona (Houck *et al.*, 1991). Assim, motivados pela atualidade do tema e pelo papel recém atribuído aos elementos transponíveis como geradores de variabilidade genética e aos ácaros como seus vetores, foi iniciado um estudo visando detectar sinais da presença do elemento *P* em ácaros que vivem associados às comunidades neotropicais de *Drosophila*.

Ácaros do gênero *Proctolaelaps* (família Ascidae) são predadores de ovos que têm sido freqüentemente encontrados em culturas de laboratório de *D. melanogaster*. Há poucos estudos sobre sua biologia (revisão em Ashburner, 1989), mas uma infestação densa pode eliminar uma cultura de *Drosophila* por predação de todos os ovos ou por impedir a cópula de adultos, já que muitos ácaros se concentram na úmida região genital tanto de machos como de fêmeas (Figura 3). Além disso, eles movem-se com excepcional rapidez e são difíceis de conter.



Figura 3. *Drosophila melanogaster* parasitada por ácaros em laboratório. As setas indicam os ácaros localizados na região genital da mosca.

Segundo identificação do Dr. Reinaldo Feres, da UNESP, pelo menos *Tyrophagus putrescentiae*, *Proctolaelaps* sp. e um membro da família Histiotomidae, estão associados às nossas comunidades de moscas do Rio Grande do Sul. A amplificação por PCR de 553 pb do terceiro íntron do elemento *P* usando primers desenhados para detecção deste elemento em *Drosophila*, feita em nosso laboratório (Carareto *et. al.*, 1996), revelou que estes três ácaros têm seqüências homólogas ao elemento *P* no seu genoma. As implicações evolutivas destes achados são imensas, tendo aberto caminho para a realização de um projeto de longa duração.

Estes achados, portanto, foram o estímulo para a continuação e ampliação dos estudos sobre o papel deste e de outros elementos transponíveis ao nível de "guildas" de insetos e seus parasitas, provenientes de populações naturais. Guilda ou grupo funcional é um grupo de espécies que exploram a mesma classe de recursos ambientais de modo similar (Root, 1967; Hawkins & Macmahon, 1989).

Root (1967) cunhou o termo guilda como um modo de agrupar espécies, sem considerar sua posição taxonômica, que sobrepõem significativamente suas necessidades de nichos. Ele também sentiu que uma vantagem do uso do conceito de guilda, era que ele focava a atenção em todas as espécies simpátricas envolvidas numa interação competitiva, independentemente de seu relacionamento taxonômico. Muitos dos estudos experimentais e comparados de partição de recursos e competição interespecífica, mesmo para drosofilídeos, agora definem espécies de interesse, como membros da mesma guilda. Devido a esta ênfase, tal conceito é usado para discutir todos os aspectos da competição e do nicho relacionados a uma ampla variedade de fenômenos ecológicos (Hawkins & Macmahon, 1989).

Assim sendo, pelas particularidades dos problemas que nos propusemos a estudar, entendemos que começar caracterizando elementos transponíveis em drosófilas, ácaros e parasitóides de guildas recém coletadas pode ser bastante promissor e contribuir para o estabelecimento de algumas relações de causa e efeito entre diversidade genética e riqueza de elementos transponíveis.

I.7. PARASITÓIDES DE *Drosophila*

A maioria dos insetos têm suas vidas encurtadas pelos parasitóides, especialmente os himenópteros parasitóides. Estes organismos utilizam os seus hospedeiros apenas em algumas fases do seu ciclo ontogenético e não em todas elas como o fazem os parasitas. A análise comparada dos atributos de importância ecológica e evolutiva destes organismos revela que, apesar das espécies de parasitóides exibirem uma diversidade biológica e taxonômica notável, eles apresentam uma importante convergência evolutiva, pois diferentes espécies de parasitóides tendem a resolver problemas reprodutivos semelhantes, através de estratégias adaptativas similares, quando não idênticas. Entretanto, é muito útil o emprego de sistemas parasitóide-hospedeiro que sejam de baixo custo, baratos

para manutenção, ocupem pequeno espaço, e que sejam de fácil manipulação e muito produtivos. Pavan e Stunkel (1982) afirmam que o uso de sistemas parasitóide-*Drosophila* não só satisfaz estes requisitos de criação, como apresenta grande potencial para estudos de especiação, corte, relações parasitóide-hospedeiro, etc.

Os himenópteros parasitóides, que constituem taxonomicamente a Serie Parasítica e abrangem mais de 200 mil espécies conhecidas, possuem algumas características notáveis que contribuem para sua enorme diversidade: ampla diversidade de padrões de vida de seus membros, especiação rápida, padrão de evolução cariotípica, especificidade de hospedeiro e produção de guildas. A ocorrência de espécies crípticas e a especiação rápida estão associadas a uma grande especificidade de hospedeiro. Na região neotropical, *Ganaspis xanthopoda* contém espécies crípticas que se diferenciam na especificidade de hospedeiro, sendo que uma delas só parasita *D. mercatorum*, e a outra só *D. melanogaster* (Zim & Pavan, 1982; Almeida & Sampaio, 1993).

Apesar de que só alguns sistemas parasitóide-hospedeiro naturais foram intensamente estudados, inclusive alguns sistemas parasitóide-*Drosophila*, eles evidenciam mudanças coevolutivas rápidas e recíprocas entre as duas espécies envolvidas. Os parasitóides podem modificar os valores seletivos em uma população polimórfica do hospedeiro e assim, modificar indiretamente a resposta adaptativa daquela população ao seu ambiente (Mendonça, 2000). O entendimento das interações coevolutivas entre parasitóides e seus hospedeiros demandam assim, não só uma integração dos aspectos genéticos e demográficos de seus relacionamentos, mas também uma visão mais ampla dos fenômenos genéticos que controlam as populações do parasitóide e de seu hospedeiro. Esta visão sintética deveria ser aplicada aos dados biológicos, integrando aspectos ecológicos, genéticos e demográficos.

A maioria das espécies de himenópteros parasitóides tem especificidade de hospedeiro, e parasita uma ou poucas espécies (Waage & Hassel, 1982). A maioria

das espécies de parasitóides utiliza um ampla gama de hospedeiros naturais, apesar de terem certa especificidade (Carton *et al.*, 1986).

Do material que emerge em nosso laboratório, coletado como pré-adultos (ovos, larvas e pupas) em frutos fermentados, há mais de 20 anos, freqüentemente temos observado a emergência de microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*. Vilela (2000) fez um levantamento de insetos que emergiam em laboratório de frutos caídos de *Citharexylum myrianthum* Cham. (Verbenaceae), coletados em São Paulo, e encontrou microhimenópteros parasitóides das famílias Braconidae, Figitidae e Pteromalidae. Pelas suas características, microhimenópteros diferentes podem ser identificados pela fase do ciclo e pelo seu padrão de predação das pupas (cicatriz deixada no pupário). Nesses casos, ao invés de emergir uma drosófila adulta de sua pupa ao fim da metamorfose, emerge um microhimenóptero adulto.

McAllister & Werren (1997) analisaram o padrão filogenético do retroelemento NATE (NAsonia Transposable Element) no genoma de vespas parasitóides da família Pteromalidae, a partir da análise de uma região contendo o domínio de transcriptase reversa em 9 diferentes espécies. NATE é um membro do grupo *gypsy/Ty3* de retrotransposons com LTRs (McAllister, 1995). Os autores não observaram padrões inconsistentes com a manutenção vertical do elemento durante a divergência destas espécies.

Dada a sua estrita associação com *Drosophila*, a alta freqüência com que são detectados e a oportunidade ecológica de ocorrência de transferência horizontal entre hospedeiro-parasitóide mediada por vetores secundários, resolvemos incluir os parasitóides emergidos de pupas de *Drosophila*, juntamente com ácaros coletados em frutos, em um estudo de varredura sobre a presença, compartilhada ou não, de elementos transponíveis. Desta forma, nosso trabalho tem os objetivos seguintes.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL:

Contribuir para o conhecimento da dinâmica dos elementos transponíveis e suas possíveis implicações evolutivas através da procura de possíveis vetores de transferência horizontal.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Investigar, por PCR e *Southern blot*, a possibilidade de existência de seqüências homólogas aos elementos *P* e *gypsy* de *Drosophila* no genoma de ácaros parasitas vindos da natureza e em associação com espécies de *Drosophila*.

2) Investigar, por PCR e *Southern blot*, a possível presença de seqüências homólogas aos elementos *P* e *gypsy* de *Drosophila* no genoma de microhimenópteros (vespas) parasitóides de *Drosophila* emergidos em laboratório a partir de amostras vindas da natureza.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Coleta

As coletas de *Drosophila*, ácaros e parasitóides associados foram feitas no Jardim Botânico, Parque Gabriel Knijnik e Parque Farroupilha na área urbana de Porto Alegre (30°02' S - 51°14' N) e Parque Estadual de Itapuã - RS (30°22' S - 51°02' W).

Foram coletados indivíduos que sobrevoavam diferentes frutos (nativos e exóticos) existentes nestes locais, através do uso de uma rede entomológica, e os indivíduos foram colocados em tubos de vidro e levados para o laboratório.

Amostras de frutos maduros e caídos também foram coletados e levados para o laboratório onde foram colocados em vidros com vermiculita e armazenados numa câmara de temperatura e umidade relativa controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60% u.r.) e sob luz contínua, para que os adultos que destes frutos emergissem pudessem ser também quantificados e identificados de acordo com a chave de Freire-Maia & Pavan (1949). As pupas foram recolhidas para verificação de sua integridade ou vestígios de predação.

III.2. Manutenção dos estoques

Os estoques de *Drosophila* foram mantidos por cruzamento massal em câmara de temperatura constante de $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60% u.r., em tubos contendo meio de cultura padrão (Marques *et al.*, 1966). A linhagem controle utilizada foi *Drosophila melanogaster* Harwich (controle positivo para a presença dos elementos transponíveis *P* e *gypsy*).

O DNA das moscas foi extraído conforme protocolo descrito em Jowett (1986).

III.3. Obtenção de DNA dos ácaros

Os ácaros obtidos da natureza por meio das coletas foram rigorosamente controlados (as garrafas de cultivo foram mantidas isoladas, dentro de bandejas metálicas com 2 cm de água com sabão em pó dissolvido, segundo recomendação de Ashburner, 1989), evitando a contaminação dos estoques de *Drosophila* mantidos em laboratório e dos próprios estoques e ácaros deste trabalho.

Os ácaros das espécies presentes no laboratório foram retirados do meio de cultura de moscas com um pincel de ponta fina molhado em álcool 70% e examinados sob a lupa. Os ácaros grudados no pincel úmido foram transferidos para uma placa de Petry contendo álcool 70% para que fossem separadas as diferentes espécies e posteriormente extrair-se o DNA. Para tal, indivíduos classificados como pertencentes aos diferentes taxa, foram estocados em tubos eppendorf e congelados até obter-se um mínimo de indivíduos capaz de propiciar uma boa quantidade de DNA.

III.4. Preparação das lâminas para identificação dos ácaros

Os ácaros foram coletados com o auxílio de um pincel de ponta fina, separados em álcool 70% para posterior montagem com meio de Hoyer (Jeppson *et al.*, 1975) e identificação ao microscópio. As lâminas montadas foram mantidas em estufa a 50-60°C por cerca de 10 dias, para fixação, distensão e clarificação das espécies e secagem do meio. Após, foram tornadas permanentes, fechando as bordas das lamínulas com luto (breu e cera) comumente utilizado para os preparados de citologia.

A identificação dos ácaros foi feita junto com o Dr. Noeli Juarez Ferla, da UNIVATES – Centro Universitário - Lajeado, RS, com o uso das chaves de Krantz (1970).

III.5. Extração de DNA

O DNA das espécies de ácaros foi extraído a partir de dois protocolos previamente testados. A primeira técnica utilizada foi uma adaptação do protocolo segundo Loxdale (1988). Os ácaros foram macerados em nitrogênio líquido dentro de um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e o homogenado foi incubado a 55°C por aproximadamente 14 horas em tampão de lise (100mM Tris HCl; 100mM EDTA; SDS 1%; 60mM NaCl) e 0,11µg/µl de proteinase K. Após, foram tratados com 0,013µg/µl de RNase por 1 hora a 37°C. A extração do DNA foi feita com acetato de amônio 2,6M. O DNA foi precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol e ressuspendido em 20 µl de água miliQ. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, usando os fragmentos do marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (GIBCO/BRL) como controle. O segundo método utilizado para extrair o DNA foi o protocolo do "kit" Dneasy™ Tissue Kit da QIAGEN®, particularmente eficiente para pequenas amostras.

III.6. Obtenção de DNA de parasitóides

Os microhimenópteros parasitóides emergidos das culturas de *Drosophila* foram identificados junto com o Dr. Milton Mendonça Jr. e o apoio do mestrando Marco Gottschalk, do Departamento de Zoologia da UFRGS. Após, as espécies foram fotografadas e congeladas até que quantidades suficientes de espécimens de cada taxon fossem obtidos.

III.7. Extração de DNA

Foram utilizados novamente os dois métodos : o protocolo segundo Loxdale (1988) e o "kit" Dneasy™ Tissue Kit da QIAGEN®. Cerca de 5 indivíduos foram macerados em nitrogênio líquido dentro de um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e o homogeneizado foi incubado a 55°C por aproximadamente 14 horas em

tampão de lise (100mM Tris HCl; 100mM EDTA; SDS 1%; 60mM NaCl) e 0,11µg/µl de proteinase K. Após, foram tratados com 0,013µg/µl de RNase por 1 hora a 37°C. A extração do DNA foi feita com acetato de amônio 2,6M. O DNA foi precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol e ressuspendido em 20 µl de água ultra pura (milliQ). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, usando os fragmentos do marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (GIBCO/BRL) como controle.

III.8. Controle da qualidade do DNA

Todos os DNAs utilizados nas reações de amplificação foram testados para verificar sua qualidade, ou seja, para saber se a falta de amplificação de algum fragmento significava que ele não estava presente no genoma dos indivíduos ou que o DNA não tinha qualidade suficiente para acontecer a amplificação. Para isso, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para o gene rRNA 18S que foram desenhados em regiões conservadas dos genes de *Drosophila melanogaster* e camundongo (*Mus musculus*). Os oligonucleotídeos utilizados foram os seguintes: 18S1 (5'ATTGACGGAAGGGCACCA 3') e 18S2 (5'AGCGACGGGCGGTGTGTA 3') que amplificam uma região de 591 pb no genoma de *Drosophila melanogaster*.

III.9. Amplificação do elemento *P* por PCR

Foram utilizados dois pares de *primers*. O primeiro par foi retirado do mapa de p π 25.1 de O'Hare & Rubin (1983) e amplifica uma seqüência de 553 pb sobre a região do terceiro íntron do elemento *P*: P1 5' TGCTTCGCTTGATGGCTT 3' e P2 5' CAACTCATCCATTTCCGGT 3'. O segundo par de *primers* desenhado por Loreto e usado em Carareto *et al.* (1996) anelam em uma região entre o primeiro e o segundo exons do elemento *P* e o tamanho do fragmento amplificado é de 960 pb:

P (843) 5' CCTAATGGACAGTGATGG 3' e P (1766) 5' ACGAAGCGAACTACCGAA 3' (Figura 4).

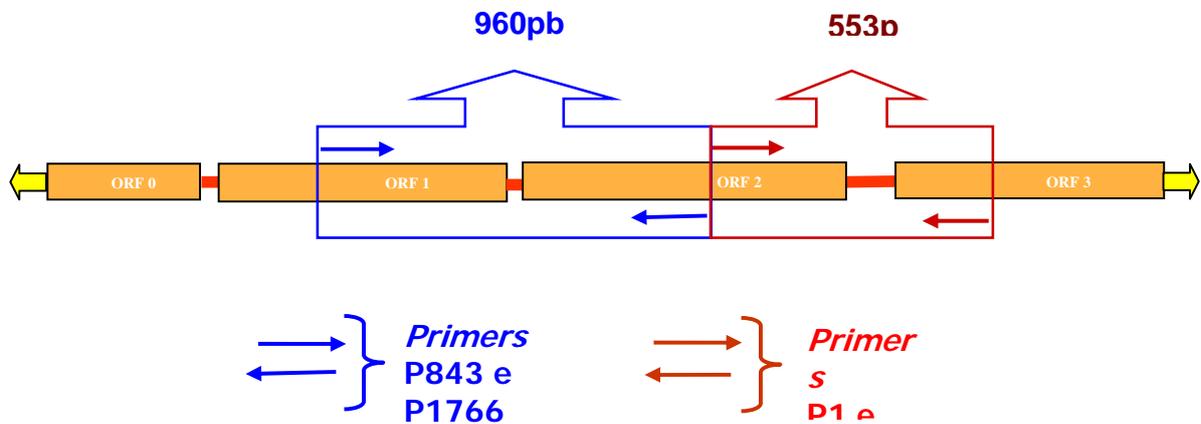


Figura 4 . Esquema das regiões de anelamento dos *primers* utilizados baseado na seqüência do elemento completo de *P* de *Drosophila melanogaster*, segundo número de acesso GeneBank X06779, modificado. (Clark & Kidwell 1997).

Foram utilizados 15 ng de DNA para uma reação final de 15µl contendo 1U Taq polimerase (GIBCO/BRL), 1,5µl de tampão 10X fornecido pelo fabricante, 50µM de cada nucleotídeo, 20pmol de cada *primer* e 2,5mM de MgCl₂. As condições de amplificação para as reações foram: 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg e 72°C por 1,5 min, seguidos por 72°C por 5 min para finalizar a reação.

III.10. Amplificação do elemento *GYP*SY por PCR

Foram utilizados dois pares de *primers* degenerados desenhados pela Dra. Fabiana Herédia (Herédia, 2002) a partir de regiões conservadas baseadas no alinhamento de seqüências do retroelemento *gypsy* publicadas no Genbank (NCBI) de *D. melanogaster* (acesso M12927), *D. virilis* (acesso M38438) e *D. subobscura* (acesso X72390). Os *primers* obtidos são os seguintes (utilizando como referência a seqüência de *D. melanogaster*): GYP1S (sense)

GAGTTTGCAGGTGGARGCRCC e GYP1AS (antisense) GCRAACARGCTTCTCTCWATGCTWGC que correspondem às regiões da ORF1 1313-1333 e 1869-1893, respectivamente, produzindo um fragmento de 580 nucleotídeos e GYP3S2 (sense) AAAGGCGAYTTGGTTGACTCC e GYP3AS2 (antisense) CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG que correspondem às regiões da ORF3 6026-6048 e 6491-6511, respectivamente, produzindo um fragmento de 485 nucleotídeos (Figura 5). Para todos os pares de iniciadores os componentes da reação foram: 15ng de DNA foram submetidos a uma reação final de 15μl contendo 1U Taq polimerase (GIBCO/BRL), 1,5μl de tampão 10X fornecido pelo fabricante, 50μM de cada nucleotídeo, 20pmol de cada iniciador e 1,5mM de MgCl₂. As condições de amplificação para todas as reações foram: 96°C por 2 min seguidos de 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1,5 min, seguidos por 72°C por 5 min para finalizar a reação.

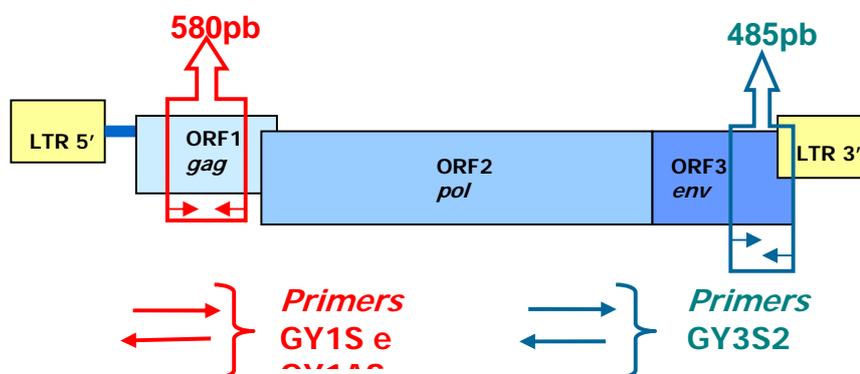


Figura 5 . Esquema das regiões de anelamento dos primers utilizados, baseado na seqüência do retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster*.

III.11. Sondas

As sondas do retroelemento *gypsy* foram produzidas a partir da amplificação dos pares de iniciadores GYP1S, GYP1AS e GYP3S2, GYP3AS2 a partir do plasmídeo pGGHS contendo o retroelemento *gypsy* completo, isolado do genoma de *D. melanogaster*, gentilmente cedida pelo Dr. Dale Dorsett (Dorsett *et al.* 1989). Para o elemento *P*, as sondas foram produzidas empregando os pares de iniciadores P1, P2 e P843, P1776 e amplificando fragmentos do elemento *P* a partir do plasmídeo p 25.1. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 0,9%, e o fragmento esperado para cada elemento foi isolado e retirado do gel utilizando-se um bisturi estéril e após foi purificado pela passagem através de coluna com GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification “Kit” da Amersham Pharmacia Biotech.

III.12. Southern blot

Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 0.9%, transferidos para uma membrana Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) e hibridados de acordo com o protocolo do “kit” Gene Images® da Amersham Pharmacia Biotech. As membranas foram hibridadas com uma sonda marcada (através do método de “random primer”) a 60 °C em uma solução contendo 0.1% SDS, 5% dextran sulfato e líquido bloqueador diluído 20 vezes em 5xSSC. A membrana foi lavada duas vezes a 60° C, primeiro com 1x SSC e 0.1% SDS e após com 0,5x SSC e 0,1% SDS, em ambos os casos agitando-se por 15 minutos. Para a detecção, foi utilizado o método do “kit” não radioativo CPD-Star (Amersham Pharmacia Biotech). O tamanho molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado usando os fragmentos do marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (GIBCO/BRL) como controle.

IV. RESULTADOS

IV.1. Coleta de parasitas e parasitóides

Os organismos identificados durante a realização deste trabalho estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Parasitas e parasitóides estudados e seus respectivos locais de coleta.

Local de Coleta	Organismo	Identificação
Jardim Botânico	Ácaro	<i>Macrocheles muscaedomesticae</i>
Jardim Botânico	Ácaro	Oribatidae
Laboratório	Ácaro	<i>Proctolaelaps sp.</i>
Laboratório	Ácaro	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
Laboratório	Ácaro	<i>Histiostoma a sp.</i>
Laboratório	Ácaro	<i>Rhyzoglyphus sp.</i>
Jardim Botânico	Microhimenóptero	Cynipoidea 1
Jardim Botânico	Microhimenóptero	Cynipoidea 2
Jardim Botânico	Microhimenóptero	Ichneumonoidea
Jardim Botânico	Microhimenóptero	Proctotrupoidea
Parque Farroupilha	Microhimenóptero	Cynipoidea 1
Parque Farroupilha	Microhimenóptero	Chalcidoidea
Parque Gabriel Knijnik	Microhimenóptero	Cynipoidea 1
Parque Gabriel Knijnik	Microhimenóptero	Ichneumonoidea
Parque Estadual de Itapuã	Microhimenóptero	Cynipoidea 2

Em relação aos ácaros já comumente existentes em nosso laboratório, identificados anteriormente pelo Dr. Reinaldo Feres, mais um ácaro foi identificado parasitando as culturas de *Drosophila* em nosso laboratório. Este ácaro pertence ao gênero *Rhyzoglyphus* (Figura 6). Quanto aos ácaros coletados no Jardim Botânico, além das espécies que sobrevivem em laboratório, como *Proctolaelaps*, *Tyrophagus* e *Histiostoma* (Figura 7), foram identificados ácaros pertencentes à superfamília Ceratozetoidea (oribatídeos) e ao gênero *Macrocheles* (Figura 8).

Com exceção dos oribatídeos, que são ácaros principalmente encontrados na matéria orgânica em decomposição no solo de matas (Flechtmann, 1960),

todos os outros ácaros, inclusive *Macrocheles muscaedomesticae*, já foram encontrados predando drosofilídeos (Ashburner *et al.*, 1986).

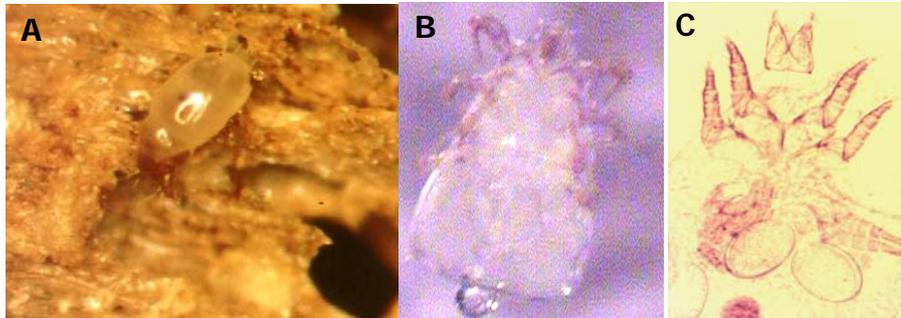


Figura 6. *Rhyzoglyphus sp* A) Sobre fruto em decomposição. B) e C) Vista ventral.

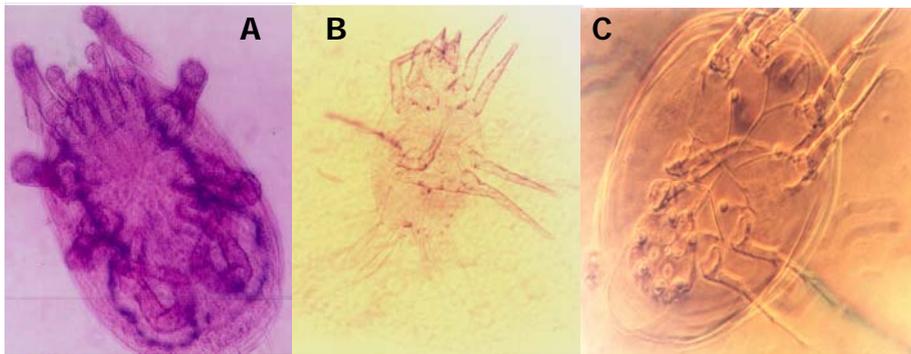


Figura 7. Ácaros comumente encontrados em nosso laboratório. A) *Proctolaelaps sp.* B) *Tyrophagus putrescentiae* C) Forma jovem (hipopus) de Histiostomidae.



Figura 8. Ácaros coletados no Jardim Botânico. A) Oribatídeo (Ceratozoidea) B) *Macrocheles muscaedomesticae* em vista ventral. C) Vista dorsal de *M. muscaedomesticae*.

Os microhimenópteros parasitóides identificados em nossas coletas pertencem a quatro superfamílias: Cynipoidea, Chalcidoidea, Proctotrupeoidea e

Ichneumonoidea. Entre os pertencentes à superfamília Cynipoidea, foram encontradas duas espécies diferentes, denominadas por 1 ou 2 na Tabela 1. Os microhimenópteros identificados estão representados na Figura 9.

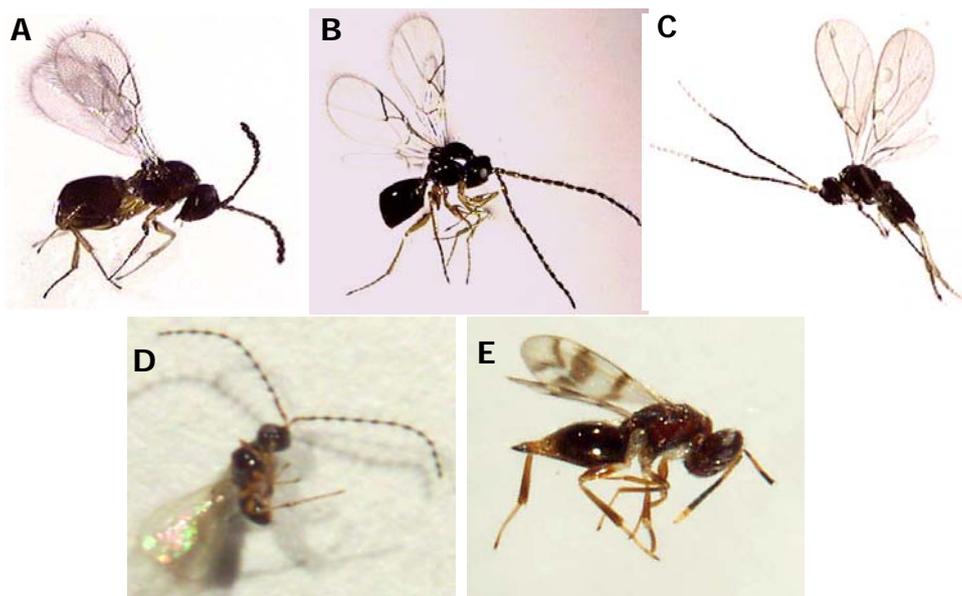


Figura 9. Microhimenópteros parasitóides. A) Cynipoidea 1; B) Cynipoidea 2; C) Ichneumonoidea; D) Proctotrupeoidea; E) Chalcidoidea.

IV.2. Controle da qualidade do DNA

O DNA genômico extraído de todos os organismos utilizados neste trabalho foi testado quanto à sua qualidade através da técnica de PCR, usando-se os *primers* de rRNA 18S sob diferentes condições de reação. Apenas aqueles DNAs das amostras onde foram obtidas as amplificações dos fragmentos de tamanho esperado foram utilizados para as reações de PCR seguintes (Figura 10).

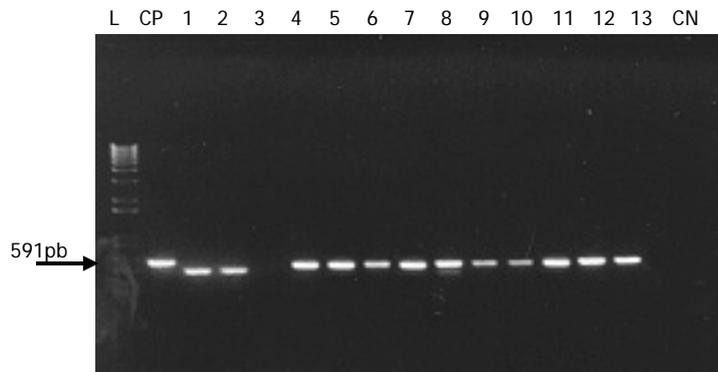


Figura 10. Amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 591 pb dos *primers* do gene de rRNA 18S dos organismos utilizados neste trabalho.

L) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder

CP) Controle Positivo – *Drosophila melanogaster*

1) *Macrocheles muscaedomesticae*

2) *Proctolaelaps sp.*

3) Histiostomidae

4) Cynipoidea 1 (Jardim Botânico)

5) Cynipoidea 2 (Jardim Botânico)

6) Proctotrupeoidea (Jardim Botânico)

7) Ichneumonoidea (Jardim Botânico)

8) Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha)

9) Chalcidoidea (Parque Farroupilha)

10) Chalcidoidea (Parque Farroupilha)

11) Cynipoidea 1 (Parque Gabriel Knijnik)

12) Ichneumonoidea (Parque Gabriel Knijnik)

13) Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã).

CN) Controle Negativo

IV.3. Elemento *P*

Os DNAs genômicos dos organismos utilizados neste trabalho foram submetidos à amplificação por PCR, primeiro utilizando o par de *primers* P1 e P2, que amplificam uma seqüência de 553 pb sobre a região do terceiro íntron do elemento *P*.

As reações foram testadas em diferentes condições e optou-se pelo uso de condições com maior estringência, visando uma maior segurança dos dados obtidos.

O produto de amplificação esperado, um fragmento de aproximadamente 553 pb, foi obtido para 9 de 11 entidades analisadas. Para confirmar se o produto da amplificação obtido corresponde a uma seqüência que possui homologia com a seqüência do elemento *P* de *Drosophila melanogaster*, foi realizado o *Southern blot* a partir dos produtos de PCR obtidos (Figura 11).

Como sonda para a hibridação foi utilizada a seqüência do elemento *P* purificado a partir do produto da amplificação destes *primers* tendo como modelo o plasmídeo P π 25.1.

Como mostra a Figura 11, os produtos de amplificação das amostras que mostraram sinal de hibridação variaram em relação à intensidade do sinal obtido. Para os DNAs dos ácaros, foram necessários tempos de exposição da autoradiografia mais prolongados para se obter o sinal dos fragmentos hibridados. Já para os DNAs dos microhimenópteros, com tempos curtos de exposição os sinais já eram visualizados, apesar de diferirem em intensidade entre estas entidades. Detectamos seqüências homólogas ao elemento *P* no genoma de dois ácaros (*Proctolaelaps sp.* e *Macrocheles muscaedomesticae*) e sete microhimenópteros investigados (Cynipoidea 1 (Jardim Botânico), Cynipoidea 2 (Jardim Botânico), Ichneumonoidea (Jardim Botânico), Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha), Chalcidoidea (Parque Farroupilha), Ichneumonoidea (Parque Gabriel Knijnik), Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã). No entanto, obtivemos diferentes padrões de hibridação quanto à intensidade do sinal obtido, geralmente fraco

quando comparados com o controle (*Drosophila melanogaster*). Ainda detectamos, além dos fragmentos esperados de 553 pb, a presença de fragmentos menores, provavelmente representando cópias deletadas internamente (elementos incompletos ou defectivos).

As amostras de números 7 e 9 não apresentaram sinal de hibridação mesmo quando submetidas a tempos prolongados de exposição da autoradiografia (Figura 11).

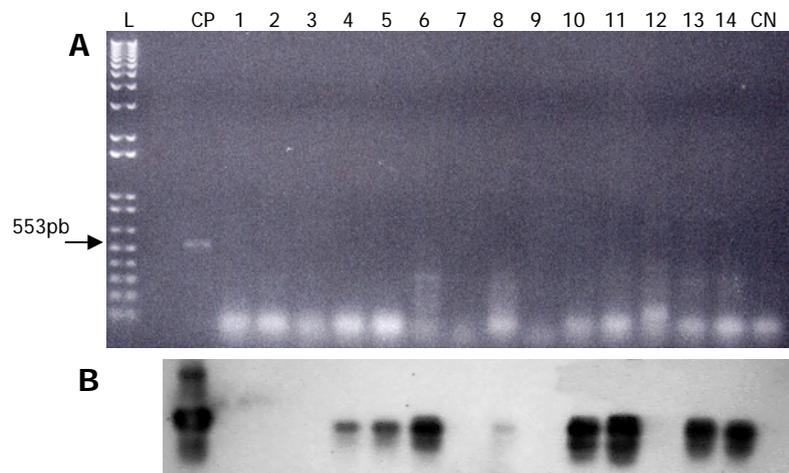


Figura 11. Reações de amplificação por PCR de seqüências de elemento *P* utilizando o par de *primers* P1 e P2. **A)** Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 0,9%: L) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder; CP) Controle Positivo – *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea 1 (Jardim Botânico); 5) Cynipoidea 2 (Jardim Botânico); 6) Ichneumonoidea (Jardim Botânico); 7) Proctotrupoidea (Jardim Botânico); 8) Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha); 9) Cynipoidea 1 (Parque Gabriel Knijnik); 10) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 11) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 12) Ichneumonoidea (Parque Gabriel Knijnik); 13) Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã); 14) Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã); CN) Controle Negativo. **B)** *Southern blot* dos produtos de amplificação mostrados em A, hibridados com a sonda do fragmento de 553 pb amplificado do plasmídeo P π 25.1 pelos *primers* P1 e P2.

Quando foi utilizado o par de *primers* que anelam em uma região entre o primeiro e o segundo exons do elemento *P*, resultando em um fragmento

amplificado de 960 pb, o padrão de hibridação obtido foi mais variado do que o obtido pelo primeiro par de *primers* (Figura 12).

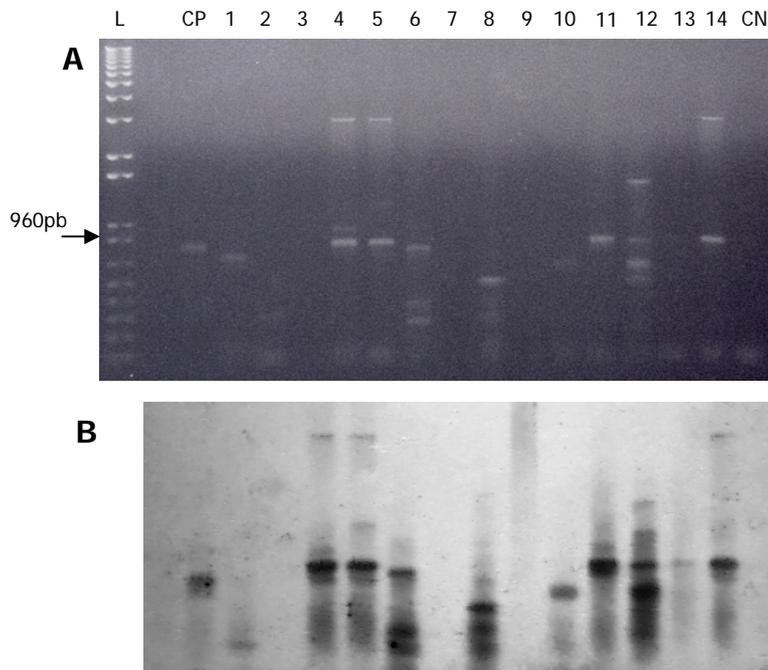


Figura 12. Reações de amplificação por PCR de seqüências de elemento *P* utilizando o par de *primers* P843 e P1776. **A)** Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 0,9%: L) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder; CP) Controle Positivo – *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea 1 (Jardim Botânico); 5) Cynipoidea 1 (Jardim Botânico); 6) Cynipoidea 2 (Jardim Botânico); 7) Proctotrupoidea (Jardim Botânico); 8) Ichneumonoidea (Jardim Botânico); 9) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 10) Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha); 11) Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha); 12) Cynipoidea 1 (Parque Gabriel Knijnik); 13) Ichneumonoidea (Parque Gabriel Knijnik); 14) Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã); CN) Controle Negativo. **B)** *Southern blot* dos produtos de amplificação mostrados em A, hibridados com a sonda do fragmento de 960 pb amplificado do plasmídeo P π 25.1 pelos *primers* P843 e P1776.

Além das bandas representativas dos fragmentos de tamanho esperado (960 pb), detectamos a presença de outros fragmentos representando seqüências que possuem homologia com o elemento *P* de *D. melanogaster*, mas que no entanto, são de tamanhos diferentes (maiores ou menores) do da banda esperada.

IV.4. Elemento *gypsy*

Como mostra a Figura 13, quando investigamos por PCR e *Southern blot*, a presença de seqüências homólogas ao retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster* no genoma de ácaros e de microhimenópteros, utilizando o par de *primers* GY1S e GY1AS, dois ácaros e seis microhimenópteros apresentaram o fragmento esperado de 580pb.

Além da banda de tamanho esperado, foram visualizados outros fragmentos de menor tamanho, provavelmente correspondentes a elementos deletados internamente. Novamente, foram necessários tempos de exposição da autoradiografia mais longos para obter-se o sinal de hibridação no genoma dos ácaros investigados.

As amostras de número 3, 7 e 9, correspondentes a Histiostomidae, Ichneumonoidea (Jardim Botânico) e Chalcidoidea (Parque Farroupilha) não apresentaram sinal de hibridação mesmo após tempos de exposição prolongados.

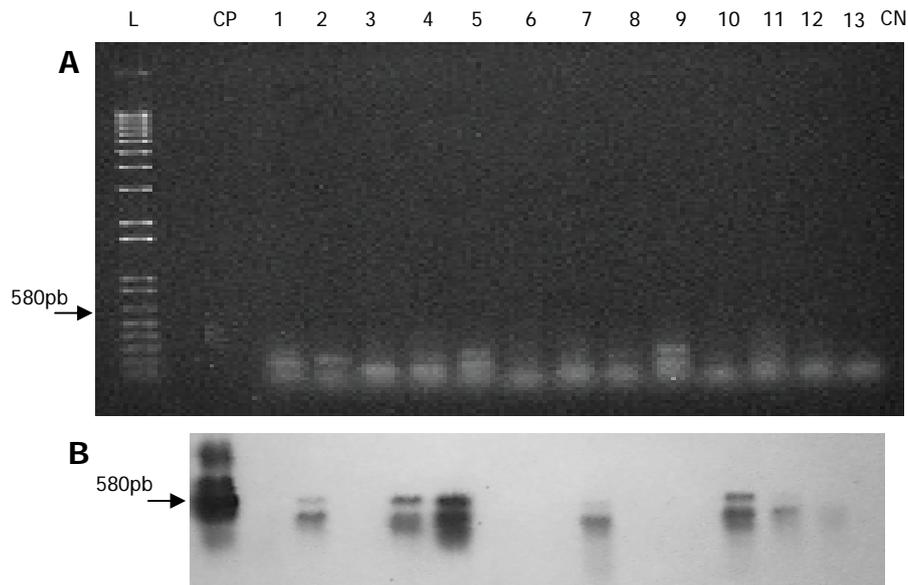


Figura 13. Reações de amplificação por PCR de seqüências de elemento *gypsy* utilizando o par de *primers* GY1S e GY1AS. **A)** Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 0,9%: L) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder; CP) Controle Positivo – *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea 1 (Jardim Botânico); 5) Cynipoidea 2 (Jardim Botânico); 6) Proctotrupoidea (Jardim Botânico); 7) Ichneumonoidea (Jardim Botânico); 8) Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha); 9) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 10) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 11) Cynipoidea 1 (Parque Gabriel Knijnik); 12) Ichneumonoidea (Parque Gabriel Knijnik); 13) Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã); CN) Controle Negativo. **B)** *Southern blot* dos produtos de amplificação mostrados em A, hibridados com a sonda do fragmento de 580 pb amplificado do plasmídeo pGGHS pelos *primers* GY1S e GY1AS.

Os resultados para o segundo par de *primers* utilizado, GY3S2 e GY3AS2, que amplificam um fragmento de 485 pb no genoma de *D. melanogaster*, estão representados na Figura 14.

Apenas as amostras 6 e 8, correspondentes a Proctotrupoidea (Jardim Botânico) e Chalcidoidea 1 (Parque Farroupilha) não apresentaram sinal de hibridação nem mesmo após tempos de exposição prolongados da autoradiografia.

As demais amostras apresentaram sinais com intensidades diferentes, mas

de tamanhos semelhantes ao esperado para seqüências homólogas ao retroelemento *gypsy* de *D. melanogaster*.

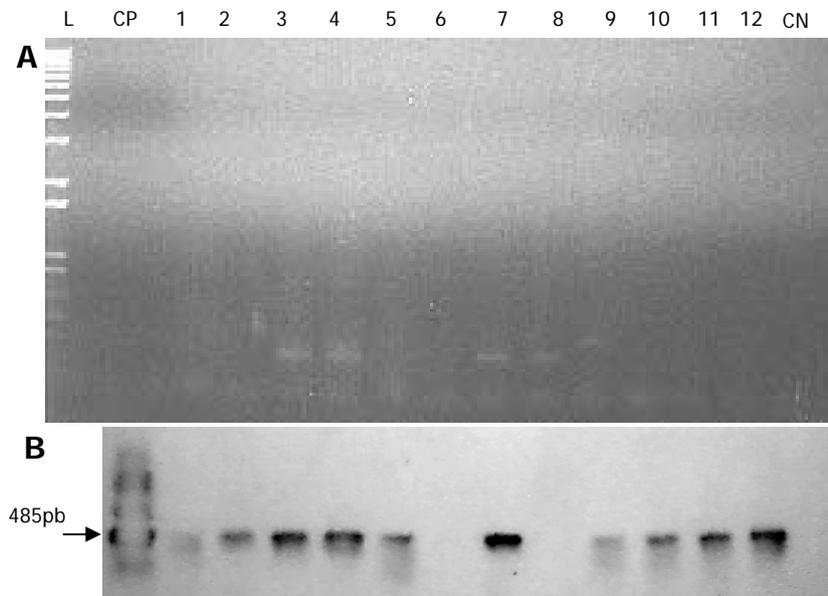


Figura 14. Reações de amplificação por PCR de seqüências de elemento *gypsy* utilizando o par de *primers* GY3S2 e GY3AS2. **A)** Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 0,9%: L) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder; CP) Controle Positivo – *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Cynipoidea 1 (Jardim Botânico); 4) Cynipoidea 2 (Jardim Botânico); 5) Ichneumonoidea (Jardim Botânico); 6) Proctotrupoidea (Jardim Botânico); 7) Cynipoidea 1 (Parque Farroupilha); 8) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 9) Chalcidoidea (Parque Farroupilha); 10) Cynipoidea 1 (Parque Gabriel Knijnik); 11) Ichneumonoidea (Parque Gabriel Knijnik); 12) Cynipoidea 2 (Parque de Itapuã); CN) Controle Negativo. **B)** *Southern blot* dos produtos de amplificação mostrados em A, hibridados com a sonda do fragmento de 485 pb amplificado do plasmídeo pGGHS pelos *primers* GY3S2 e GY3AS2.

A tabela 2 resume os resultados obtidos quanto a presença ou ausência de sinal de hibridação dos elementos *P* e *gypsy* no genoma dos ácaros e microhimenópteros testados neste trabalho.

Tabela 2. Sinal de hibridação (Presença: +, Ausência: -) de seqüências homólogas a elementos *P* e *gypsy* em relação aos diferentes *primers* utilizados.

Local de coleta	Organismo	P1/P2	P843/ P1776	GYP1S/ GYP1AS	GYP3S2/ GYP3AS2
Jardim Botânico	<i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	+	+	+	+
Laboratório	<i>Proctolaelaps sp.</i>	+	+	+	+
Jardim Botânico	Cynipoidea sp. 1	+	+	+	+
Jardim Botânico	Cynipoidea sp. 2	+	+	+	+
Jardim Botânico	Ichneumonoidea	+	+	-	+
Jardim Botânico	Proctotrupeoidea	-	-	+	-
Parque Farroupilha	Cynipoidea sp. 1	+	+	+	+
Parque Farroupilha	Chalcidoidea	+	-	-	-
Parque Gabriel Knijnik	Cynipoidea sp. 1	-	+	+	+
Parque Gabriel Knijnik	Ichneumonoidea	+	+	+	+
Parque de Itapuã	Cynipoidea sp. 2	+	+	+	+

V. DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A amplificação de seqüências homólogas ao elemento *P* de *Drosophila melanogaster* (considerando cada par de *primers* isoladamente ou em conjunto) em 10 dos 11 taxa testados, tem um significado bastante promissor.

Entre os ácaros testados, a presença de *P* foi detectada apenas em *Proctolaelaps sp.*, pertencente ao mesmo gênero de *Proctolaelaps regalis*, estudado por Houck *et al.* (1991), e não nas amostras de *Tyrophagus putrescentiae*, *Histiostoma sp.* e *Rhyzoglyphus sp.*, todos associados com Drosophilidae (Ashburner *et al.*, 1986). Em estudo piloto anteriormente realizado pelo nosso grupo (Carareto *et al.*, 1996), sinal de *P* foi também obtido em *Tyrophagus putrescentiae* e Histiostomidae, usando-se o par de *primers* P1 e P2. Em repetições destes experimentos posteriormente feitos por Élgion Loreto na UFSM, foi confirmada a amplificação de seqüências homólogas a *P* (também utilizando os *primers* P1 e P2) tanto em *T. putrescentiae* como em Histiostomidae. O sinal negativo de hibridação obtido nos mesmos organismos em nossos experimentos, pode estar indicando a ausência efetiva de seqüências homólogas a *P* de *D. melanogaster* no genoma destes ácaros. Entretanto, a baixa quantidade de DNA isolado destes organismos em nossos experimentos, pode ter mascarado a possível presença de seqüências homólogas ao elemento *P* nestes genomas. A dificuldade em se isolar estes organismos do substrato, certamente foi uma das causas do baixo rendimento na extração de DNA, visto que estes ácaros são extremamente pequenos. Assim, propomos para um estudo futuro, um esforço concentrado na obtenção de amostras maiores de *T. putrescentiae* e Histiostomidae para resolver esta questão. Também será importante intensificar o estudo de diversos aspectos da sua biologia, de forma a maximizar as condições de cultivo destes organismos em laboratório. Não pode ser descartada, entretanto a possibilidade da ocorrência de perda estocástica, bastante defendida por Engels (1986).

Se considerarmos, entretanto, a hipótese de que transferência horizontal deva ser um fenômeno acidental, a existência de populações de ácaros com *P* e livres de *P* nos seus genomas deva ocorrer também na natureza. Estudos posteriores, utilizando amostras maiores de ácaros e um número maior de seqüências são necessários, portanto, antes de se concluir definitivamente sobre a causa da presença/ausência de *P* no genoma de *Tyrophagus putrescentiae* e Histiostomidae.

A presença de seqüências com homologia a *P* no genoma de *Macrocheles muscaedomesticae*, vindo da natureza é o primeiro registro deste tipo de associação. *M. muscaedomesticae* já havia sido encontrado predando drosofilídeos no campo (Máca 1972, 1982) onde encontra-se amplamente distribuído, tendo inclusive, sua distribuição associada com a das moscas domésticas. Além de atacar principalmente ovos e larvas de primeiro ínstar, adultos deste ácaro possuem uma associação forética com as moscas (usam-nas para locomover-se de um local a outro) (Chant 1960; Axtell 1964) e segundo nossas próprias observações, também com os microhimenópteros parasitóides.

Seqüências *P* foram descobertas em espécies que não pertencem ao gênero *Drosophila*, como *Musca domestica* (Lee *et al.*, 1999), sugerindo que este TE seja mais amplamente distribuído do que inicialmente se supunha. O fato deste ácaro preda igualmente moscas domésticas e *Drosophila* é instigante, e abre caminho para se realizar posteriormente o isolamento e seqüenciamento dos produtos de amplificação encontrados, comparando-os com as seqüências de elemento *P* de *Musca domestica*, *Drosophila* e ácaros associados.

Já entre os microhimenópteros, apenas os pertencentes à Superfamília Proctotrupoidea não parecem portar seqüências homólogas a *P* nos seus genomas. Os outros oito taxa analisados parecem possuir este tipo de seqüência, como evidenciado pelo uso conjunto, ou de pelo menos um dos *primers* analisados.

Estes achados são igualmente pioneiros e não dispõe-se de estudos similares na literatura para comparação. O único trabalho com elementos transponíveis no genoma de microhimenópteros foi o realizado por McAllister e

Werren (1997) que analisaram o padrão filogenético do retroelemento NATE (NAsonia Transposable Element) no genoma de vespas parasitóides da família Pteromalidae.

Desta forma, devido à consistência dos nossos dados, sugerimos a existência de seqüências homólogas a *P* amplamente espalhadas no genoma de microhimenópteros. Portanto, o isolamento e análise destas seqüências permitirão avaliar o seu grau de homologia entre os próprios microhimenópteros e o genoma de diferentes espécies de *Drosophila*.

O nosso trabalho foi igualmente pioneiro na detecção de seqüências homólogas ao retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster* no genoma de ambos os ácaros, *Macrocheles muscaedomesticae* e *Proctolaelaps sp.*, utilizando-se ambos os pares de *primers*.

O fato de não termos obtido sinal de hibridação de *gypsy* nos ácaros *Tyrophagus putrescentiae* e Histiostomidae por outro lado, pode ser devido ou à sua efetiva ausência nestes genomas, a perda estocástica ou, como ocorreu com o elemento *P*, à pouca quantidade de DNA obtido para a realização dos experimentos. Ficou em aberto, portanto, uma proposta mais consistente para explicar os atuais achados.

A presença de *gypsy* nos genomas de oito dos nove microhimenópteros analisados, reforça a idéia da ampla distribuição deste retroelemento entre os invertebrados (revisões em Stacey *et al.*, 1986; ; Alberola *et al.* 1997; Loreto *et al.* 1998). No caso deste retroelemento, é importante salientar o fato de que ele exibe uma estrutura genômica similar à forma pró-viral de retrovírus de vertebrados e como tal, possui propriedades infectivas sob certas condições ambientais (Kim *et al.*, 1994; Bucheton, 1995; Péllisson *et al.*, 1997; Lerat & Capy 1999). Desta forma, *gypsy* pode, portanto, se inserir nos genomas hospedeiros, pelo menos teoricamente, sem a necessidade de um vetor. Isto talvez explique a magnitude da distribuição deste retroelemento entre os invertebrados.

Dada a íntima relação entre microhimenópteros parasitóides (que se desenvolvem às custas dos tecidos e dentro da pupa de *Drosophila*) e seus hospedeiros, a probabilidade de ocorrer a aquisição de *gypsy* é bastante alta.

Assumindo que os requerimentos mínimos necessários para ocorrer um evento de transferência horizontal devam ser a sobreposição geográfica, temporal e ecológica entre a espécie doadora e a receptora de uma seqüência móvel, as condições de obtenção dos nossos dados cumprem integralmente estes pressupostos. Na verdade, ao se coletar e lidar com o material coletado (moscas, frutos, larvas, ácaros, microhimenópteros) já se percebe claramente a intrínseca relação entre os membros integrantes destas guildas de invertebrados. Mesmo que estas associações não tenham sido tão intensas em outras épocas e locais, nada impede que estes pré-requisitos possam ter sido cumpridos em condições ambientais diferentes das encontradas atualmente.

No caso do elemento *P*, a proximidade física entre o doador e o receptor é igualmente um pré-requisito para tornar possível a transferência. Neste caso, entretanto, um vetor será necessário, daí a necessidade de se identificar possíveis vetores para transporte de seqüências de DNA entre espécies isoladas reprodutivamente. Entre os possíveis vetores, alguns autores (Duesberg, 1983; Ikawa, 1974; Syvanem, 1987) têm proposto os vírus, micoplasmas, bactérias, protozoários, fungos e pequenos artrópodos (como no nosso caso, os microhimenópteros). Não há evidências seguras, entretanto, de que isto seja verdadeiro.

Junto com as evidências de Houck *et al.*, (1991) nossos próprios achados contribuem pois, para o estabelecimento de um corpo mais robusto de dados que apontam para os ácaros parasitas e os microhimenópteros parasitóides como fortes candidatos para agentes da transferência horizontal em drosofilídeos.

VI. RESUMO

Na tentativa de identificar possíveis vetores para transferência horizontal (fenômeno que vem sendo cada vez mais bem documentado) de elementos transponíveis entre espécies reprodutivamente isoladas de Drosophilidae, foi investigada a presença dos elementos transponíveis *P* e *gypsy* no genoma de quatro ácaros (parasitas ou potencialmente parasitas) e nove microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*, através das técnicas de PCR e *Southern blot*. Estes organismos são parte integrante das guildas de invertebrados, cuja riqueza na Região Neotropical é particularmente expressiva.

Em dois dos ácaros analisados (*Proctolaelaps* sp. e *Macrocheles muscaedomesticae*), reconhecidamente predadores de ovos de *Drosophila*, foram identificadas sequências com homologia a ambos os transposons, cuja forma de mobilização é diferente: *gypsy* é um retroelemento, com características de infectividade similares à dos retrovírus e *P* é um transposon de DNA, que usa uma transposase para mediar sua movimentação dentro e entre genomas. Embora seja ainda necessário isolar e clonar estas seqüências, de forma a permitir a sua comparação com os elementos *P* e *gypsy* de *Drosophila*, sugere-se a potencialidade destes ácaros como vetores de transferência horizontal. Dos genomas de oito entre os nove microhimenópteros (vespas) parasitóides de pupas de *Drosophila* estudados, foram amplificadas seqüências homólogas tanto com *P*, quanto com *gypsy*. Dada a compatibilidade ecológica e a íntima relação estabelecida entre essas vespas e *Drosophila*, a potencialidade desses organismos como vetores de transferência lateral entre taxa reprodutivamente isolados também é proposta.

VII. ABSTRACT

In order to identify putative vectors for horizontal transfer of transposable elements (phenomenon that have been well documented in the last years) between species reproductively isolated of Drosophilidae, we investigated the presence of sequences homologous to *P* and *gypsy* of *Drosophila*, in the genomes of four mites (parasitic or potentially parasitic) and nine microhimenopteran wasps parasitoids of *Drosophila*, using the PCR and *Southern blot* techniques.

In two of the acari analyzed (*Proctolaelaps sp.* and *Macrocheles muscaedomesticae*), recognized predators of eggs of *Drosophila*, we identified sequences with homology with both *P* and *gypsy*, which are different in relation to their mode of mobilization: *gypsy* is a retroelement, with the characteristic of infectivity shared with the retroviruses, and *P* is a DNA transposon, which uses a transposase for mediate its mobilization inside or between genomes. Although it is still needed to isolate and cloning these sequences, allowing their comparison with the *P* and *gypsy* elements of *Drosophila*, it is suggested their potentiality as vectors for horizontal transfer. From the genomes of eight of nine microhimenopteran wasps, parasitoid of the *Drosophila* pupae studied, sequences homologous to both *P* and *gypsy* were also amplified. Considering the ecological compatibility and the close relationship established between wasps and *Drosophila*, the potentiality of these organisms to act as vectors for horizontal transfer between taxa reproductively isolated is also proposed.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBEROLA, T. M. & DE FRUTOS, R. *Gypsy* homologous sequences in *Drosophila subobscura* (*gypsyDs*). *Journal of Molecular Evolution*, v. 36: 127-135, 1993.
- ALBEROLA, T. M. & DE FRUTOS, R. Molecular structure of a *gypsy* element of *Drosophila subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Research*, v. 24: 914-923, 1996.
- ALBEROLA, T. M.; BORI, L. & DE FRUTOS, R. Structural analysis of *Drosophila subobscura gypsy* elements (*gypsyDs*). *Genetica*, v. 100: 39-48, 1997.
- ALMEIDA, G. S. S. & SAMPAIO, A. Isolamento reprodutivo em três complexos de microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*. *Revista Brasileira de Genética*, v. 16(3) (supl.): 319, 1993.
- ANXOLABÉHÈRE, D.; KIDWELL, M. G. & PERIQUET, G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with the hypothesis of a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements. *Molecular Biology and Evolution*, v. 5: 252-269, 1988.
- ARKHIPOVA, I. R. & ILVIN, Y. V. Control of transcription of *Drosophila* retrotransposons. *BioEssays*, v. 14: 161-168, 1992.
- AXTELL, R. C. Phoretic relationship of some common manure-inhabiting Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) to the house fly. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 57: 584-587, 1964.
- BAYEV Jr., A. A.; LYUBOMIRSKAYA, N. V.; DZHUMAGALIEV, E. B.; ANANIEV, E. V.; AMIANTOVA, I. G. & ILYIN, Y. V. Structural organization of transposable element *mdg4* from *Drosophila melanogaster* & a nucleotide sequence of its long terminal repeats. *Nucleic Acids Research*. v. 12: 3707-3723, 1984.
- BIÉMONT, C. & CIZERON, G. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. *Genetica*, v. 105: 43-62, 1999.

- BROOKFIELD, J. F. Y.; MONTGOMERY, E. & LANGLEY, C. Apparent absence of transposable elements related to *P* elements in *Drosophila melanogaster* and other species of *Drosophila*. *Nature*, v. 310: 331-332, 1984.
- BUCHETON, A. The relationship between the *flamenco* gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *Trends in Genetics*, v. 11: 349-353, 1995.
- CAPY, P.; ANXOLABÉHÈRE, D. & LANGIN, T. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends in Genetics*, v.10(1): 7-12, 1994.
- CAPY, P.; BAZIN, C.; HIGUET, D. & LANGIN, T. Dynamics and evolution of transposable elements. Landes Bioscience, Austin, Texas, 1998.
- CAPY, P.; VITALIS, R.; LANGIN, T.; HIGUET, D. & BAZIN, C. Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor? *Journal of Molecular Evolution*, v. 42: 359-368, 1996.
- CARARETO, C. M. A.; LORETO, E. L. S.; FERES, R. F. & VALENTE, V. L. S. Evidences of *P* elements in genomic DNA of mites coming from natural populations. *Revista Brasileira de Genética*, v. 19(3) (supl.): 342, 1996.
- CARTON, Y.; BOULÉTREAU, M.; VAN ALPHEN, J. M. M. & VAN LENTEREN, J. C. The *Drosophila* Parasitic Wasps. In: *The Genetics & Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds). Academic Press, New York, v. 3e: 347-394, 1986.
- CHANT, D. A. An unusual instance of phoresy in Acarina. *Entomological News*, v. 71:270-271, 1960.
- CLARK, J. B. & KIDWELL, M. G. A phylogenetic perspective on *P* transposable element evolution in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 94: 11428-11433, 1997.

- CLARK, J. B.; MADDISON, W. P. & KIDWELL, M. G. Phylogenetic analysis supports horizontal transfer of *P* transposable elements. *Molecular Biology and Evolution*, v. 11: 40-50, 1994.
- CLARK, J. B.; SILVA, J. C. & KIDWELL, M. G. Evidence for horizontal transfer of *P* transposable elements. In: Syvanen, M. & Kado, C. I. Academic Press, p. 161-171, 2002.
- CUMMINGS, M. P. Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *TREE*, v. 9: 141-145, 1994.
- DANIELS, S. B.; PETERSON, K. R.; STRAUSBAUGH, L. D.; KIDWELL, M. G. & CHOVNICK, A. Evidence for horizontal transmission of the *P* element between *Drosophila* species. *Genetics*, v. 124: 339-355, 1990.
- DORSETT, D.; VIGLIANTI, G. A.; RUTLEDGE, B. J. & MESELSON, M. Alteration of *hsp82* gene expression by the *gypsy* transposon and supressor genes in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*, v. 3: 454-468, 1989.
- DUESBERG, P. H. Retroviral transforming genes in normal cells. *Nature*, v. 304: 219-226, 1983.
- ENGELS, W. R. The origin of *P* elements in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays*, v. 14: 681-686, 1992.
- FLECHTMANN, C. H. W. Elementos de acarologia. Livraria Nobel, 344p., 1960.
- FREIRE-MAIA, N. & PAVAN C. Introdução ao estudo de *Drosophila*. *Cultus*, v.5: 1-70, 1949.
- GEORGIEV, G. P.; ILYN, Y. V.; CHMELIAUSKAITE, V. G.; RYSKOV, A. P.; KRAMEROV, D. A.; SKRYABIN, K. G.; KRAYEV, A. S.; LUKANIDIN, E. M. & GRIGORYAN, M. S. Mobile dispersed genetic elements and other middle repetitive DNA sequences in the genomes of *Drosophila* and mouse: transcription and biological significance. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45: 641-654, 1981.

- HAGEMANN, S.; HARING, E. & PINSKER, W. Repeated horizontal transfer of *P* transposons between *Scaptomyza pallida* and *Drosophila bifasciata*. *Genetica*, v. 98: 43-51, 1996.
- HAGEMANN, S. & PINSKER, W. *Drosophila P* transposons in the human genome? *Molecular Biology and Evolution*, v. 18(10): 1979-1982, 2001.
- HAWKINS, C. P. & MACMAHON, J. A. Guilds: the multiple meanings of a concept. *Annual Review of Entomology*, v. 34: 423-451, 1989.
- HERÉDIA, F. Evolução do Retroelemento *gypsy* em espécies de *Drosophila* e *Zaprionus indianus*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 188p., 2002.
- HOUCK, M. A.; CLARK, J. B.; PETERSON, K. R. & KIDWELL, M. G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, v. 253: 1125-1128, 1991.
- IKAWA, Y.; ROSS, J. & LEDER, P. An association between globin messenger RNA and 60S RNA derived from Friend leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América*, v.71: 1154-1158, 1974.
- JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H. & BAKER, E. W. *Mites injurious to economic plants*. University California Press, Berkeley, 641p., 1975.
- JORDAN, I. K.; MATYUNINA, L. V. & McDONALD, J. F. Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América*, v. 96(22): 12621-12625, 1999.
- JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D.B. (Ed.) *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986.
- KIDWELL, M. G. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América*, v. 80: 1655-1659, 1983.

- KIDWELL, M. G. Horizontal transfer of *P* elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica*, v. 86: 275-286, 1992.
- KIDWELL, M. G. Lateral transfer in natural populations of eucaryotes. *Annual Review of Genetics*, v. 27: 235-256, 1993.
- KIDWELL, M. G. Invitational Lecture. The evolutionary history of the *P* family of transposable elements. *The Journal of Heredity*, v. 85: 339-346, 1994.
- KIDWELL, M. G.; KIDWELL, J. F. & SVED, J. A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation sterility and male recombination. *Genetics*, v. 36: 813-833, 1977.
- KIDWELL, M. G & LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 15: 95-99, 2000.
- KIM, A.; TERZIAN, C.; SANTAMARIA, P.; PÉLISSON, A.; PRUD'HOMME, N. & BUCHETON, A. Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América*, v. 91: 1285-1289, 1994.
- KRANTZ, G. W. A manual of Acarology. Oregon Estate University Book Stores, EE.UU., 335p., 1970.
- LANDER, E. S. Initial sequencing and analysis of de human genome. *Nature*, v. 409: 861-922, 2001.
- LEE, S. H.; CLARK, J. B. & KIDWELL, M. G. A *P* element-homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. *Insect Molecular Biology*, v. 8(4): 491-500, 1999.
- LERAT, E. & CAPY, P. Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16: 1198-1207, 1999.
- LOHE, A. R.; MORIYAMA, E. N.; LIDHOLM, D. & HARTL, D. L. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of *mariner*-like

- transposable elements. *Molecular Biology and Evolution*, v. 12: 62-72, 1995.
- LORETO, E. L.; Da SILVA, L. B., ZAHA, A. & VALENTE, V. L. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. *Genetica*, v. 101: 153-165, 1998.
- LORETO, E. L.; VALENTE, V. L.; ZAHA, A.; SILVA, J. C. & KIDWELL, M.G. *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. *The Journal of Heredity*, v. 92(5): 375-381, 2001.
- LOXDALE, H.D. & LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, v. 88: 577-600, 1998.
- MÁCA, J. Czechoslovak species of genus *Scaptomyza* Hardy (Diptera, Drosophilidae) and their bionomies. *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, v. 69: 119-132, 1972.
- MÁCA, J. Parasitizing and transported macroorganisms dependent on Drosophilidae (Diptera) in Czechoslovakia. *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Purkynianae Brunensis (Biologia 74)*, v. XXIII: 69-74, 1982.
- MACALLISTER, B. F. Isolation and characterization of a retroelement from a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, v. 4: 253-262, 1995.
- MACALLISTER, B. F. & WERREN, J. H. Phylogenetic analysis of a retrotransposon with implications for strong evolutionary constraints on reverse transcriptase. *Molecular Biology and Evolution*, v. 14(1): 69-80, 1997.
- MACCLURE, M. A. Evolution of retroposons by acquisition or deletion of retrovirus-like genes. *Molecular Biology and Evolution*, v. 8: 835-856, 1991.
- MACCLURE, M. A. Evolutionary history of reverse transcriptase. In: *Reverse Transcriptase*. (ed.) AM Skalka, SP Goff, p. 425-443. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1993.

- MARÍN, I. & LHORÉNS, C. *Ty31 Gypsy* retrotransposons: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. *Molecular Biology and Evolution*, v. 17: 1040-1049, 2000.
- MARQUES, E. K.; NAPP M.; H. WINGE & A. R. CORDEIRO. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosophila Information Service*, v. 41: 187,1966.
- MATSUURA, E.T.; TAKADA, S.; KATO, H.; NIIZEKI, S. & CHIGUSA S.I. Hybrid dysgenesis in natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. *Genetica*, v. 90: 9-16, 1993.
- MENDONÇA, M. Life history evolution of *Drosophila melanogaster* under the selective pressure of a pupal parasitoid. Tese de Doutorado, Imperial College of Science, Technology and Medicine, 138p., 2000.
- MILLER, K.; LYNCH, C.; MARTIN, J.; HERNIOU, E. & TRISTEM, M. Identification of multiple *gypsy* LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Evolution*, v. 49: 358-366, 1999.
- MILLER, W. J.; HAGEMANN, S.; REITER, E. & PINSKER, W. *P* homologous sequences are tandemly repeated in the genome of *Drosophila guanche*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States*, v. 89: 4018-4022, 1992.
- MILLER, W. J.; McDONALD, J. F.; NOUAUD, D. & ANXOLABÉHÈRE, D. Molecular domestication – more than a sporadic episode in evolution? *Genetica*, v. 107: 197-207, 1999.
- NOUAD, D. & ANXOLABÉHÈRE, D. *P* element domestication: a stationary truncated *P* element may encode a 66 kDa repressor-like protein in the *Drosophila montium* species subgroup. *Molecular Biology and Evolution*, v. 14: 1132-1144, 1997.

- O'HARE, K. & RUBIN, G. M. Structure of *P* transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, v. 34: 25-35, 1983.
- PAVAN, C. & STUNKEL, T. P. Microhimenoptera parasito de *Drosophila*. *Ciência e cultura (supl.)* 34(7): 717, 1982.
- PEIXOTO, A. A. Polimorfismos de inversões cromossômicas de *Drosophila mediopunctata* na população do Parque Nacional de Itatiaia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 113p., 1989.
- PÉLISSON, A.; SONG, S. U.; PRUD'HOMME, N.; SMITH, P. A.; BUCHETON, A. & CORCES, V. G. *Gypsy* transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila flamenco* gene. *EMBO Journal*, v. 13: 4401-4411, 1994.
- PÉLISSON, A.; TEYSSET, L.; CHALVET, F.; KIM, A.; PRUD'HOMME, N.; TERZIAN, C. & BUCHETON, A. About the origin of retroviruses and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus with the *Drosophila flamenco* host gene. *Genetica*, v. 100: 29-37, 1997.
- PERKINS, H.D. & HOWELLS, A.J. Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States*, v. 89: 10753-10757, 1992.
- PINSKER, W.; HARING, E.; HAGEMANN, S. & MILLER, J. The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. *Chromosoma*, v. 110: 148-158
- RIO, D. C. & RUBIN, G. M. Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable element. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 85: 8929-8933, 1988.

- ROBERTSON, H. M. & MacLEOD, E. G. Five major subfamilies of *mariner* transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly and related arthropods. *Insect Molecular Biology*, v. 2: 125-139, 1993.
- ROOT, R. B. The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. *Ecol. Monogr.*, v. 37: 317-350, 1967.
- SASSI, A. Contribuição ao estudo dos elementos transponíveis em populações de *Drosophila willistoni*. Dissertação de Bacharelado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 30p., 2000.
- SILVA, J. C. & KIDWELL, M. G. Selection and horizontal transfer in the evolution of P elements. *Molecular Biology and Evolution*, v. 17: 1542-1557, 2000.
- SMITH, M. W.; FENG, D. F. & DOOLITTLE, R. F. Evolution by acquisition: the case for horizontal transfers. *Trends Biochem. Sci.*, v. 17: 489-93, 1992.
- SPASSKY, B. S.; RICHMOND, R. C. & PERÉZ-SALAS, S. Geography of sibling species related to *D. willistoni* and semi-species of the *D. paulistorum* complex. *Evolution*, v. 25: 129-143, 1971.
- SPRADLING, A. C. & RUBIN, G. M. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, v. 218: 341-347, 1982.
- STACEY, S. N.; LANSMAN, R. A.; BROCK, H. W. & GRIGLIATTI, T. A. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, v. 3: 522-534, 1986.
- SYVANEN, M. Molecular clocks and evolutionary relationships: possible distortions due to horizontal gene flow. *Journal of Molecular Evolution*, v. 26: 16-23, 1987.
- SYVANEN, M. & KADO, C. I. Horizontal Gene Transfer. Academic Press, 445p., 2002.

- TERZIAN, C.; FERRAZ, C.; DEMAILLE, J. & BUCHETON, A. Evolution of the *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Molecular Biology and Evolution*, v. 17: 908-914, 2000.
- VÁZQUEZ-MANRIQUE, R. P.; HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, M. J. & DE FRUTOS, R. Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. *Molecular Biology and Evolution*, v. 17: 1185-1193, 2000.
- VILELA, C. R. & SELIVON, D. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). II. Fallen fruits of *Citharexylum myrianthum* Cham. (Verbenaceae). *Drosophila Information Service*, v. 83: 32-36, 2000.
- WAAGE, J. K. & HASSEL, M. P. Parasitoids as biological control agents – a fundamental approach. *Parasitology*, v. 84: 241-268, 1982.
- ZIM, M. N. S. & PAVAN, C. Biologia de *Pseudeucoila brasiliensis* (Hymenoptera: Cynipidae), microhimenóptero parasito de *Drosophila melanogaster*. *Ciência e Cultura* (supl.), v. 34 (7): 766, 1982.