

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A OPORTUNIDADE DE OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO
HORIZONTAL DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS ENTRE DROSÓFILAS, ÁCAROS E
MICROHIMENÓPTEROS**

ADRIANA KOSLOVSKI SASSI

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

ORIENTADORA: VERA LÚCIA DA SILVA VALENTE GAIESKY

Porto Alegre
Janeiro de 2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com recursos do CNPq e FAPERGS.

As coletas realizadas no Jardim Botânico de Porto Alegre foram autorizadas pela instituição responsável, a Fundação Zoobotânica.

Dedico esta Tese aos meus pais e ao meu marido

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Verinha, com quem foi uma honra conviver e aprender nestes últimos nove anos no laboratório. Obrigada por sempre confiar em mim, apoiar e nunca me deixar desistir nem nos momentos de maior sufoco (e não foram poucos!!!), e principalmente ter paciência nestes últimos meses. Tu és um exemplo de pessoa e profissional pra todos nós.

Ao professor Elgion, pelas sugestões e apoio em alguns momentos desta tese e toda jornada nesses anos.

Ao Dr. Milton Mendonça pela disposição, sempre, e pelas chaves de identificação dos microhimenópteros.

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

Ao meu grande amigo Mario por todas as conversas e paixão pelas *avispas*, e por toda torcida e incentivo durante estes anos (ah, e pelas Quilmes...).

Para todo pessoal do Laboratório de *Drosophila*, amigos inesquecíveis e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Adri, Carol, Juliana, Ju, Liz, Maríndia, Marco, Monica, Ronaldo, Rô, Hermes, Sabrina e Jonas.

Em especial à Ju, Liz, Maríndia e Adri (pelos artigos!) obrigada pelas muitas dicas, incentivo, amizade e companheirismo

Ao Hermes, que se "distraiu" ajudando a corrigir alguns textos na cama do hospital...

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunogenética: Pri, Lari, Pedro, Tiago, Lu, Paula...pela ajuda nas fotos, amizade, momentos de descontração e tudo mais (incluindo ouvir minhas angústias).

À minha "vizinha de laboratório", comadre e agora colega de trabalho, Mel, por toda amizade e confiança há anos e toda força e paciência nestes últimos meses. Essa é mais uma parceria para a vida toda.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal: Adri, Ane, Samanta, Sílvia, Ricardo; pela ajuda com as fotos, equipamentos, etc; pela parceria de tantos anos que resultou em uma amizade para sempre.

Ao Elmo e à Ellen, por todo apoio e suporte técnico, sempre dispostos a ajudar, obrigado pela força e incentivo nestes anos de genética.

À Norminha, obrigada por ser tão amiga e um exemplo de colega, sempre me incentivando e se disponibilizando (mesmo à distância). Obrigada também pelo material de coletas.

Ao Fabiano, meu parceiro de tantos momentos nesses anos, companheiro de mates, novelas, "indiadas". Obrigada, ainda, por esses últimos dias ouvindo minhas angústias, me dando força depois de eu chegar exausta do trabalho e ajudar nos detalhes finais.

À Mari, minha irmã gêmea morena, em resumo: por ser tão especial na minha vida, parceira pro que der e vier.

Ao Ronaldo, uma pessoa incrível que conheci durante o doutorado e de quem levo à amizade pro resto da vida.

À Josi, Kika e a pequena Leti, que não ainda não entende porquê tantas ausências...mas sempre dão a maior força para que eu siga em frente.

À minha segunda família que está aqui em Poa: Jane, Heraldo, Vica, Ricardo, Mi, Márcio, e agora, a mais nova integrante e luz das nossas vidas Isadora. Obrigada por toda amizade, amor, "colo" e por ter passado alguns dos momentos mais felizes da minha vida ao lado de vocês!

À minha família argentina, que sempre me apoiou e me deu muito amor pra enfrentar tudo que surgisse. *Gracias por existirem en mi vida.*

Minha pequena grande família Osmar, Nair e Tiago, meu porto seguro. Pela compreensão da minha ausência e pelo incentivo todos os dias da minha vida. Estou apenas colhendo os frutos de toda força e confiança depositadas em mim nesses anos todos, e é a quem dedico esta tese. Amo vocês!

Ao Andrés, meu "co-orientador" e colaborador nesta tese e na vida. Nossa jornada juntos iniciou com o doutorado e agora é uma parceria para a vida inteira. Obrigada por ter, desde "catado coquinho" comigo no Jardim Botânico e pelas ruas de Porto Alegre, participado em todos os momentos de discussão, bancada, reclamações, alegrias, enfim: tudo!!!. Também dedico tudo o que alcancei a você, meu amor.

SUMÁRIO

Abreviaturas, símbolos e unidades	6
Resumo	8
Abstract	10
Capítulo I	12
Introdução	
1. Elementos transponíveis	12
1.1 Classificação dos Elementos Transponíveis	14
1.2 Implicações Evolutivas e Regulação de TEs	16
1.3 Origem e evolução dos TEs	18
1.4 Transferência Horizontal e TEs	20
1.5 Elemento transponível <i>P</i>	23
1.6 Retroelemento <i>gypsy</i>	25
2. Ácaros parasitas de <i>Drosophila</i>	27
3. Parasitóides de <i>Drosophila</i>	30
Objetivos	36
Capítulo II	37
<i>P</i> and <i>gypsy</i> transposable elements in parasitic mites and parasitoid wasps of <i>Drosophila</i>	37
Capítulo III	67
Seqüências com homologia aos elementos <i>P</i> e <i>gypsy</i> em vespas parasitóides de <i>Drosophila</i>	67
Capítulo IV	107
Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas	107
Referências Bibliográficas	116
Anexos	129

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

TEs – Transposable elements - Elementos transponíveis

TH – Transferência horizontal

MLEs – *Mariner*-like elements

LTR – Long Terminal Repeat (Repetição Terminal Longa)

ITR – Inverse Terminal Repeat (Repetição Terminal Invertida)

COII - mitochondrial cytochrome oxidase subunit II (*COII*) gene

Adh - alcohol dehydrogenase gene

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pb - pares de bases

Kb – quilobases

kDa – quilodaltons

°C – graus Celsius

R.H. – umidade relativa

et al. – e colaboradores

μl – microlitro

ml – mililitro

g – grama (s)

ng – nanograma (s)

μg - micrograma

μM – micromolar

mM – milimolar

pmol – picomol

U – unidade(s)

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SSC – Citrato de sódio

sp. – espécie

ORF – módulo aberto de leitura

dNTP – desoxirribonucleotídeos

DNA – ácido desoxirribonucléico

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

h – hora (s)

seg – segundo (s)

min – minuto (s)

RESUMO

Apesar da grande quantidade de informação disponível a respeito dos elementos transponíveis (TEs), há muito a ser pesquisado, principalmente em relação à ocorrência de diferentes elementos em muitas espécies e ao fenômeno de transferência horizontal. Entretanto, os mecanismos pelos quais tais transferências horizontais ocorrem permanece desconhecido.

O presente trabalho buscou contribuir para a compreensão do fenômeno de transferência horizontal de elementos transponíveis através da procura de possíveis vetores entre ácaros parasitas e microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*.

Através das abordagens de PCR e *southern blot*, foi observada a existência de seqüências homólogas ao elemento *P* e ao retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster* no genoma de dois ácaros predadores de ovos de *Drosophila* analisados, *Proctolaelaps sp.* e *Macrocheles muscaedomesticae*.

Com as mesmas abordagens, foi observada a existência de seqüências homólogas ao elemento *P* e ao retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster* nos genomas de oito taxa de vespas parasitóides de *Drosophila* encontradas em diferentes locais de coleta. Os microhimenópteros estudados pertencem às Superfamílias Cynipoidea, Chalcidoidea, Proctotrupeoidea e Ichneumonoidea

A partir de amostras de frutos vindos da natureza, microhimenópteros parasitóides de *Drosophila* emergidos em laboratório, pertencentes ao Gênero *Gnaspis* e à família Diapriidae, foram criados parasitando *Drosophila melanogaster* por até sete gerações.

Foram encontradas seqüências homólogas ao elemento *P* e ao retroelemento *gypsy* de *Drosophila* no genoma destes microhimenópteros analisados. O seqüenciamento destas amostras demonstrou que as seqüências dos fragmentos amplificados pelos *primers* desenhados para o elemento *P* de *D. melanogaster* apresentaram 100% de similaridade com o elemento *P* de *D. willistoni*.

Quanto ao retroelemento *gypsy*, as amostras da família Diapriidae apresentaram seqüências com 100% de homologia com a seqüência de *gypsy* de *D. melanogaster*. As amostras do gênero *Ganaspis* apresentaram seqüências com 99% de homologia ao retroelemento *gypsy* de *Drosophila melanogaster*.

Considerando as características ecológicas próprias das assembléias de Drosofilídeos, muitos deles compartilhando substratos de criação e de alimentação, convivendo intimamente com parasitas como ácaros, parasitóides como microhimenópteros e com uma ampla gama de microorganismos, não podemos descartar a potencialidade destes organismos em oportunizar eventos de transferência horizontal.

Esforços para identificar elementos transponíveis em outros táxons, entretanto, são ainda necessários para melhor entender a evolução dessas seqüências nos genomas onde estão inseridas.

ABSTRACT

Despite the vast amount of information available about the transposable elements (TEs), there is much to be studied, especially in relation to the occurrence of different elements in many species and the phenomenon of horizontal transfer. However, mechanisms of these horizontal transfers remain unknown.

The present study was made aiming to contribute to the comprehension of the phenomenon of horizontal transfer of transposable elements, through the search for putative vectors, such as parasitic mites and microhymenopteran parasitoids of *Drosophila*.

Using PCR and *southern blot* assays, it was detected the presence of sequences homologous to the *P* element and to the *gypsy* retroelement of *Drosophila melanogaster* in the genomes of two of the mites predators of eggs of *Drosophila* analyzed, *Proctolaelaps* sp. and *Macrocheles muscaedomesticae*.

Through the same approaches, we observed the existence of sequences homologous to the *P* element and to the *gypsy* retroelement of *Drosophila melanogaster* in the genomes of eight wasps, parasitoids of *Drosophila*, collected in different sites in nature. The microhymenopterans studied are members of the Superfamilies Cynipoidea, Chalcidoidea, Proctotrupeoidea and Ichneumonoidea.

From samples of rotten fruits collected in the field, microhymenopteran parasitoids of *Drosophila* emerged in the laboratory, members of the *Ganaspis* genus and of the Diapriidae family, were reared parasiting *Drosophila melanogaster* flies during until seven generations.

The presence of sequences homologous to the *P* element and to the *gypsy* retroelement of *Drosophila* was detected in the genome of the wasps analyzed. The sequencing of those samples revealed that the fragments amplified by the primers drawn to detect the *P* element of *D. melanogaster*, are 100% similar to the *P* element of *Drosophila willistoni*.

Respect to *gypsy*, the samples of the wasps of the Diapriidae family presented sequences with 100% of homology with the sequence of *gypsy* of *D. melanogaster*, whereas the samples of the genus *Ganaspis* presented sequences with 99% of similarity with the *gypsy* retroelement of *Drosophila melanogaster* in their genomes.

Considering the ecological characteristics of the Drosophilidae assemblages, where several of them share same substrates as breeding and feeding sites and co-exist in intimacy with parasites such as mites, with parasitoids, such as microhymenopterans, and with several microorganisms, we can not discharge the potentiality of many of them to mediate events of horizontal transfer.

Efforts to identify transposable elements in other *taxa*, however, are still necessary for a better understanding of the evolution of those sequences in the genomes where they are inserted.

INTRODUÇÃO

1. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Elementos transponíveis (TEs) são seqüências de DNA constituintes do genoma classificadas como DNA medianamente repetido. No entanto, algumas peculiaridades os distinguem das demais seqüências presentes nesta categoria. A principal característica dos TEs é a capacidade (intrínseca ou não) de mudar sua localização no genoma. Eles ainda compartilham as seguintes características: causam duplicação dos sítios de inserção, apresentam polimorfismo de sítios de inserção e apresentam uma variabilidade no número de cópias nos genomas, intra e interespecíficas (Capy *et al.*, 1998).

Apesar de terem sido descobertos em 1940 por Barbara McClintock, foi somente na década de 80, a partir de sua caracterização molecular, percebeu-se que esses elementos estão presentes nos genomas de praticamente todos os organismos investigados. Já se passaram mais de seis anos da publicação do genoma humano e cientistas do mundo inteiro ainda não conseguiram decifrar muitos dos mistérios relacionados à estrutura e funcionamento do genoma. Dentre os enigmas ainda não decifrados está o papel dos elementos transponíveis (TEs) na evolução dos genomas hospedeiros.

O número de cópias de um TE em um genoma pode variar de poucas a milhares, e cada hospedeiro pode ter diferentes tipos de TEs, representando parte considerável dos seus genomas. A curiosidade a respeito dessas seqüências está aumentando a cada ano, uma vez que os projetos de seqüenciamento em larga escala de várias espécies revelam que uma grande

parte do genoma é constituída por TEs. Apesar dos elementos transponíveis estarem presentes em todos os genomas investigados, sua representatividade varia, enormemente, entre os táxons. Sabe-se que 90% do genoma de algumas plantas (SanMiguel *et al.*, 1996), 45% do genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) e até 22% do genoma de *Drosophila* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007) são constituídos por elementos móveis.

Desde sua descoberta, uma das principais questões levantadas é se o surgimento de TEs e sua distribuição através dos organismos constituem um fenômeno recente ou se estes elementos são antigos componentes dos genomas. Investigações tanto entre como dentro de espécies, realizadas pelo nosso grupo de pesquisa têm providenciado considerável quantidade de informação (Loreto *et al.*, 1998; Herédia *et al.*, 2004, 2007; Sassi *et al.*, 2005). Comparações das filogenias de TEs com as das suas espécies hospedeiras também fornecem idéias sobre a evolução desses elementos, cujo principal modo pelo qual têm sido transmitidos de uma espécie a outra parece ser o de transferência vertical a partir de um ancestral. Entretanto, inconsistências têm sido encontradas entre a filogenia de hospedeiros e TEs, sugerindo, em muitos casos, que exista transferência horizontal entre espécies.

Dentre os enigmas ainda não decifrados está o papel dos elementos transponíveis (TEs) na evolução dos genomas hospedeiros. Se nós quisermos entender como os TEs evoluem, nós devemos considerar seu impacto na evolução e adaptação do genoma hospedeiro. Por exemplo, a transposição pode levar a mutações morfológicas e regulatórias, e a rearranjos cromossômicos.

A inserção de TEs em genes pode gerar diferentes conseqüências evolutivas para as espécies hospedeiras. Quando inseridos na região 5' flanqueadora dos genes os TEs podem atuar como promotores (Brosius, 1999). Isso ocorre porque os TEs possuem seqüências regulatórias em *cis* que podem não somente influenciar a sua própria expressão como também a expressão dos genes adjacentes (Jordan *et al.*, 2003). Quando inseridos em introns, os TEs

podem influenciar a expressão dos genes, gerando mudanças no padrão de processamento do RNA mensageiro (Davis *et al.*, 1998) e inserção de sítios de poliadenilação (Mager *et al.*, 1999). Além desses efeitos regulatórios, os TEs podem também gerar novos genes quando inseridos nas regiões codificantes, fenômeno conhecido como domesticação (Nekrutenko e Li, 2001; Lorenc e Makalowski, 2003; Ganko *et al.*, 2003; Ganko, 2006). Tais achados, entre outros, tornam seu estudo relevante tanto do ponto de vista evolutivo, quanto para o entendimento do seu papel nos mecanismos de expressão e regulação gênica.

1.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

A classificação dos TEs baseia-se, principalmente, no modo como o elemento se transpõe. TEs podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com o intermediário envolvido no seu mecanismo de transposição (Finnegan, 1989):

Elementos de Classe I: são TEs com transposição replicativa, envolvendo um intermediário de RNA que é transcrito reversamente antes da inserção. São chamados de retrotransposons e subdivididos em dois grandes grupos (subclasses) com base na sua organização geral: retrotransposons com LTRs (repetições terminais longas) que são estruturalmente similares a retrovírus e retrotransposons sem LTRs, muitas vezes chamados de retroposons não virais. Estes elementos são amplamente distribuídos nos genomas de eucariotos. Entre os retrotransposons mais conhecidos de *Drosophila* encontram-se *copia*, *412* e *gypsy*.

Elementos de Classe II: utilizam somente DNA como intermediário de transposição, sendo conhecidos como transposons propriamente ditos. Possuem repetições terminais invertidas (ITRs) de 10 a 500 pb de tamanho flanqueando uma região central que codifica uma enzima transposase que catalisa a transposição. São classificados em várias famílias de acordo com a seqüência da transposase, o tamanho e a composição das ITRs, e da natureza das duplicações que produzem no DNA alvo (Capy *et al.*, 1998). Têm sido encontrados tanto em

procaríotos como em eucariotos. Exemplos de TEs desta categoria em *Drosophila* são *mariner*, *hobo* e *P*.

Além disto, características como estrutura geral, existência de domínios, motivos e assinaturas protéicas semelhantes e o grau de similaridade na seqüência de nucleotídeos ou aminoácidos também são consideradas. Segundo estas premissas, os elementos são agrupados em classes, subclasses, superfamílias, famílias e subfamílias (Capy *et al.*, 1998) (Figura 1). Recentemente, novas subcategorias vêm sendo estabelecidas com base no tipo de mecanismo de inserção (Wicker *et al.*, 2007).

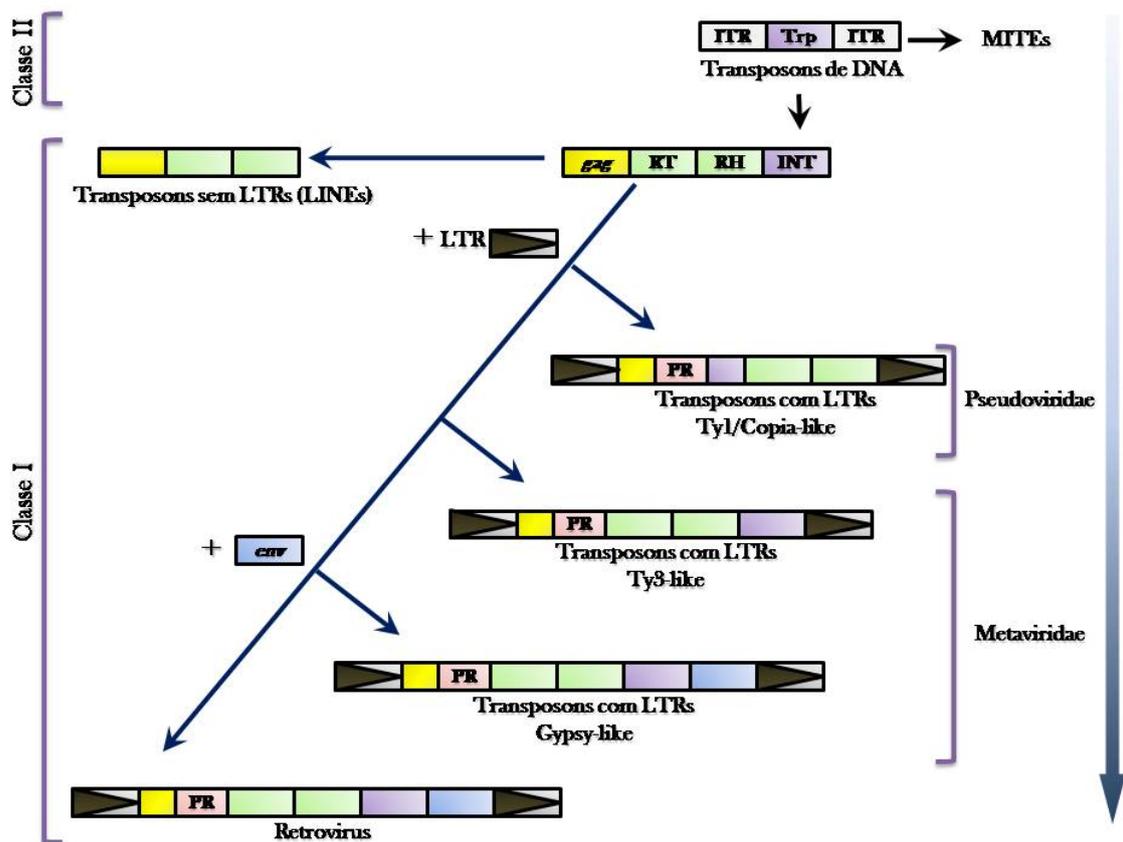


Figura 1. Classificação dos elementos transponíveis (modificado de Capy *et al.*, 1998).

Em um mesmo genoma, podem coexistir dois tipos de cópias de um dado TE: os elementos ou cópias completas, também denominados autônomos, contendo todas as seqüências necessárias para sua transposição, e aqueles deletados, também referidos como incompletos, não-autônomos ou defectivos. Nestes últimos, observamos deleções e, em função disto, estes elementos necessitam de fatores providos por cópias completas para sua transposição. Como os TEs estão sujeitos a altas taxas mutacionais, a freqüência de elementos não autônomos é bastante alta (Kidwell e Lisch, 2001).

1.2 - IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS E REGULAÇÃO DE TES

Elementos transponíveis despertam profundas questões sobre sua relação com o genoma hospedeiro e sua relevância para a evolução dos seres vivos, onde se discute se essas seqüências seriam parasitas extremos, DNA lixo ou simbiontes. Vários estudos têm discutido as interações dos TEs, seu impacto na função e estrutura do genoma e na evolução e adaptação das populações (revisões em Kidwell e Lisch, 2001; Brookfield, 2005).

Devido a sua capacidade de transposição, os TEs são importantes agentes mutagênicos com o potencial de causar uma variedade de mudanças deletérias nos genomas de seus organismos hospedeiros. Entretanto, estão sendo descobertos muitos exemplos de interações TE-hospedeiro proporcionando benefícios para os hospedeiros (Kidwell e Lisch, 2001). Segundo os autores, embora o conceito de TE como parasita molecular seja útil para o entendimento da natureza das relações parasita-hospedeiro, esta abordagem deveria ser expandida para considerar um contínuo de interações entre elementos e seus hospedeiros, variando de parasitismo em um extremo a mutualismo e simbiose em outro.

O impacto da presença de TEs pode adquirir proporções distintas dependendo se sua localização for eucromática ou heterocromática. Cópias ativas são encontradas principalmente na eucromatina, enquanto que 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).

Quando os TEs apresentam alta taxa de transposição, eles podem interferir no valor adaptativo do hospedeiro. Em função disso, os eventos de transposição parecem ser limitados ao tempo, a células e a tecidos específicos. A regulação da transposição é um mecanismo complexo e específico de cada elemento e inclui regulação de sua transcrição e tradução. Os próprios TEs possuem seqüências regulatórias que modulam sua transcrição. Além disso, fatores dos hospedeiros parecem ser importantes nessa regulação, como proteínas supressoras ou ativadoras e também mecanismos epigenéticos, como co-supressão mediada por RNA de interferência e metilação (Hurst e Werren, 2001; Castro e Carareto, 2004). A atividade dos TEs pode ainda ser induzida por fatores ambientais, em particular por estresse (Capy *et al.*, 2000).

A implicação dos TEs na evolução do genoma envolve, ainda, mecanismos de manutenção de telômeros, rearranjos de cromossomos, mecanismos de recombinação somática, variabilidade do sistema imunológico, entre outros (Kidwell e Lisch, 2000).

Outra questão importante diz respeito às relações entre diferentes famílias de TEs, geralmente consideradas diversificadas e complexas. Essas famílias têm sido freqüentemente comparadas com as espécies cohabitantes de um ecossistema, e têm sido consideradas, por analogia, como parte da "ecologia do genoma" (Kidwell e Lisch, 2001; Brookfield, 2005).

A busca por TEs em 12 genomas recentemente seqüenciados de espécies de *Drosophila* demonstrou a existência de linhagens de elementos até então não documentadas para este gênero. É o caso, por exemplo, da superfamília PIF (*P* instability factor) de transposons (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007; Casola *et al.*, 2007). Esta superfamília é particularmente intrigante, dado que genes PIF-*transposase-like* têm sido implicados na origem de, ao menos, sete

genes diferentes durante a radiação de *Drosophila*, sugerindo que, não apenas os TEs afetam a evolução da estrutura do genoma, mas que sua domesticação pode ser parte do surgimento de novos genes.

1.3 - ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS TES

Acredita-se que o surgimento dos TEs dentro do genoma de uma espécie pode dar-se pelo rearranjo de seqüências genômicas pré-existentes, através de sua aquisição por transmissão entre espécies não relacionadas, isto é, por transmissão horizontal - a partir de uma espécie doadora - ou ainda, através de transmissão vertical a partir de seus ancestrais (Kidwell e Lisch, 2001).

Segundo Capy *et al.* (1998), a primeira etapa na evolução de um elemento recentemente formado ou introduzido no genoma de uma espécie é o aumento no número de cópias (fase invasora), levando a uma diversidade de sítios de inserção. A taxa com que isso ocorre é controlada por muitos fatores que regulam a transposição de um TE. Devido aos efeitos deletérios da transposição (como mutações e rearranjos cromossômicos) vários mecanismos de inativação destes elementos são eventualmente selecionados. Uma vez silenciados, estes elementos vão permanecer por longos períodos fazendo parte do DNA medianamente repetitivo das espécies que os portam, passando a ser transmitidos verticalmente. Ainda, podem ser mantidos em estado de latência ou perdidos estocasticamente (Pinsker *et al.*, 2001).

Para entender a evolução de um TE em particular dentro de um gênero é necessário analisar a distribuição e a conservação do elemento nas espécies deste gênero. Quando TEs são transmitidos verticalmente sua história filogenética deve refletir a história evolutiva dos seus hospedeiros. Desse modo, a filogenia dos TEs é freqüentemente comparada com a filogenia das espécies hospedeiras, na tentativa de entender a evolução destas seqüências móveis (Silva *et al.*, 2004). As congruências entre as duas filogenias são encaradas como indicativos de transmissão vertical dos elementos transponíveis. No entanto, quase todas estas

comparações levam a discrepâncias que podem ser explicadas por várias hipóteses.

Um das hipóteses é a transmissão horizontal de TEs, fenômeno que assume uma transmissão assexual de material genético entre espécies distantemente relacionadas. As diferenças encontradas também podem evocar transmissão vertical como explicação, desde que, pelo menos, uma das seguintes premissas esteja presente: polimorfismo ancestral, taxas de evolução de TEs diferentes entre hospedeiros e/ou amostragem aleatória durante o processo de especiação (Capy *et al.*, 1994).

Segundo Silva *et al.*, (2004), três tipos de distorções da filogenia esperada de um TE são usualmente utilizadas para detectar transmissão horizontal:

- 1) Detecção de elementos com alto grau de similaridade de seqüência em táxons não relacionados. Neste caso, a divergência entre as seqüências de TE é muito menor do que a divergência entre genes nucleares das suas respectivas espécies hospedeiras, tornando menor o comprimento dos ramos da filogenia do TE.
- 2) Detecção de diferenças topológicas entre a filogenia do TE e a das espécies hospedeiras.
- 3) Distribuição descontínua dos elementos entre táxons proximamente relacionados. A presença de um TE em uma linhagem e a ausência em uma linhagem irmã, resulta na ausência de um ou mais ramos na filogenia do TE.

A análise cuidadosa de todas essas situações permite-nos inferir sobre casos de transmissão horizontal. Entretanto, explicações alternativas precisam ser testadas, como polimorfismo ancestral com independente distribuição de cópias nas espécies descendentes, taxas diferentes de substituição em TEs nas diferentes espécies e perda estocástica de TEs em alguns táxons. Atenção especial deve ser dada para ramos inteiros onde uma ou poucas espécies posicionadas internamente possuem o elemento considerado, o que implica que vários

eventos independentes de perda estocástica devem ser utilizados para explicar o que um único evento de transmissão horizontal resolveria (algo parcimoniosamente indesejável) (Capy *et al.*, 1998).

Numerosos casos de transmissão horizontal de TEs entre espécies de *Drosophila* têm sido descritos envolvendo elementos de classe II, como *P* (Daniels *et al.*, 1990b; Silva e Kidwell, 2000; Loreto *et al.*, 2001), *mariner* (Maruyama e Hartl, 1991), *hobo* (Daniels *et al.*, 1990a) e *Minos* (de Almeida e Carareto, 2005). Para elementos de classe I, casos bem documentados envolvem *gypsy* (Herédia *et al.*, 2004) e *g twin* (Ludwig e Loreto, 2007).

1.4 - TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL E TEs

Transferência gênica horizontal é um fenômeno comum em bactérias e recentemente vem aumentando o reconhecimento de seu papel na evolução dos eucariotos (Syvanem e Kado, 2002), mudando assim, a antiga idéia de sua não ocorrência ou de sua pouca importância na evolução desse grupo. 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 supostos vetores.

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 tem sido considerado. A lista inclui vírus, protozoários, fungos (Jehle *et al.*, 1995, 1998), bactérias (Kondo *et al.*, 2002), ácaros (Houck *et al.*, 1991) e vespas parasitóides (Yoshiyama *et al.*, 2001).

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 semi-parasita. 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.

Transferência horizontal de TEs exige, ao menos, uma relação ecológica entre as espécies envolvidas. Parasitas e agentes patogênicos compartilhados foram sugeridos como vetores de TEs (Houck *et al.*, 1991; Kidwell, 1992), no entanto, os mecanismos moleculares envolvidos em tais transferências ainda não foram elucidados.

Alguns autores apontam que um possível candidato agindo como um vetor de TEs de insetos poderia ser um baculovírus. Baculovírus formam um grande grupo de vírus de DNA dupla fita que infectam principalmente larvas de insetos. Uma característica única dos baculovírus é que eles espontaneamente acomodam elementos transponíveis em seu genoma (Jehle *et al.*, 1998). Diferentes TEs de insetos foram encontrados em genomas de baculovirus, mas todos eles foram gerados em sistemas de cultura celular. Os resultados demonstram "o escape horizontal" de transposons *Tc1/mariner-like* do genoma do hospedeiro para o genoma do baculovírus e apóia a hipótese de que baculovírus podem estar envolvidos na transferência horizontal de TEs de insetos.

Embora a questão sobre se baculovírus são capazes de promover um "vai-e-vem" de TEs entre hospedeiro e parasita ainda deva ser experimentalmente comprovada, existem algumas características específicas da biologia de baculovírus que estão de acordo com seu papel potencial: possuem genoma de 80-230kb, acomodando seqüências adicionais sem interferir nas funções virais; e a replicação do seu DNA ocorre no núcleo do hospedeiro, onde existe uma boa chance de "receber" TEs do genoma hospedeiro ou "entregar" TEs ao mesmo.

Outro trabalho demonstra que o "escape horizontal" de um TE do hospedeiro em um genoma de baculovírus não se restringe a sistemas de cultura celular, mas também ocorre durante a infecção da larva do hospedeiro. Jehle *et al.*, (1995) coinfectaram larvas de uma mariposa com diferentes baculovírus, resultando em vários vírus portando inserções, uma delas caracterizada como *TC14.7*, um elemento transponível de 4726pb e com homologia com membros da família *Tc1/mariner-like*.

Tais achados demonstram alta relevância evolutiva e, no entanto, muito pouco tem sido feito nesse sentido com espécies e gêneros neotropicais de ácaros e microhimenópteros parasitóides, ecologicamente relacionados a *Drosophila*, como possíveis vetores para transferência horizontal de TEs. Além disso, a literatura específica sobre o assunto em questão ainda carece de investigações do ponto de vista da presença ou ausência de quaisquer uma das 20 ou mais famílias conhecidas de TEs nestes organismos.

É importante salientar ainda que, dos poucos estudos realizados, a maioria tem usado linhagens de moscas provenientes de bancos de estoques e, como tal, coletadas há bastante tempo, sendo mantidas em número pequeno e em condições muito diferentes daquelas da natureza. Portanto, se faz presente a necessidade de realizar um estudo visando reproduzir condições mais próximas àquelas que ocorrem na natureza.

1.5 - ELEMENTO TRANSPONÍVEL *P*

A família do elemento *P* é uma das mais bem caracterizadas nos organismos eucariotos. 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 (O'Hare e Rubin, 1983). Quatro exons são designados como fases abertas de leitura (ORFs) numeradas de zero a três. 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 e Rubin, 1986). Poucas cópias do elemento *P* presentes no genoma de *D. melanogaster* são de elementos autônomos, sendo a maioria elementos não autônomos, resultantes de deleções internas ou outras mutações, geralmente pequenos e derivados de elementos completos.

Estudos da distribuição de seqüências homólogas a *P* no gênero *Drosophila* haviam sugerido que ele é basicamente restrito ao subgênero *Sophophora*. Dentro do subgênero *Sophophora*, foram detectadas seqüências de *P* em todas as espécies dos grupos *willistoni*, *obscura*, como também 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.*, 1988; Daniels *et al.*, 1990b). 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).

A descoberta de seqüências com similaridade aos elementos *P* de drosofilídeos em outros insetos como *Lucilia cuprina* (família Calliphoridae) (Perkins e Howells, 1992), *Musca domestica* (Lee *et al.*, 1999) e *Anopheles sp.* (Sarkar *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004) 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*, por exemplo, é estimada em 50% em nível de 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. Assim, 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). Recentemente, seqüências com homologia a elementos *P* têm sido reportadas nos genomas de *Homo sapiens*, *Bos taurus* e *Gallus gallus* (Hagemann e Pinsker, 2001).

O elemento *P* representa um dos exemplos mais interessantes e consistentes de divergência entre filogenia de TEs e de suas espécies hospedeiras. Esse elemento invadiu recentemente o genoma de *D. melanogaster*, muito provavelmente por transferência horizontal de uma espécie do grupo *willistoni*, a *D. 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 Capy *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1994; Cummings, 1994).

Muitas propriedades biológicas de elementos *P* ativos também 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 (revisão em Capy *et al.*, 1998). 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.

1.6 - RETROELEMENTO *GYPHY*

O retroelemento *gypsy* (também conhecido como *mdg4*), é considerado um retrovírus endógeno, foi primeiramente identificado em *D. melanogaster* (Ilyin *et al.*, 1980), e pertence ao gênero *Errantivirus* (Boeke e Stoye, 1997). O retrotransposon *gypsy* de *D. melanogaster* possui 7,5 kb e LTRs com 482 pb (Bayev *et al.*, 1984). 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; Pélisson *et al.*, 1997; Lerat e Capy, 1999). Assim como outros *Errantivirus*, esse retroelemento codifica os genes *gag*, *pol* e *env* (Bayev *et al.*, 1984).

Como geralmente ocorre com outros TEs, *gypsy* move-se com baixa frequência no genoma dos hospedeiros. Entretanto, algumas linhagens de *D. melanogaster* mostram transposição em alta frequência, apresentando muito mais cópias (mais de 20) de *gypsy* na eucromatina, indicando que um descontrole da mobilização do elemento pode ocorrer ocasionalmente. Na maioria das linhagens, *gypsy* torna-se estável após um período de instabilidade, porém, em algumas linhagens, *gypsy* mantém-se ativo continuamente (Kim *et al.*, 1990).

A superfamília *gypsy-like* constitui um grupo heterogêneo amplamente distribuído entre os eucariotos (Marín e 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 a *gypsy* apenas em aves e mamíferos.

Quando o elemento *gypsy* de *D. melanogaster* é utilizado como sonda em experimentos de hibridização DNA-DNA, com o objetivo de investigar sua presença no genoma de outras espécies, novamente a ampla distribuição deste elemento é evidenciada (Stacey *et al.*, 1986; Alberola *et al.*, 1997; Loreto *et al.*, 1998; Terzian *et al.*, 2000; Vázquez-Manrique *et al.*, 2000, Sassi *et al.*, 2005; Herédia

et al., 2004, 2007). No entanto, o sinal da hibridização é bastante variável, indicando considerável divergência nas espécies analisadas.

A ampla distribuição deste elemento é atribuída, por muitos autores, à existência de elementos *gypsy* em um ancestral comum antes da radiação *Drosophila* e subsequente transmissão vertical (Alberola e de Frutos, 1996). No entanto, se levarmos em consideração as características infectivas de *gypsy* de *D. melanogaster*, eventos infectivos (e transmissão horizontal) podem ter propiciado esta grande expansão e desempenhado um papel importante na história evolutiva deste elemento (Alberola e de Frutos, 1996; Vázquez-Manrique *et al.*, 2000; Terzian *et al.*, 2000; Herédia *et al.*, 2004).

Além de *D. melanogaster*, *D. subobscura* e *D. virilis* possuem seqüências completas descritas para o elemento *gypsy* (Mizrokhi e Mazo, 1991; Alberola e de Frutos, 1996). Estes retroelementos apresentam uma estrutura similar ao elemento *gypsy* de *D. melanogaster*, o que sugere que eles também sejam transcricional e transposicionalmente ativos, embora não codifiquem uma proteína Env funcional. Segundo Alberola *et al.*, (1997), as seqüências *gypsy* nessas duas espécies teriam evoluído de um elemento ancestral com gene *env* funcional e poderiam ser consideradas formas degeneradas de retrovírus, enquanto *gypsy* de *D. melanogaster* continuaria mantendo o seu "status" de retrovírus. Entretanto, Mejlumian *et al.*, (2002) reportaram a existência de seqüências provavelmente codificadoras de proteínas Env completas e funcionais no genoma de várias espécies, incluindo *D. virilis* e *D. subobscura*. Esses dados mostram que seqüências capazes de codificar proteínas Env funcionais são conservadas no genoma de diferentes espécies em adição a muitas cópias defectivas.

Terzian *et al.*, (2000) analisaram filogeneticamente uma porção de 362 pb do gene da integrase (IN) 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, em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, mais abrangente que os anteriores, Herédia *et al.*, (2004) analisaram

filogeneticamente o elemento *gypsy* de 21 espécies de *Drosophila*, *Zaprionus indianus* e *Scaptodrosophila latifasciaeformis*, com base em 485 pb do gene *env*. As análises indicam grandes incongruências entre a filogenia do elemento *gypsy* e a filogenia das espécies hospedeiras, identificando um complexo padrão evolutivo que inclui polimorfismo ancestral, transmissão vertical e múltiplos casos de transmissão horizontal.

Estudos do elemento *gypsy* de *D. melanogaster*, *D. subobscura* e *D. virilis* têm mostrado pouca variação nas taxas de substituição entre as diferentes ORFs do elemento (Alberola e de Frutos, 1996). Mejlumian *et al.*, (2002) evidenciaram forte correlação entre as distâncias do *env* e IN (integrase), indicando que esses genes evoluíram com a mesma taxa. A observação de que diferentes regiões do elemento evoluem igualmente é uma informação importante para suportar filogenias baseadas em apenas uma região do elemento.

2. ÁCAROS PARASITAS DE *DROSOPHILA*

A relação de parasitismo entre ácaros e drosófilas tem sido amplamente registrada na literatura (revisões em Ashburner, 1989) desde o início do uso da *Drosophila* como organismo experimental. 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 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 o trabalho conduzido por Margareth Kidwell e sua equipe da Universidade do Arizona (Houck *et al.*, 1991).

Ácaros do gênero *Macrocheles* ocorrem mundialmente. Eles alimentam-se e ovopositam em um largo espectro de substratos, de tecidos vegetais decompostos e solo úmido a excrementos de animais. Nestes materiais, eles

primeiramente consomem nematódeos (Rodríguez *et al.*, 1962) e pequenos artrópodes, incluindo o primeiro e segundo ínstar de larvas de moscas (Pereira e de Castro, 1945). Axtell (1963) sugeriu que, consumindo os estágios imaturos das moscas, *Macrocheles muscaedomesticae* (Figura 2) exerce um efeito de controle de algumas populações de *Musca domestica* na natureza. Nada se sabe, no entanto, sobre a capacidade destes ácaros para reduzir esses números por alimentar-se diretamente dos hospedeiros adultos.

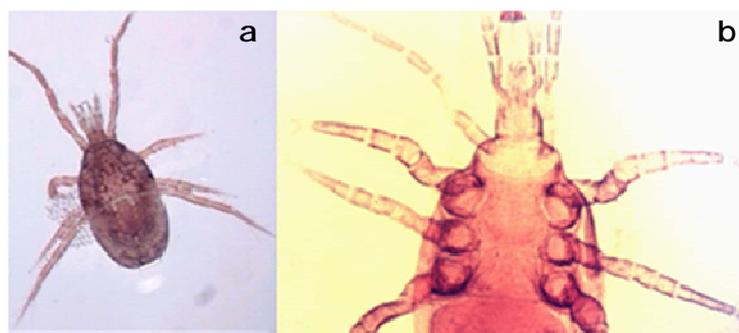


Figura 2. Fotografia do ácaro parasita *Macrocheles muscaedomesticae*. a. Vista dorsal; b. vista ventral.

O ectoparasita *Macrocheles subbadius* Berlese (Acari: Macrochelidae) coloniza e se reproduz em cactus nos quais *Drosophila nigrospiracula* também ocorre. Os ácaros se dispersam grudando-se ao abdômem da mosca, e Polak (1996) demonstrou que este ácaro fura a cutícula da mosca e ingere a hemolinfa enquanto está anexado ao abdômem do seu hospedeiro. Assim, *M. subbadius* é considerado um ectoparasita de *D. nigrospiracula*, ao contrário da antiga crença generalizada de que macroquelídeos formam apenas associações foréticas com moscas adultas (Axtell, 1964).

Inúmeras espécies de insetos são infectados por bactérias endosimbiontes transmitidas matematicamente, e muitos endosimbiontes comensais e parasitas como *Wolbachia* (Filo Proteobacteria) e *Spiroplasma* (Filo Firmicutes), mostram pouca congruência com a filogenia do hospedeiro (Vavre *et al.*, 1999). Esse padrão, bem como a ocorrência de endosimbiontes intimamente relacionados infectando espécies de hospedeiros distantemente relacionados indica que estes simbiontes devem ocasionalmente colonizar novos hospedeiros através de transferência horizontal. No entanto, os mecanismos pelos quais essa transmissão ocorre são desconhecidos. Até agora, os únicos estudos experimentais para demonstrar transmissão interespecífica de endosimbiontes incidiram sobre vespas parasitóides que podem contrair infecções de *Wolbachia* dos seus insetos hospedeiros, ou de outras espécies de vespas parasitóides que compartilham o mesmo hospedeiro (Heath *et al.*, 1999, Huigens *et al.*, 2004).

Outra questão levantada foi se um ácaro ectoparasita poderia servir como vetor para transmitir *Spiroplasma* de uma espécie de *Drosophila* a outra (Jaenike *et al.*, 2007). Entre as razões pelas quais isto seria possível encontram-se o fato de que muitas espécies de *Drosophila* estão infectadas com ácaros ectoparasitas no campo (Polak, 1996) e que a agregação interespecífica de *Drosophila* em seus sítios de criação podem proporcionar um espaço para a circulação de ácaros de uma espécie de *Drosophila* para outra (Jaenike e James 1991; Krijger e Sevenster 2001). Além disso, o alto nível de similaridade de seqüência de DNA entre linhagens de *Spiroplasma poulsonii* isoladas de *Drosophila nebulosa*, *D. willistoni* e *D. melanogaster* (Montenegro *et al.*, 2005) sugerem que *S. poulsonii* tem sofrido transferência horizontal em um recente passado evolutivo.

Finalmente, os ácaros ingerem a hemolinfa de insetos infectados e, portanto, podem agir como "agulhas sujas" para transmitir micróbios que habitam a hemolinfa, como *Spiroplasma*, de um hospedeiro para outro, do mesmo modo que afídeos e outros insetos podem transmitir vírus de uma planta para outra (Nault, 1997). Os experimentos de Jaenike *et al.*, (2007) identificaram um mecanismo ecologicamente plausível pelo qual endosimbiontes podem ser transmitidos entre espécies no campo. Neste trabalho, ácaros do gênero

Macrocheles atuaram como vetores de transmissão interespecífica de endossimbiontes (transmitindo a infecção de *Spiroplasma* de *D. nebulosa* para *D. willistoni*). Dada a abundância de ácaros ectoparasitas em comunidades naturais, os autores acreditam que ácaros generalistas poderiam ser importantes vetores de simbiontes que ocorrem na hemolinfa de insetos.

Assim, motivados pela atualidade do tema e pelo papel atribuído aos elementos transponíveis como geradores de variabilidade genética e aos ácaros como candidatos a vetores de elementos transponíveis, foi iniciado um estudo visando detectar sinais da presença destes elementos em ácaros que vivem associados às comunidades neotropicais de *Drosophila*.

3. PARASITÓIDES DE *DROSOPHILA*

Parasitas podem impor significativos custos ao valor adaptativo de seus hospedeiros e, portanto, podem representar potentes agentes de seleção em populações naturais (Godfray, 1994). A maioria dos insetos tem 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. Pavan e Stunkel (1982) afirmaram que o uso de sistemas parasitóide-*Drosophila* não só satisfaz requisitos de criação, como apresenta grande potencial para estudos de especiação, corte, relações parasitóide-hospedeiro, etc.

Como outros insetos, espécies de *Drosophila* são atacadas durante as fases larval e pupal por muitos parasitóides. Carton *et al.* (1986) listaram 42 espécies de Hymenoptera atacando-as, e é provável que muitas outras espécies ainda não tenham sido descritas. Durante as últimas décadas, várias investigações de laboratório e de campo têm estudado estes parasitóides, principalmente parasitóides larvais dos gêneros *Leptopilina* (Eucoilidae) e *Asobara* (Braconidae). Os estudos têm focado sua biologia, comportamento, ecologia, genética, fisiologia e imunologia (por exemplo, Carton *et al.*, 1986;

Carton e Nappi, 1997, 2001; Kraaijeveld *et al.*, 1998; Fellowes e Godfray, 2000; Fleury *et al.*, 2000, 2004).

Para parasitóides larvais, o tempo de desenvolvimento médio a 25°C varia entre 17 e 22 dias para machos e 18 a 24 dias para fêmeas (Carton *et al.*, 1986). Machos de espécies parasitóides sempre emergem antes das fêmeas (ao contrário do observado em *Drosophila*). Cabe ressaltar que a emergência das vespas da pupa do hospedeiro (Figura 3) ocorre muito depois (de 10 a 20 dias) da emergência de moscas das pupas não parasitadas.



Figura 3. Visualização dos estágios do microhimenóptero *Ganaspis sp.* ao emergir da pupa do hospedeiro.

Parasitóides adultos alimentam-se de qualquer solução contendo carboidratos: mel, néctar ou outras secreções vegetais como seivas. No laboratório eles alimentam-se do meio fornecido pelo hospedeiro e de carboidratos (açúcar ou mel).

Endoparasitóides de larvas tais como *Asobara tabida* e *Leptopilina bouvardi* têm muito em comum com verdadeiros parasitas, sendo a principal diferença que o sucesso do parasitismo sempre leva à morte do hospedeiro (Godfray, 1994). Os ovos são postos dentro do corpo do hospedeiro e o parasitóide juvenil permanece como uma larva de primeiro ínstar até a pupação do hospedeiro, momento no qual ele recomeça seu desenvolvimento e

rapidamente mata o hospedeiro. Os ovos e as larvas de primeiro ínstar têm que resistir ao reconhecimento e ataque pelo sistema imunológico do hospedeiro (Fellowes *et al.*, 1998). A mais importante medida de defesa anti-parasitóides em *Drosophila* é o encapsulamento celular, onde células circulantes na hemocele reconhecem um objeto como não-próprio e fazem com que outras células vão se aderir ao corpo estranho. A estrutura celular da cápsula se degrada e ela endurece e melaniza, matando os parasitóides por asfixia ou através da liberação de compostos necrosantes (Carton e Nappi 1997, 2001).

Por outro lado, uma vasta gama de mecanismos anti-resistência são conhecidos para parasitóides, incluindo a produção de toxinas e a injeção de vírus de DNA que causam apoptose das células envolvidas na imunidade do hospedeiro (Edson *et al.*, 1981).

Os genomas de duas vespas parasitóides, *Diadromus pulchellus* e *Eupelmus vuilleti*, bem como de *Apis mellifera*, contém poucas seqüências repetidas intercaladas correspondentes a elementos transponíveis. Isto talvez se deva a eliminação dos elementos transponíveis deletérios em machos haplóides. No entanto, retroelementos R1 e R2 (ambos têm um determinado local de inserção nos genes codificantes de rRNA 28 S) foram encontrados em 24 espécies de himenópteros testadas (Jackubczak *et al.*, 1990; Bigot *et al.*, 1992). Estes elementos provavelmente não têm efeitos deletérios sobre a viabilidade dos insetos por causa da estrutura repetida dos genes de 28S rRNA e portanto, não seriam eliminados pela haploidia dos machos. Esta especificidade de sítio de inserção pode explicar porque estes elementos são encontrados em Hymenoptera.

Bigot *et al.*, (1994), usando *Southern blot*, examinaram himenópteros parasitóides para a presença de retrotransposons *mariner*-like (MLEs) inseridos no genoma e os encontraram em 25 dos 27 taxa examinados. Os autores novamente concluíram que esse resultado de ampla distribuição de MLEs entre espécies de himenópteros se deve à estratégia neutra de invasão genômica pela inserção em sítios específicos.

Burke *et al.*, (1993) demonstraram a presença dos retrotransposons R1 e R2 no pteromalídeo *Nasonia vitripennis*. Os retrotransposons sem LTR R1 e R2 inserem-se especificamente nos genes do 28S do RNA ribossômico (rRNA) de *Bombyx mori* e *D. melanogaster*. Os autores apresentaram uma comparação mais detalhada da similaridade de seqüência dos elementos R1 e R2 de quatro ordens de insetos: Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Coleoptera.

Varricchio *et al.*, (1995) mostraram que, em comum com outros insetos, uma proporção dos genes de 28S rRNA do braconídeo *Aphidius ervi* é interrompida por uma seqüência gênica que possui um alto grau de homologia com membros da família R1, sugerindo que alguns desses vírus se tornaram endógenos no passado. Todas as inserções estão na mesma posição no gene 28S, indicando ou que as inserções ocorreram há muito tempo atrás (mais de 300 milhões de anos) ou, se elas ocorrem mais regularmente, que o sítio específico da inserção é característico do retroelemento. Provavelmente, retroelementos endógenos representem uma mistura de inserções preferenciais e contínuas, transmissão vertical e horizontal, mas muitas seqüências ainda precisam ser obtidas e analisadas antes de se firmar conclusões.

Contudo, as distribuições de seqüências particulares de retrotransposons integrados, têm grande potencial para ajudar a desvendar filogenias de himenópteros (Quicke, 1997).

McAllister e 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 observaram padrões consistentes com a manutenção vertical do elemento durante a divergência destas espécies.

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 e Hassel, 1982).

Dada a sua estrita associação com *Drosophila*, a alta frequência 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.

Os achados mencionados anteriormente serviram, portanto, como estímulo para a continuação e ampliação dos estudos sobre o papel de 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 e 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 e 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 em seus substratos (frutos e material vegetal em decomposição) pode ser bastante promissor e

pode contribuir para o estabelecimento de algumas relações de causa e efeito entre diversidade genética e riqueza de elementos transponíveis. Além disso, a caracterização das seqüências de elementos transponíveis identificados no genoma destes organismos permitirá inferências sobre possíveis relações filogenéticas entre os diferentes grupos estudados. Desta forma, o presente trabalho propôs os seguintes objetivos:

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Contribuir para a compreensão do fenômeno de transferência horizontal de elementos transponíveis através da busca de possíveis vetores entre ácaros parasitas, microhimenópteros parasitóides e *Drosophila*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Investigar a possibilidade de existência de seqüências homólogas ao elemento *P* e retroelemento *gypsy* de *Drosophila* no genoma de ácaros parasitas vindos da natureza e em associação com espécies de *Drosophila*. (Capítulo II);

2) Investigar, a possível presença de seqüências homólogas ao elemento *P* e retroelemento *gypsy* de *Drosophila* no genoma de microhimenópteros (vespas) parasitóides de *Drosophila* emergidos em laboratório a partir de amostras de frutos vindos da natureza. (Capítulos II e III);

3) Reproduzir e estabelecer em laboratório o sistema de parasitismo do microhimenóptero *Ganaspis* sp., tendo como espécie hospedeira *Drosophila melanogaster*. (Capítulo III);

4) Analisar comparativamente as seqüências obtidas dos elementos transponíveis isolados dos genomas de microhimenópteros com as seqüências já disponíveis de drosofilídeos. (Capítulo III).

CAPÍTULO II

P and *gypsy* transposable elements in parasitic mites and parasitoid wasps of *Drosophila*

SASSI, AK^a; LORETO, EL^b; FERLA, NJ^c; MENDONÇA, MJr^d; VALENTE, VLS^a.

a Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

b Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria

c Centro Universitário UNIVATES

d Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Artigo em fase final de preparação para ser enviado ao periódico *Parasitology Research*

ABSTRACT

In order to identify putative vectors for horizontal transfer of transposable elements (TEs) between species reproductively isolated of Drosophilidae, we investigated the presence of sequences homologous to transposable elements *P* and *gypsy* of *Drosophila*, in the genomes of three mites (parasitic or potentially parasitic) and eight parasitoid wasps of *Drosophila*, using the PCR and *Southern blot* approaches.

In two of the acari analyzed (*Proctolaelaps sp.* and *Macrocheles muscaedomesticae*), recognized as predators of *Drosophila* eggs, we identified sequences with homology with both *P* and *gypsy* TEs, which are different with respect to their mode of mobilization: *gypsy* is a retroelement, with infectivity characteristics that are shared with retroviruses, and *P* is a DNA transposon, which uses a transposase to mediate its mobilization inside or between genomes. Sequences homologous to both *P* and *gypsy* were also amplified from the genomes of eight parasitoid wasps of the *Drosophila* studied. Considering the ecological compatibility and the close relationship established between mites, wasps and *Drosophila*, the potentiality of these organisms to act as vectors for horizontal transfer of transposable elements between taxa reproductively isolated cannot be neglected.

Keywords: mites, parasitoid wasps, transposable elements, *P*, *gypsy*

INTRODUCTION

Transposable elements (TEs) are DNA sequences present in the DNA fraction repeated across the genome, which have the intrinsic or non-intrinsic capacity to move along. After their molecular characterization, it became clear that TEs are present in the genomes of almost all organisms investigated. Most individuals inherit their TEs through ancestral vertical transmission (Kidwell and Lisch 2001). The emergence of a new family of TEs in a species may be ascribed to two phenomena: transmission between unrelated species (horizontal transfer), or spontaneous generation from genomic sequences. To understand TE evolutionary history within a genus, TE phylogeny is often compared to the phylogeny of host species (Silva et al. 2004).

One of the first examples of inconsistencies between TE and species phylogenies concerns the specific distribution of *P* element sequences in distantly related species. The *P* element recently invaded the *Drosophila melanogaster* genome by horizontal transfer from *Drosophila willistoni*, a species of the *willistoni* group (Daniels et al. 1990). In terms of geographic distribution, the factual possibility of *D. melanogaster* to share habitats with *D. willistoni*, which occurs from the south of the state of Florida to the north of Argentina, was observed only in the last century (Spassky et al. 1971). Thus, horizontal transfer between these two species is a relatively recent event.

The complete *P* element in *D. melanogaster* is 2.9-kb long-sequence flanked by 31-bp inverted terminal repeats (ITRs), and has four exons. Few copies of the *P* element present in the *D. melanogaster* genome are autonomous elements; most copies are non-autonomous, usually small-sized elements derived from complete elements, which resulted from internal deletions or from other mutation events (O'Hare and Rubin 1983).

Within the *Sophophora* subgenus, *P* sequences were detected in all species of the *willistoni* and *obscura* groups, as well as in the majority of the species from the *saltans* group (Castro and Carareto 2004). In the *melanogaster* group, the *P*

element distributes discontinuously, exactly like in species outside the *Sophophora* subgenus (Daniels et al. 1990). Nevertheless, a *P* element with high similarity to elements present in *Sophophora* species has been detected in species of the *tripunctata* subgroup, which belongs to the *Drosophila* subgenus. This similarity has not been observed in previous studies (Loreto et al. 1998, 2001).

Apart from this, the discovery that *P* sequences present in species that do not belong to the *Drosophila* genus, like *Lucilia cuprina* (Calliphoridae family) (Perkins and Howells 1992), *Musca domestica* (Lee et al. 1999), *Anopheles gambiae* (Oliveira de Carvalho et al. 2004), and *Homo sapiens* (Hagemann and Pinsker 2001) suggests that this TE is more widely distributed than originally believed.

The *gypsy* retroelement (also known as *mdg4*) was first described in *Drosophila melanogaster* as a 7.5-kb sequence with 482-pb LTRs (Bayev et al. 1984). Later, *gypsy* was proved to belong to the *Errantivirus* genus (Boeke and Stoye 1997). Like other errantiviruses, this retroelement codifies the *gag*, *pol*, and *env* genes, which are responsible for *gypsy* replication and infectivity (Kim et al. 1994, Lerat and Capy 1999). In turn, the *gypsy-like* superfamily constitutes an heterogeneous group that distributes widely among eukaryotes (Marín and Lhoréns 2000). Miller et al. (1999) characterized and described the phylogenetic kinships of retrotransposon sequences of the *gypsy-like* superfamily in a wide variety of organisms, which included some vertebrate species.

When the *gypsy* probe of *D. melanogaster* is used to investigate the presence of these sequences in genomes of other species, once again the wide distribution of the element becomes clear (Stacey et al. 1986, Alberola et al. 1997, Loreto et al. 1998). Yet, the hybridization signal varies considerably, which indicates the significant divergence between the species analyzed.

Several authors impute the wide distribution of *gypsy* across species of the *Drosophila* genus (Stacey et al. 1986, Alberola et al. 1997, Loreto et al. 1998; Herédia et al. 2004, 2007) to the presence of *gypsy* ancestrals in these insects. However, if infective traits of *gypsy* in *D. melanogaster* are specifically considered,

infection events are likely to have occurred and thus afforded this marked expansion (Alberola and De Frutos 1996, Vázquez-Manrique et al. 2000). Therefore, horizontal transmission events may offer an explanation for the complexity in this element's distribution scenario (Herédia et al. 2004).

Though the exact horizontal transfer mechanism has not been fully understood, geographic, chronological and ecological overlapping between donor and host species of a mobile sequence should be the prime requirement for its occurrence. Yet, the role played by potential vectors should also be taken into account. In this framework, the characterization of biological agents capable of acting as vectors to DNA sequence transfer between reproductively isolated species becomes an interesting focal point for investigations. In the absence of experimental evidence, a number of likely vectors has been considered. The list includes viruses, mycoplasmas, fungi, and small arthropods (Miller and Miller 1982, Syvanem 1987, Kidwell 1992, Heath et al. 1999, Yoshiama et al. 2001, Silva et al. 2004).

Mites like *Proctolaelaps regalis* associated to a strain of the *P* element present in *D. melanogaster* have been shown to have *P* element sequences (Houck et al. 1991). In its feeding habits, the mites seem to emulate the microinjection method used by several researchers on *Drosophila* to promote the intra- and interspecies gene transfer mediated by the *P* element. The most common transfer mechanism seems to be based on the mechanical vector, though the possibilities for *Drosophila* DNA insertion into the mite's genome or the secondary involvement of viruses or bacteria cannot be ruled out.

Parasitoid wasps (Hymenoptera) are probably one of the most diverse groups of insects, and their occurrence in a variety of habitats indicates that they take several different ecological niches (Quicke 1997).

Analyzing a region containing the domain of inverse transcriptase in nine different species, MacAllister and Werren (1997) investigated the phylogenetic pattern of the NATE retroelement (NAsonia Transposable Element) present in the genomes of parasitoid wasps of the Pteromalidae family. NATE is a member of the

gypsy/Ty3 group of LTR-retrotransposons (MacAllister 1995). The authors observed pattern consistency with the vertical conservation of the element throughout the divergence process in Pteromalidae. In turn, in a study the parasitoid wasp *Ascogaster reticulatus* and in the host moth *Adoxophyes honmai*, Yoshiama et al. (2001) characterized MLEs (*mariner*-like elements) and obtained 97.6% identity in the DNA sequence. This high similarity and the lack of MLEs in another wasp of the same genus suggest that the elements were horizontally transferred not long ago, most likely from host to parasitoid.

The characterization of TEs in drosophilids, mites and parasitoids from recently collected assemblages shows great promise in the establishment of some cause-and-effect relationships between genetic diversity and richness in TEs. In the light of the close association of parasitoids emerging from *Drosophila* pupae with the fly species group, of the high frequency at which they are detected, and the ecological opportunity of host-parasitoid horizontal transfer mediated by secondary vectors, we have decided to include these parasitoids, side by side with mites collected from fruit, in a study to evaluate the presence of TEs, whether found isolated or shared between species. Therefore, this study resorted to the PCR and southern blot approaches to investigate homologous sequences to the *P* and *gypsy* elements of *Drosophila* present in the genomes of parasitic mites and parasitoid wasps reared in laboratory, from samples collected in the natural environment in association with *Drosophila* species.

MATERIALS AND METHODS

COLLECTS AND IDENTIFICATION

Drosophilid flies and their microhymenopteran parasitoids were collected from four places in Porto Alegre city (30°02'S-51°14'W): Farroupilha Park, Botanical Garden, Gabriel Knijnik Park and Itapuã Park. The sampling methods employed were: (i) adult microhymenopterans were netted as they were flying over rotten fruits (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassmann (Arecaceae) and *Butia*

eriospatha Becc. (Arecaceae), and (ii) pre-adult stages were collected from field fermenting fruits and kept in bottles containing vermiculite and kept in the laboratory with controlled temperature and humidity ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% r.h.).

The parasitoids collected were deposited in plastic vials containing ethanol 70% for ulterior identification using dichotomic keys. The mites collected in the natural environment were rigorously controlled to avoid contamination to *Drosophila* stocks kept in the laboratory (The plastic vials used as rearing containers were kept isolated in metal trays filled with a 2-cm layer of water and detergent).

For preliminary characterization, the mite species kept in laboratory were retrieved from the fly growth medium using a fine-tip paintbrush soaked in ethanol 70% and examined under a magnifying glass. Then, mites were transferred to a Petri dish containing ethanol 70% to sort the different species out, for subsequent DNA extraction. Specimens ranked under specific taxa were stored in separate microcentrifuge tubes and frozen upon obtaining the minimum amount for proper DNA extraction.

For identification, mites were then collected using a fine-tip paintbrush, sorted in ethanol 70% for subsequent mounting on Hoyer's medium (Jeppson *et al.*, 1975) and microscopic characterization using the Krantz's keys (1970). Slides were mounted and kept in a stove at $50\text{-}60^\circ\text{C}$ for around 10 days for specimen fixation, distension and clarification, and to dry the medium. Next, cover slips were sealed using conventional luting agent, as commonly adopted in cytological investigations.

DNA EXTRACTION

The control strain used was *Drosophila melanogaster* Harwich (positive control for the presence of transposable elements *P* and *gypsy*). DNA of flies was extracted as described in Sassi *et al.* (2005).

The DNA of mites and of microhymenopterans was extracted in accordance with two protocols previously tested. The first protocol was an

adaptation of the Loxdale protocol (1998). Several collections of microhymenopterans were needed before a minimum number of individuals was obtained for each species. When such number was secured, approximately 20 individuals were macerated in liquid nitrogen in a 1.5-mL microcentrifuge tube. The homogenate thus obtained was incubated at 55°C for roughly 14 h in lysis buffer (100 mM Tris HCl; 100 mM EDTA; SDS 1%; 60 mM NaCl) and 0.11 µg/µL K proteinase. Next, the mixture was treated with 0.013 µg/µL RNase at 37°C for 1 h. DNA was mixed with 7,5 M ammonium acetate, precipitated with 1 vol absolute isopropanol, and resuspended in 20 µL ultrapure water.

In the second protocol, mite DNA was extracted as described for the Dneasy™ Tissue Kit (Qiagen™), with proved efficiency to treat small samples. DNA quantification was conducted in agarose gel 0.8% stained with ethidium bromide, using a lambda phage DNA as molecular weight marker.

PCR ASSAYS

P ELEMENT

Two primers pairs were used. The first pair was retrieved from the map of pπ25.1 in O'Hare and Rubin (1983), which amplifies a 553-bp sequence on the third intron of *P* element: P1 5' TGCTTCGCTTGATGGCTT 3' and P2 5' CAACTCATCCATTCGGT 3'. The second pair of primers was the same as used in Carareto et al. (1996), which amplify a 960-bp fragment and anneal at the region located between the first and the second exons of *P* element: P (843) 5' CCTAATGGACAGTGATGG 3' and P (1766) 5' ACGAAGCGAACTACCGAA 3' (Fig. 1a).

Approximately 20 ng DNA was used in the 15 µL final reaction containing 1U Taq polymerase (Invitrogen), 1X buffer provided by the manufacturer, 400 µM each nucleotide, 20 pmol each primer, and 2 mM MgCl₂. The amplification conditions were defined as: 35 cycles at 94°C for 30 s; 54°C for 30 s; and 72°C for

90 s, followed by an extension cycle at 72°C for 5 min.

GYPSY RETROELEMENT

Two pairs of degenerate primers were used, based on GenBank (NCBI) *gypsy* sequences alignments for *D. melanogaster* (GenBank M12927), *D. virilis* (GenBank M38438) and *D. subobscura* (GenBank X72390) and using the *D. melanogaster* sequence as reference, as described in Herédia et al. (2007). The first pair of primers was: GYP1S (sense) GAGTTTGCAGGTGGARGCRCC and GYP1AS (antisense) GCRAACARGCTTCTCTCWATGCTWGC, which correspond to the ORF1 1313-1333 and 1869-1893 regions, respectively, and amplify a fragment with 580-bp. The second pair of primers was: GYP3S2 (sense) AAAGGCGAYTTGGTTGACACTCC and GYP3AS2 (antisense) CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG, which correspond to the ORF3 6026-6048 and 6491-6511, respectively, and amplify a fragment with 485-bp (Fig. 1b).

PCR was performed under the following conditions: approximately 20 ng DNA to a final reaction volume of 15 µL, 1U Taq polymerase (Invitrogen), 1X buffer provided by the manufacturer, 400 µM each nucleotide, 20 pmol each primer, and 1.5 mM MgCl₂. Amplification conditions for all reactions were: 96°C for 2 min followed by 35 cycles at 96°C for 15 s; 55°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final extension cycle at 72°C for 5 min.

PCR CONTROLS

All DNA samples were analyzed using a PCR protocol with primers that amplify the rRNA 18S gene, design for conserved regions of *Drosophila melanogaster* and *Mus musculus*: 18S1 5'ATTGACGGAAGGGCACCA 3' and 18S2 5'AGCGACGGGCGGTGTGTA 3'. This primers amplify a 591-bp fragment of the *Drosophila melanogaster* genomic DNA.

This amplification aimed to use an internal control sequence of the genomic DNA used to amplify the transposable elements, which may not be present in the genome.

Only the DNA samples that amplified fragments of expected size were used in the subsequent PCR reactions.

PCR was performed under the following conditions: approximately 30 ng DNA to a final reaction volume of 25 μ L, 1U Taq polymerase (Invitrogen), 1X buffer provided by the manufacturer, 400 μ M each nucleotide, 10 pmol each primer, and 2 mM $MgCl_2$. Amplification conditions for reactions were: 94°C for 5 min followed by 35 cycles at 94°C for 60 s; 55°C for 60 s, 72°C for 75 s, and a final extension cycle at 72°C for 5 min.

SOUTHERN BLOT

The *gypsy* retroelement probes were produced by the amplification of the pairs of primers GYP1S - GYP1AS and GYP3S2 - GYP3AS2 from the pGGHS plasmid containing the complete *gypsy* retroelement isolated from the *D. melanogaster* genome (Dorsett et al. 1989). For the *P* element, probes were generated using the pairs of primers P1 - P2 and P843 - P1776, which amplify the *P* element from the p π 25.1 plasmid (O'Hare and Rubin 1983). The amplification products were separated in agarose gel 1 % and the expected fragment for each element isolated and retrieved using a sterile scalper. Next, the fragment was purified in a column containing GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GEHealthcare).

The PCR reaction products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels and transferred to nylon membranes (HybondN+/ GEHealthcare) and hybridized as defined in the Gene Images™ kit (GEHealthcare). Membranes were hybridized to a random primer-labeled probe at 60°C in a mixture of 0.1% SDS, 5% dextran sulphate, and blocking fluid diluted 20 X in 5 X SSC for approximately 16 h. Each membrane was washed twice at 60°C, first with 1 X SSC and 0.1% SDS, and after with 0.5 X SSC and 0.1% SDS, under agitation, for 15 min

each rinse. For detection, the non-radioactive CPD-Star method (GEHealthcare) was used.

RESULTS

The specimens characterized in the present study are presented in Table 1.

As regards the mites that commonly exist in our laboratory, one extra mite belonging to the *Rhyzoglyphus* genus was identified in a parasitic relationship with *Drosophila* cultures during the experiments. As for the mites collected in the Botanic Garden apart from those kept in laboratory, which include representatives of the *Proctolaelaps*, *Tyrophagus*, and *Histiostoma* genera, other specimens belonging to the *Ceratozetoidea* superfamily (oribatids) and to the *Macrocheles* genus were also characterized.

Except for oribatids, which are mainly found in organic matter decomposing on forest ground (Flechtmann 1960), all other mites, including *Macrocheles muscaedomesticae*, have previously been found predated drosophilids (Carton et al. 1986).

The parasitoid Microhymenoptera identified in our collections belong to four superfamilies: Cynipoidea, Chalcidoidea, Proctotrupoidea and Ichneumonoidea.

P ELEMENT

The genomic DNAs of the organisms used in the present study underwent PCR amplification first with pairs of primers P1 and P2, which amplify a 553-bp sequence on the third intron region of the *P* element. The reactions were tested at different conditions, and more stringent reaction conditions were chosen for the second analysis, so as to afford greater reliability to data.

The expected amplification product, a roughly 553-bp-long fragment, was obtained for 8 of the 11 entities – mites and parasitoids - analyzed. In order to confirm whether the amplification product corresponded to a sequence homologous to the *P* element sequence in *Drosophila melanogaster*, the PCR products obtained were analyzed by *southern blot* (Fig. 3a). The *P* element sequence purified from the amplification product of these primers modeled after the pπ25.1 plasmid was used as hybridization probe.

As shown in Fig. 3a, the amplification products of samples that showed hybridization signals presented variations in intensity of hybridization signals (obtained by the difference in amounts of DNA). For mite DNAs, longer autoradiography exposure times were needed to obtain signals for the hybridized fragments (data not shown). As for microhymenopterans DNAs, short exposure times afforded to visualize the hybridization signals, though signal intensity varied between the different entities.

Sequences homologous to the *P* element were detected in the genomes of two mites (*Proctolaelaps* sp. and *Macrocheles muscaedomesticae*) and of three microhymenopterans studied (Cynipoidea, Ichneumonoidea, Chalcidoidea). Nevertheless, different hybridization patterns were observed for the intensity of the signal obtained, generally weak when compared to the control (*Drosophila melanogaster*). Apart from the expected 553-bp fragment, smaller fragments were also detected, probably the representatives of internally deleted copies (incomplete or defective elements).

Samples number 7 (Proctotrupoidea, Botanical Garden) and 9 (Cynipoidea, Gabriel Knijnik Park) did not present hybridization signal, even at longer exposure times in the autoradiograph (Fig. 3a and Table 2).

When the pair of primers that anneal in the region between the first and second exons of the *P* element was used, which resulted in a 960-bp fragment, the hybridization pattern obtained showed more variation in comparison to the pattern obtained with the first pair of primers (Fig. 2b).

Apart from the bands representing the fragments of expected size (960 bp),

other fragments representing sequences homologous to the *D. melanogaster* *P* element were detected. Yet, these fragments were differently sized (larger or shorter) as compared to expected band sizes.

Samples number 7 (Proctotrupoidea, Botanical Garden) and 9 (Chalcidoidea, Farroupilha Park) did not present hybridization signal, even at longer exposure times in the autoradiograph (Fig. 3b and Table 2).

GYPSY RETROELEMENT

The PCR and southern blot analyses with primers GY1S and GY1AS revealed sequences homologous to the *gypsy* retroelement in *D. melanogaster* present in the genomes of mites and microhymenopterans. Once again, two mites and six microhymenopterans presented the expected fragment size of 580 bp (Fig. 4a). Yet, apart from the band of expected size, smaller fragments were also visualized. These fragments probably correspond to internally deleted elements. Again, longer exposure times were needed to obtain an hybridization signal in the genome of the mites and some microhymenopterans investigated (data not shown). Samples number 3, 7, 9 and 10, corresponding to members of the Histiostomidae, Ichneumonoidea and Chalcidoidea families, did not produce hybridization signals, even after longer exposure times (Fig. 4a and Table 2).

The results for the second pair of primers used, GY3S2 and GY3AS2, which amplify a 485-bp fragment in the *D. melanogaster* genome, are shown in Figure 3B. Only samples 6 and 8 (Fig. 4b and Table 2), which correspond to the Proctotrupoidea and Chalcidoidea families, did not present hybridization signals, even after longer exposure times. The other samples presented signals of different intensity, though the fragments were of size similar to the expected for sequences homologous to *gypsy* of *D. melanogaster*.

Table 2 summarizes the results obtained for the presence or absence of hybridization signals of the *P* and *gypsy* elements in the genomes of mites and microhymenopterans investigated in the present study.

DISCUSSION

Considering each pair of primers separately or together, the amplification of sequences homologous to the *P* element of *D. melanogaster* in 10 of the 11 samples tested shows promising significance.

Among the laboratory mites studied, the *P* element was detected only in *Proctolaelaps* sp., which belongs to the same genus as *Proctolaelaps regalis*, studied by Houck et al. (1991). Yet, the *P* element was not detected in the samples of *Tyrophagus* sp., *Histiostoma* sp., or *Rhyzoglyphus* sp., all of which are associated to drosophilids (Ashburner et al. 1989). In a previous study by Carareto et al. (1996), *P* signals were observed with primers P1 and P2 also in *Tyrophagus putrescentiae* and in one member of the Histiostomidae family. The negative hybridization signal observed in organisms listed in our study may be due to the fact that we investigated other species of *Tyrophagus* or other species and genus of Histiostomidae.

The occurrence of sequences homologous to *P* in the genome of *Macrocheles muscaedomesticae* collected in the natural environment is the first record of this type of association. *M. muscaedomesticae* had been found predated drosophilids in the field (Máca 1972, 1982), an environment in which the species distribution is far-reaching. *M. muscaedomesticae* distribution has been associated also to that of houseflies.

P sequences were discovered in species that do not belong to the *Drosophila* genus, like *Musca domestica* (Lee et al. 1999), which suggests that this TE distributes more widely than initially thought. The fact that this mite predates both houseflies and *Drosophila* is intriguing, and lays the foundations to new studies involving the isolation and sequencing of amplification products and comparing the *P* sequences of *Musca domestica*, *Drosophila* and of associated mites.

As for microhymenopterans, only the specimens pertaining to the Proctotrupoidea superfamily do not seem to have sequences homologous to *P* in their genomes. The other taxa analyzed seem to have the sequence, as shown by

the use of both or of at least one of the primers. Thus, based on the data obtained in the present study, we put forward the hypothesis of sequences homologous to *P* element present in the genomes of microhymenopterans. At a later stage, the isolation and analysis of these sequences will allow to assess the homology between genomes of microhymenopterans and genomes of different *Drosophila* species.

To our knowledge, the present study was the first to detect sequences homologous to the *gypsy* element from *D. melanogaster* in the genomes of both *Macrocheles muscaedomesticae* and *Proctolaelaps* sp., with the use of the two pairs of primers.

On the other hand, the fact that no hybridization signal was obtained for *gypsy* in mites of the *Tyrophagus* genus and of the Histiostomidae may be ascribed to its actual absence in the genome, or to stochastic loss.

The presence of *gypsy* in the genomes of seven of the eight microhymenopterans analyzed reinforces the idea of the wide distribution of this retroelement between invertebrates (reviews in Stacey et al. 1986, Alberola et al. 1997, Loreto et al. 1998, Herédia et al. 2004, 2007). It is important to emphasize that the genome structure of the *gypsy* retroelement is similar to the pro-viral form of vertebrate retroviruses; therefore, *gypsy* exhibits infective properties under some specific environmental conditions (Kim et al. 1994, Bucheton 1995, Péliesson et al. 1997, Lerat and Capy 1999). It is thus that, at least in theory, *gypsy* may insert within the hosts' genomes without vectors, as suggested by Boeke and Stoye (1997) and by Mejlumian et al. (2002). This observation could explain the wide distribution of the retroelement in invertebrates.

In the light of the relationship between parasitoid microhymenopterans, which develop in tissues and within the pupae of *Drosophila*, and their hosts, it is possible that the *gypsy* element is acquired in these media.

Assuming that geographic, chronological and ecological overlapping is the minimum requirement for horizontal transfer of a mobile sequence between donor and receptor species, the experimental conditions adopted in the present

study fully meet this hypothesis. Actually, the intrinsic relationship between the members of these assemblages of flies, fruit, larvae, mites and microhymenopterans becomes clear as early as specimen collection in the field. Even though these associations may not have been so intense at other times and places, it is perfectly possible that these prerequisites have been met under environmental conditions that differ from the extant ones.

Considering the *P* element, the physical proximity of donor to receptor is also a prerequisite for horizontal transfer events. Nevertheless, the presence of a vector takes a more critical outlook; hence the need for identifying the likely vectors that transport DNA sequences between reproductively isolated species. Some authors have pointed to viruses, mycoplasmas, bacteria, protozoa, fungi and small arthropods (as microhymenopterans) as likely vectors (Silva et al. 2004). Yet, no cogent evidence of the mechanism through which the phenomenon occurs.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Msc. Marco Gottchalk from Programa de Pós Graduação em Biologia Animal-UFRGS for helping in the identification of microhymenopteran specimens and Msc. Norma M. da Silva for some collects. This research was supported by grants and fellowships from CNPq, FAPERGS and Propesq-UFRGS.

REFERENCES

Alberola TM, De Frutos R (1996) Molecular structure of a *gypsy* element of *Drosophila subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res* 24: 914-923.

Alberola TM, Bori L, De Frutos R (1997) Structural analysis of *Drosophila subobscura* *gypsy* elements (*gypsyDs*). *Genetica* 100: 39-48.

Ashburner M (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press, New York.

Bayev Jr AA, Lyubomirskaya NV, Dzhumagaliev EB, Ananiev EV, Amiantova IG, Ilyin YV (1984) Structural organization of transposable element mdg4 from *Drosophila melanogaster* and a nucleotide sequence of its long terminal repeats. *Nucleic Acids Res* 12: 3707-3723.

Boeke JD, Stoye JP (1997) Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH e Varmus HE (eds) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 343-435.

Bucheton A (1995) The relationship between the flamenco gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *Trends Genet* 11(9):349-53.

Carareto CMA, Loreto ELS, Feres RF, Valente VLS (1996) Evidences of *P* elements in genomic DNA of mites coming from natural populations. *Revista Brasileira de Genética* 19(3) (supl.): 342.

Carton Y, Boulétreau M, Van alphen JMM, Van lenteren JC (1986) The *Drosophila* Parasitic Wasps. In: *The Genetics & Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds). Academic Press, New York 3e: 347-394.

Castro JP, Carareto CMA (2004) *P* elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. *Mol Phylogenet Evol* 32: 383–387.

Daniels SB, Peterson KR, Strausbaugh LD, Kidwell MG, Chovnick A (1990) Evidence for horizontal transmission of the *P* element between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339-355.

Dorsett D, Viglianti GA, Rutledge BJ, Meselson M (1989) Alteration of *hsp82* gene expression by the *gypsy* transposon and suppressor genes in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 3: 454-468.

Flechtmann CHW (1960) *Elementos de acarologia*. Livraria Nobel.

Hagemann S, Pinsker W (2001) *Drosophila P* transposons in the human genome? *Mol Biol Evol* 18(10): 1979-1982.

Heath BD, Butcher RDJ, Whitfield WGF, Hubbard SF (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr Biol* 9: 313-316.

Herédia F, Loreto ELS, Valente VLS (2004) Complex evolution of *gypsy* in Drosophilid species. *Mol Biol Evol* 21:1831-1842.

Herédia F, Loreto ELS, Valente VLS (2007) Distribution and conservation of the transposable element *gypsy* in drosophilid species. *Genet Mol Biol* 30 (1): 133-138.

Houck MA, Clark JB, Peterson KR, Kidwell MG (1991) Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* 253: 1125-1128.

Jeppson LR, Keifer HH, Baker EW (1975) *Mites injurious to economic plants*.

University California Press, Berkeley.

Kidwell MG (1992) Horizontal transfer of *P* elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica* 86: 275-286.

Kidwell MG, Lisch DR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution Int J Org Evolution* 55: 1-24.

Kim A, Terzian C, Santamaria P, Pélisson A, Prud'homme N, Bucheton A (1994) Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1285-1289.

Krantz GW (1970) A manual of Acarology. Oregon Estate University Book Stores, EUA.

Lee SH, Clark JB, Kidwell MG (1999) A *P* element-homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. Insect Mol Biol 8(4): 491-500.

Lerat E, Capy P (1999) Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. Mol Biol Evol 16: 1198-1207.

Loreto EL, Da Silva LB, Zaha A, Valente VL (1998) Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. Genetica 101: 153-165.

Loreto EL, Valente VL, Zaha A, Silva JC, Kidwell MG (2001) *Drosophila mediopunctata* *P* elements: a new example of horizontal transfer. J Hered 92: 375-381.

Loxdale HD, Lushai G (1998) Molecular markers in entomology. Bull Entomol Res 88: 577-600.

Máca J (1972) Czechoslovak species of genus *Scaptomyza* Hardy (Diptera, Drosophilidae) and their bionomies. Acta Entomologica Bohemoslovaca 69: 119-132.

Máca J (1982) Parasitizing and transported macroorganisms dependent on Drosophilidae (Diptera) in Czechoslovakia. Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Purkynianae Brunensis (Biologia 74) XXIII: 69-74.

MacAllister BF (1995) Isolation and characterization of a retroelement from a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Insect Mol Biol 4: 253-262.

MacAllister BF, Werren JH (1997) Phylogenetic analysis of a retrotransposon with implications for strong evolutionary constraints on reverse transcriptase. *Mol Biol Evol* 14(1): 69-80.

Marín I, Lhoréns C (2000) *Ty31 Gypsy* retrotransposons: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. *Mol Biol Evol* 17: 1040-1049.

Mejлумian L, Péliссon A, Bucheton A, Terzian C (2002) Comparative and functional studies of *Drosophila* species invasion by the *gypsy* endogenous retrovirus. *Genetics* 160(1): 201-209.

Miller K, Lynch C, Martin J, Herniou E, Tristem M (1999) Identification of multiple *gypsy* LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. *J Mol Evol* 49: 358-366.

Miller DW, Miller LK (1982) A virus mutant with an insertion of a *copia*-like transposable element. *Nature* 299, 562-564.

O'Hare K, Rubin GM (1983) Structure of *P* transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* 34: 25-35.

Oliveira De Carvalho M, Silva JC, Loreto EL (2004) Analyses of *P*-like transposable element sequences from the genome of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 13(1):55-63.

Péliссon A, Teyssset L, Chalvet F, Kim A, Prud'homme N, Terzian C, Bucheton A (1997) About the origin of retroviruses and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus with the *Drosophila flamenco* host gene. *Genetica* 100: 29-37.

Perkins HD, Howells AJ (1992) Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10753-10757.

Quicke DLJ (1997) Parasitic wasps. New York: Chapman & Hall.

Sassi AK, Heredia F, Loreto ELS, Valente VLS, Rohde C (2005) Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genet Mol Biol* 28:734-739.

Silva JC, Loreto EL, Clark JB (2004) Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. *Curr Issues Mol Biol* 6: 57-71.

Spassky BS, Richmond RC, Pérez-Salas S (1971) Geography of sibling species related to *D. willistoni* and semi-species of the *D. paulistorum* complex. *Evolution* 25: 129-143.

Stacey SN, Lansman RA, Brock HW, Grigliatti TA (1986) Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 3: 522-534.

Syvanen M (1987) Molecular clocks and evolutionary relationships: possible distortions due to horizontal gene flow. *J Mol Evol* 26: 16-23.

Vázquez-Manrique RP, Hernández M, Martínez-Sebastián MJ, De Frutos R (2000) Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. *Mol Biol Evol* 17: 1185-1193.

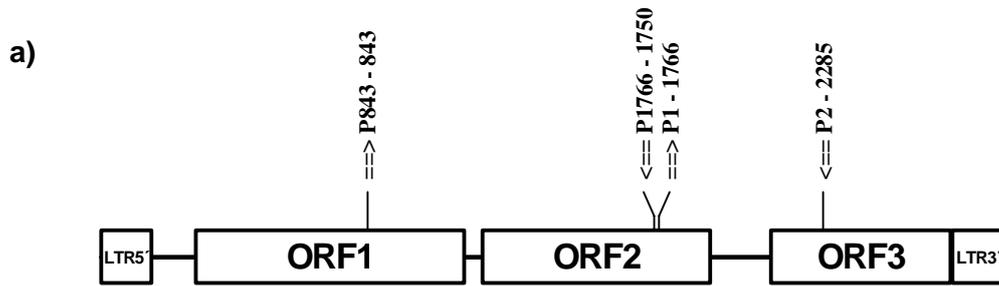
Yoshiyama M, Tu Z, Kainoh Y, Honda H, Shono T, Kimura K (2001) Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. *Mol Biol Evol* 18(10): 1952-1958.

Table 1. Specimens characterized in the present study and collecting places.

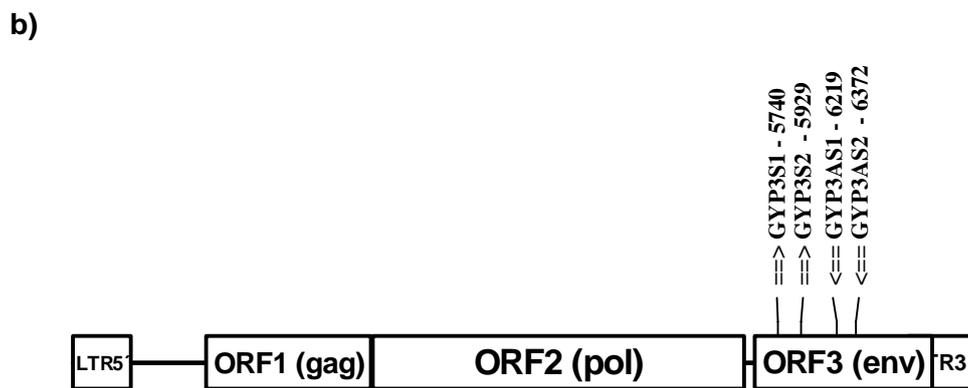
Collecting Place	Organism	Identification
Botanical Garden	Mite	<i>Macrocheles muscaedomesticae</i>
Botanical Garden	Mite	Oribatidae
Laboratory	Mite	<i>Proctolaelaps sp.</i>
Laboratory	Mite	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
Laboratory	Mite	<i>Histiostoma sp.</i>
Laboratory	Mite	<i>Rhyzoglyphus sp.</i>
Botanical Garden	Wasp	Cynipoidea
Botanical Garden	Wasp	Ichneumonoidea
Botanical Garden	Wasp	Proctotrupeoidea
Farroupilha Park	Wasp	Cynipoidea
Farroupilha Park	Wasp	Chalcidoidea
Gabriel Knijnik Park	Wasp	Cynipoidea
Gabriel Knijnik Park	Wasp	Ichneumonoidea
Itapuã Park	Wasp	Cynipoidea

Table 2. Hybridization signals (Presence: +, Absence: -) of homologous sequences to *P* and *gypsy* elements respect to the different primers used.

Collecting site	Organism	P1/P2	P843/ P1776	GYP1S/ GYP1AS	GYP3S2/ GYP3AS2
Botanical Garden	<i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	+	+	+	+
Laboratory	<i>Proctolaelaps sp.</i>	+	+	+	+
Laboratory	<i>Histiostoma sp.</i>	-	-	-	-
Botanical Garden	Cynipoidea	+	+	+	+
Botanical Garden	Ichneumonoidea	+	+	-	+
Botanical Garden	Proctotrupoidea	-	-	+	-
Farroupilha Park	Cynipoidea	+	+	+	+
Farroupilha Park	Chalcidoidea	+	-	-	-
Gabriel Knijnik Park	Cynipoidea	-	+	+	+
Gabriel Knijnik Park	Ichneumonoidea	+	+	+	+
Itapuã Park	Cynipoidea	+	+	+	+



P D. melanogaster
2859 bp



GYPY D. melanogaster
7348 bp

Figure 1. The molecular structure of a) the *P* transposon b) the *gypsy* retrotransposon. Arrows indicate the location of the *primer* alignments.

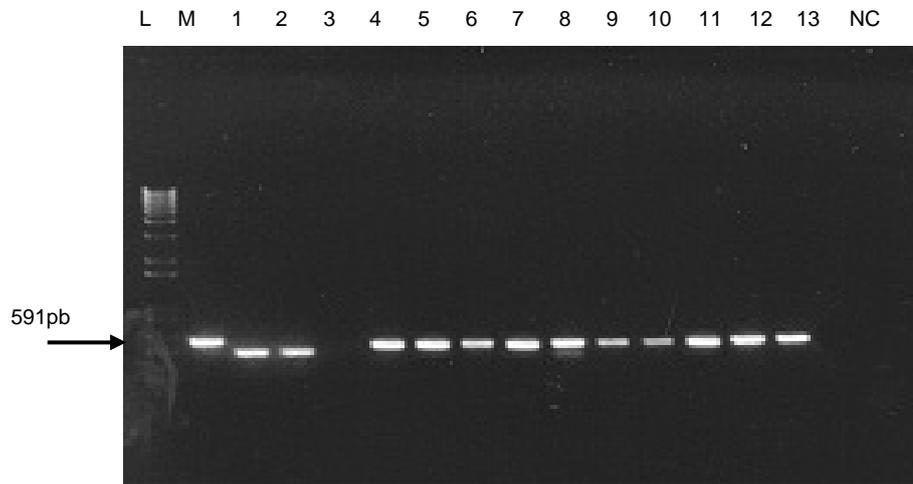
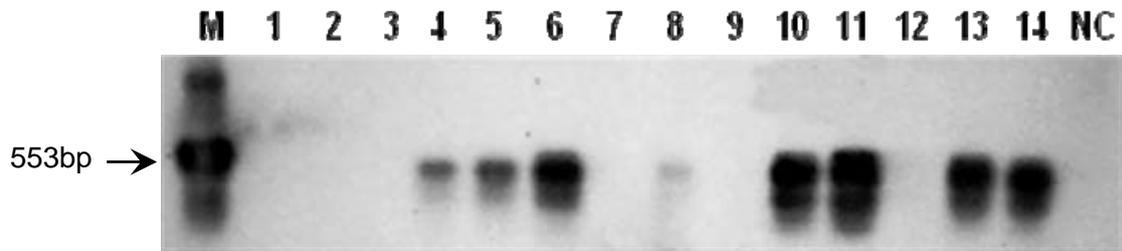


Figure 2. PCR amplification of a approximately 591bp fragment amplified by rRNA 18S *primers* from specimens studied.

L) Molecular marker 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen); M) *Drosophila melanogaster*-positive control; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea (Botanical Garden); 5) Cynipoidea (Botanical Garden); 6) Proctotrupoidea (Botanical Garden); 7) Ichneumonoidea (Botanical Garden); 8) Cynipoidea (Farroupilha Park); 9) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 10) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 11) Cynipoidea (Gabriel Knijnik Park); 12) Ichneumonoidea (Gabriel Knijnik Park); 13) Cynipoidea (Itapuã Park); NC) Negative Control.

Arrow indicates the fragment expected for *D. melanogaster*.

a)



b)

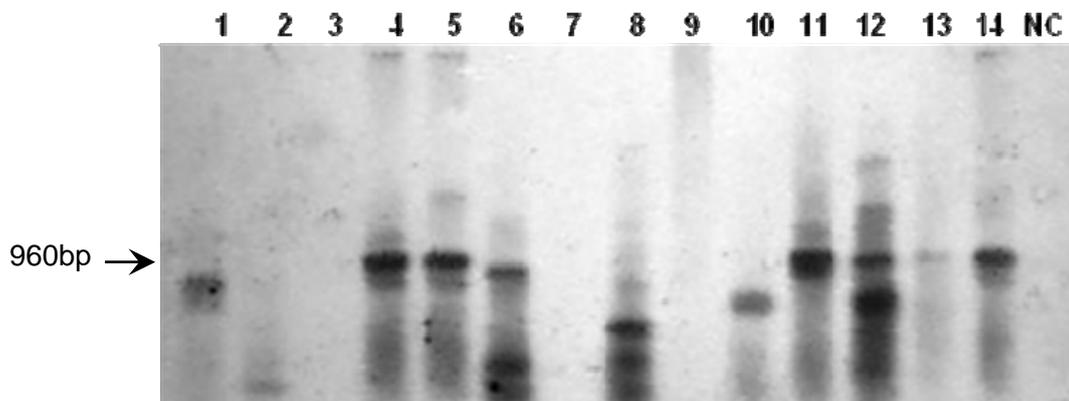


Figure 3. *Southern blot* of amplification products.

a) Probe: the 553-pb fragment amplified from the P π 25.1 plasmids by primers P1 and P2.

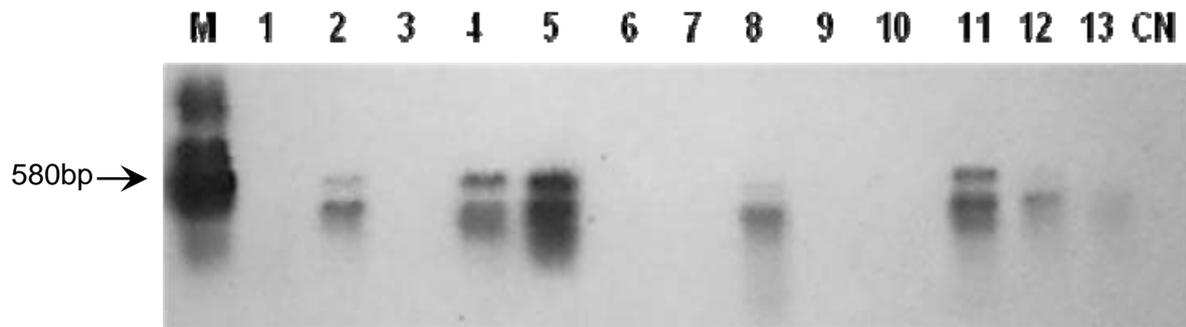
M) *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea (Botanical Garden); 5) Cynipoidea (Botanical Garden); 6) Ichneumonoidea (Botanical Garden); 7) Proctotrupoidea (Botanical Garden); 8) Cynipoidea (Farroupilha Park); 9) Cynipoidea (Gabriel Knijnik Park); 10) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 11) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 12) Ichneumonoidea (Gabriel Knijnik Park); 13) Cynipoidea (Itapuã Park); 14) Cynipoidea (Itapuã Park); NC) Negative control.

b) Probe: the 960-pb fragment amplified from the P π 25.1 plasmid by primers P843 and P1776.

1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea (Botanical Garden); 5) Cynipoidea (Botanical Garden); 6) Cynipoidea (Botanical Garden); 7) Proctotrupoidea (Botanical Garden); 8) Ichneumonoidea (Botanical Garden); 9) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 10) Cynipoidea (Farroupilha Park); 11) Cynipoidea (Farroupilha Park); 12) Cynipoidea (Gabriel Knijnik Park); 13) Ichneumonoidea (Gabriel Knijnik Park); 14) Cynipoidea (Itapuã Park); NC) Negative control.

Arrow indicates the fragment expected for *D. melanogaster*. All banding patterns were checked and confirmed using different exposure times.

a)



b)

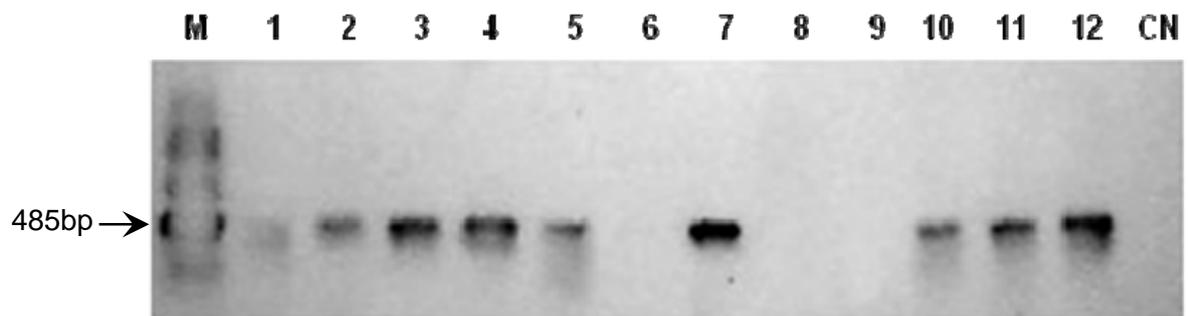


Figure 4. *Southern blot* of amplification products.

a) Probe: the 580-pb fragment amplified from the pGGHS plasmid by primers GY1S and GY1AS.

M) *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Histiostomidae; 4) Cynipoidea (Botanical Garden); 5) Cynipoidea (Botanical Garden); 6) Proctotrupoidea (Botanical Garden); 7) Ichneumonoidea (Botanical Garden); 8) Cynipoidea (Farroupilha Park); 9) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 10) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 11) Cynipoidea (Gabriel Knijnik Park); 12) Ichneumonoidea (Gabriel Knijnik Park); 13) Cynipoidea (Itapuã Park); NC) Negative control.

b) Probe: the 485-pb fragment amplified from the pGGHS plasmid by primers GY3S2 and GY3AS2.

M) *Drosophila melanogaster*; 1) *Macrocheles muscaedomesticae*; 2) *Proctolaelaps sp.*; 3) Cynipoidea (Botanical Garden); 4) Cynipoidea 2 (Botanical Garden); 5) Ichneumonoidea (Botanical Garden); 6) Proctotrupoidea (Botanical Garden); 7) Cynipoidea (Farroupilha Park); 8) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 9) Chalcidoidea (Farroupilha Park); 10) Cynipoidea (Gabriel Knijnik Park); 11) Ichneumonoidea (Gabriel Knijnik Park); 12) Cynipoidea (Itapuã Park); NC) Negative control.

Arrow indicates the fragment expected for *D. melanogaster*. All banding patterns were checked and confirmed using different exposure times.

Seqüências com homologia aos elementos *P* e *gypsy* em *Ganaspis* *sp.* e Diapriidae, vespas parasitóides de *Drosophila*.

Adriana Koslovski Sassi^a, Andrés Delgado Cañedo^b e Vera Lucia da Silva Valente^a.

^a Laboratório de *Drosophila*, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^b Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia do Rio Grande do Sul

Artigo em preparação para ser enviado à revista *Insect Molecular Biology*.

RESUMO

A transferência horizontal de elementos transponíveis é hoje um fenômeno bem demonstrado, embora não se tenha ainda uma idéia precisa de sua freqüência na natureza e nem dos possíveis vetores envolvidos. Apesar de existirem na literatura alguns trabalhos que sugerem a associação de elementos transponíveis entre parasitas e seus hospedeiros, estes estudos ainda são poucos e incipientes.

O presente trabalho buscou contribuir para o entendimento da possível relação dos parasitas e parasitóides com seus hospedeiros e seu possível papel como vetores de elementos transponíveis.

Nós reportamos aqui o isolamento de seqüências mostrando homologia aos elementos transponíveis *P* e *gypsy* de *Drosophila melanogaster* no genoma de vespas parasitóides de *Drosophila*. Nós mostramos que vespas parasitóides e seu hospedeiro, *Drosophila melanogaster*, possuem elementos *P* e *gypsy* que compartilham de 100% e 99%, respectivamente, de identidade nas seqüências nucleotídicas analisadas.

Considerando um elemento pertencente a cada classe (I e II), em um parasitóide larval (*Gnaspis sp.*) e um pupal (Diapriidae), nossos resultados ampliam o conhecimento sobre a vasta distribuição destes elementos entre os organismos, principalmente trazendo novos dados sobre estes TEs em associações hospedeiro-parasitóide.

INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis (TEs), foram encontrados em todos os genomas onde eles foram procurados (Capy, 2005). Sua ubiquidade levanta uma série de questões sobre a natureza do relacionamento entre TEs e os seus hospedeiros e o significado e consequências a longo prazo destes elementos na evolução dos genomas hospedeiros.

Embora o conceito de TEs como parasitas moleculares tem sido útil para a compreensão da natureza das relações hospedeiro-elemento, esta abordagem tem que ser ampliada para considerar uma possível continuidade das interações entre os elementos transponíveis e os seus hospedeiros, variando de parasitismo em um extremo, a mutualismo ou simbiose a outro (Kidwell & Lisch, 2000, 2001).

TEs podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com o intermediário envolvido no seu mecanismo de transposição (Finnegan, 1989): 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 divididos em dois grandes grupos (subclasses) com base na sua organização geral: retrotransposons com LTRs (que são estruturalmente similares a retrovírus) e retrotransposons sem LTRs. Estes elementos são amplamente distribuídos nos genomas de 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 (Capy *et al.*, 1998; Wicker *et al.*, 2007). Possuem repetições terminais invertidas (ITRs) de 10 a 500 pb de tamanho, flanqueando uma região central que codifica uma enzima transposase que catalisa a transposição. Têm sido encontrados tanto em procariotos como em eucariotos. Exemplos de TEs desta categoria em *Drosophila* são *mariner*, *hobo* e *P*.

O elemento transponível *P* foi caracterizado primeiramente em *Drosophila melanogaster* (O'Hare & Rubin, 1983), onde foi denominado canônico. Possui 2,9 kb de comprimento e contém quatro exons, que codificam uma transposase de 87 kDa (Rio & Rubin, 1986) e uma proteína repressora de 66 kDa (Robertson & Engels, 1989).

Dados experimentais demonstraram que o elemento transponível *P* invadiu o genoma de *D. melanogaster* na década de 1950 após transferência horizontal de uma espécie filogeneticamente distante (50 milhões de anos), *Drosophila willistoni* (Daniels *et al.*, 1990). Seqüências homólogas ao elemento *P* também foram detectados em outros Diptera, como *Musca domestica* (Lee *et al.*, 1999) e *Lucilia cuprina* (família Calliphoridae) (Perkins & Howells, 1992), além de outros insetos como *Anopheles sp.* (Sarkar *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004).

O retroelemento *gypsy* (também conhecido como *mdg4*) foi pela primeira vez descrito em *Drosophila melanogaster* como uma seqüência de 7,5 kb com repetições terminais longas (LTRs) de 482 pb (Bayev *et al.*, 1984). O retrotransposon *gypsy* tem três fases abertas de leitura (ORFs) denominadas gag, pol e env, codificando proteínas responsáveis pela sua replicação e infecciosidade. Esta e outras características fazem com que o retrotransposon *gypsy* de insetos seja classificado como um verdadeiro retrovírus (Boeke, 1988; Boeke & Corces, 1989; Kim *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1994). O retrovírus *gypsy* é classificado como um Errantivirus pertencente à família Metaviridae (Van Regenmortel, 2000).

Seqüências similares a *gypsy* de *Drosophila melanogaster* são amplamente distribuídas entre espécies de *Drosophila*. Varreduras baseadas em *southern* e *dot-blot* têm mostrado que o retrotransposon *gypsy* é amplamente distribuído no gênero *Drosophila* (Stacey *et al.*, 1986; Alberola *et al.*, 1997; Loreto *et al.*, 1998). Estudos filogenéticos prévios sugeriram que eventos de transferência horizontal de retroelementos *gypsy* entre espécies de *Drosophila* podem ocorrer ocasionalmente (Alberola & de Frutos, 1996; Mizrokhi & Mazo, 1991; Terzian *et al.*, 2000, Herédia *et al.*, 2004).

Eventos de transferência horizontal entre espécies são documentados para transposons de DNA, como *mariner* e *P* (Robertson, 1997; Clark *et al.*, 1994) ou retroelementos tais como *copia*, *gypsy* e *g twin* (Jordan *et al.*, 1999, Herédia *et al.*, 2004, Ludwig & Loreto, 2007).

Para elementos não-infecciosos, como *P*, um mecanismo de transferência mediado por um vetor foi proposto para explicar tais transferências entre indivíduos. Em contrapartida, as transferências horizontais de elementos infecciosos como *gypsy* não exigem qualquer vetor, em princípio. Já foi demonstrado em condições experimentais que *gypsy* pode ser horizontalmente transmitido entre indivíduos de *D. melanogaster* (Kim *et al.* 1994; Song *et al.* 1994).

A transferência horizontal de TEs, no entanto, necessita pelo menos uma relação ecológica entre as espécies envolvidas. Agentes patogênicos, como baculovírus (Jehle *et al.*, 1998) foram sugeridos como vetores de transposons (Kidwell, 1992). Tais possíveis vetores incluem ainda outros tipos de parasitas compartilhados, como vespas parasitóides (Yoshiyama *et al.*, 2001), ácaros parasitas (Houck *et al.*, 1991), vermes nematódeos ou microorganismos como fungos ou bactérias (Heath *et al.*, 1999) ou ainda vírus (Miller & Miller, 1982).

No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos em tais transferências ainda não foram elucidados. Tudo o que o vetor precisa é uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade de ter acesso às suas células germinativas; inserindo-se no ambiente celular sem destruir as células. Além disso, a transferência horizontal exige, não apenas que as distribuições do doador e do receptor sobreponham-se geograficamente, mas é provavelmente facilitada pelas sobreposições ecológica e temporal também.

Vespas parasíticas são possivelmente um dos mais diversos grupos de insetos, constituindo um grande número de espécies ainda não estudadas em climas tropicais, subtropicais e temperados (Quicke, 1997). Estão presentes em uma variedade de habitats e ocupam muitos nichos ecológicos. Vespas parasíticas (Hymenoptera) são parasitóides obrigatórios e matam seus hospedeiros quando completam seu desenvolvimento.

O termo parasitóide define uma categoria de insetos cuja larva se alimenta de outros insetos, mostrando características ecológicas em comum com predadores e parasitas (Godfray, 1994). Cada parasitóide necessita apenas de um indivíduo do hospedeiro para completar seu desenvolvimento, como o fazem parasitas verdadeiros, mas eles quase sempre matam o hospedeiro, como predadores.

Como outros insetos, espécies de *Drosophila* são atacadas durante as fases larval e pupal por muitos parasitóides (Carton *et al.*, 1986); entre eles exemplares das superfamílias Proctotrupeoidea e Cynipoidea. A família Eucilidae é um grupo monofilético e, dentro de Cynipoidea, possui o maior número de espécies, a maioria encontrada nos trópicos (Nordlander, 1980). Dentre estas, muitas espécies de *Ganaspis* são parasitóides larvais solitários de *Drosophila* (Nordlander, 1980; Vet & Bakker, 1985; Carton *et al.*, 1986). *G. xanthopoda* possui ampla distribuição geográfica e parasita *D. melanogaster* e *D. sturtevanti* (Carton *et al.*, 1986).

Associações hospedeiros-parasitóides nas quais insetos parasitóides desenvolvem-se às expensas dos insetos hospedeiros antes de matá-los são exemplos típicos de intimidade e de interações de longa duração entre espécies de insetos (Godfray, 1994) que podem oferecer condições ideais para transferências de DNA. No entanto, a identificação experimental do fenômeno de transmissão horizontal é difícil, uma vez que este é um evento aparentemente raro.

Como já foi proposto por Kidwell (1992), a intimidade do parasitismo poderia facilitar o fenômeno de transferência horizontal, e com este enfoque, nós iniciamos a sondagem de elementos transponíveis em microhimenópteros parasitóides de *Drosophila*. No presente trabalho nós investigamos a presença do transposon *P* e do retrotransposon *gypsy* no genoma de vespas parasitóides pertencentes ao gênero *Ganaspis* e à família Diapriidae (Superfamília Proctotrupeoidea) criadas em laboratório parasitando *Drosophila* durante várias gerações.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DOS ORGANISMOS ESTUDADOS

Foram realizadas coletas de drosófilas e parasitóides associados no Jardim Botânico de Porto Alegre (30°02'S-51°14'W). Frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassmann (Arecaceae) foram coletados e levados ao laboratório, onde foram colocados em garrafas contendo vermiculita e em câmaras com temperatura e umidade controladas (25 ± 1°C, 60% R.H.). À medida que os organismos eclodiam, eram aspirados dos vidros, adormecidos com éter para serem separados e identificados. Indivíduos pertencentes ao gênero *Ganaspis* e a superfamília Proctotrupeoidea (Diapriidae) foram individualizados, e uma parte destes foi separada para análise do DNA; e a outra parte foi separada para proceder a criação dos parasitóides no hospedeiro, *Drosophila melanogaster*.

CRIAÇÃO DOS PARASITÓIDES

A linhagem da mosca hospedeira, *Drosophila melanogaster*, foi obtida de uma cultura estoque (foi utilizada a linhagem Harwich, controle positivo para a presença dos elementos *P* e *gypsy*).

As vespas parasitóides do gênero *Ganaspis* e da família Diapriidae foram cultivadas separadamente, parasitando larvas de *D. melanogaster*. Em geral, aproximadamente 200 indivíduos entre machos e fêmeas das moscas foram colocados por frasco, a 17°C. Os recipientes de vidro foram fechados com organza e elástico. Após 48 h as vespas parasitóides (em média, 30 machos e 30 fêmeas) foram colocadas junto com as moscas.

Após emergir das pupas os indivíduos foram aspirados dos vidros diariamente. Os indivíduos coletados eram postos em outro vidro, contendo papel úmido, por aproximadamente 20h. Depois, eram limpos, um a um, com o auxílio de um pincel úmido (para a retirada de vestígios de meio de cultura,

impurezas e ácaros). Parte dos indivíduos foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido para ser utilizada na extração de DNA, e outra parte foi usada para iniciar a próxima geração.

MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

As culturas de *Drosophila* foram mantidas no meio de cultura de Marques *et al.*, (1966).

Para a criação dos parasitóides e *Drosophila*, foi utilizado um meio de cultura à base de ágar, contendo: 500 ml de água, 25 g de farinha de centeio, 50 g de açúcar, 5 g de Agar, 50 g de fermento, 2,5 ml de ácido propiônico.

Metade da água foi adicionada à farinha de centeio e a mistura foi aquecida no microondas até levantar fervura (aproximadamente 5 minutos). Depois, foi adicionado o resto da água, o açúcar e o ágar. Foi fervido por mais 5 minutos. Após a mistura esfriar um pouco, foram acrescentados fermento e o ácido propiônico e o meio foi distribuído nos vidros.

EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído de adultos das moscas e das vespas parasitóides segundo o método utilizado para *Drosophila* (Sassi *et al.*, 2005)(Anexos desta Tese), com modificações, como a adição de 135µg/ml de Proteinase K ao tampão de lise, incubado a 55 °C por 2horas.

AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Para investigar a presença de elementos *P* e *gypsy* no genoma das vespas parasitóides de *Drosophila*, foram utilizados *primers* descritos para *D. melanogaster*, que amplificam uma região dos elementos a partir do DNA genômico.

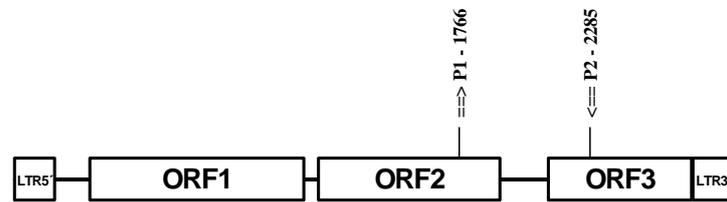
Para o elemento *P*, foram utilizados os *primers* retirados do mapa do plasmídeo p π 25.1, que contém o elemento *P* canônico de *D. melanogaster* (O'Hare & Rubin, 1983) e amplifica uma seqüência de 553 pb sobre a região do terceiro íntron do elemento *P*: P1 5' TGCTTCGCTTGATGGCTT 3' e P2 5' CAACTCATCCATTTCGGT 3' (Figura 1a).

Foram utilizados aproximadamente 30 ng de DNA para uma reação final de 25 μ l contendo 1U Taq polimerase (Invitrogen), tampão 1X fornecido pelo fabricante, 400 μ M de cada nucleotídeo, 20pmol de cada *primer* e 2,0 mM de MgCl₂. As condições de amplificação para as reações foram: 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 90 seg, seguidos por 72°C por 5 min de extensão final.

Para o retroelemento *gypsy*, foram utilizados os *primers* degenerados desenhados por Herédia *et al.*, (2004) (Figura 1b), baseados nos alinhamentos das seqüências de *D. melanogaster*, *D. virilis* e *D. subobscura*, usando a seqüência de *D. melanogaster* como referência: GYP3S2 (senso AAAGGCGAYTTGGTTGACTCC, ORF3 região 6026-6048) e GYP3AS2 (antisenso CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG, ORF3 região 6491-6511) que amplificam um fragmento de 485 pb. As letras R, W e Y representam as posições degeneradas nos *primers*, segundo o código genético degenerado.

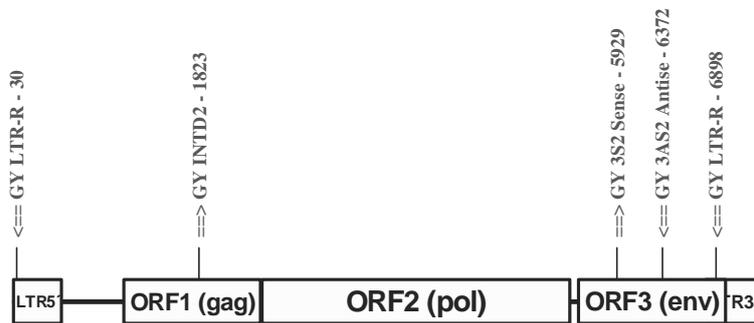
Baseados nas mesmas seqüências foram desenhados outros *primers* para este trabalho: GY INT-D2 (6581-6600) 5' AAAWCACTAAGCAAGCAGCC 3' e GY LTR-R (33-55) 5' ATACRAAGCTACTARTGC 3', que amplificam uma região que inclui o LTR 5' e parte do gene gag (Figura 1b).

a)



P D. melanogaster
2859 bp

b)



GYPSY D. melanogaster
7348 bp

Figura 1. Estrutura esquemática dos elementos *P* (a) e *gypsy* (b) de *D. melanogaster*, indicando os locais de anelamento dos *primers* utilizados neste trabalho.

Os componentes das reações foram: aproximadamente 30ng de DNA para uma reação final de 25µl contendo 1U Taq polimerase (Invitrogen), tampão 1X fornecido pelo fabricante, 400µM de cada nucleotídeo, 20pmol de cada primer 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 90 seg, seguidos por 72°C por 5 min para finalizar a reação.

CONTROLES DA PCR

Todas as amostras de DNA utilizadas neste trabalho foram submetidas a um PCR com *primers* que amplificam um segmento do gene de *actina*, baseados em um gene altamente conservado, a actina 79B de *D. melanogaster*.

Os primers AS 5' AATCACCATCGGCAACGA 3' e AR 5' AAGCACTTGCGGTGGACGAT 3' amplificam um fragmento de 744 pb e outro de 380 pb correspondente aos outros 3 genes de actina no genoma de *D. melanogaster*.

Para um volume final de reação de 25 µl, aproximadamente 30 ng de DNA foram adicionados a 1U de Taq polimerase (Invitrogen), tampão 1X fornecido pelo fabricante, 10 pmol de cada primer, 2 mM de MgCl₂ e 400 µM de cada nucleotídeo. As condições da reação foram: desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 1 min a 94 °C, anelamento por 1 min a 55 °C, e extensão por 75 seg a 72 °C, seguido por extensão final a 72 °C por 5 min.

Como controle de contaminação do DNA utilizado nos experimentos, foram utilizados os *primers* TL2-J-3037 e TK-N-3785 (Simon *et al.*, 1994) que amplificam um fragmento de 684 bp do gene mitocondrial *COII*. Estes *primers* foram utilizados por amplificar facilmente DNA de *Drosophila sp.* mesmo em quantidades mínimas, servindo como controle de contaminação com DNA de *Drosophila* no genoma dos parasitóides.

Os componentes da reação de 25µl foram: 30ng de DNA, tampão 1X fornecido pelo fabricante, 2,5 mM MgCl₂, 400 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer, 1 U of Taq Polymerase (Invitrogen). Os parâmetros de amplificação foram: desnaturação a 94 °C por 7 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 1 min a 94 °C, anelamento por 1 min a 55 °C, e extensão por 75 seg a 72 °C, seguido por extensão final a 72 °C por 5 min.

SOUTHERN BLOT

As sondas do retroelemento *gypsy* foram produzidas a partir da amplificação dos *primers* GYP3S2, GYP3AS2 a partir do plasmídeo pGGHS contendo o retroelemento *gypsy* completo, isolado do genoma de *D. melanogaster* (Dorsett *et al.*, 1989). Para o elemento *P*, as sondas foram produzidas empregando os pares de *primers* P1 e P2, amplificando fragmentos do elemento *P* a partir do plasmídeo pπ25.1 (O'Hare & Rubin, 1983). Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 1%. 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 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GEHealthcare).

Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, transferidos para uma membrana de nylon Hybond N+ (GEHealthcare) e hibridizados de acordo com o protocolo do "kit" Gene Images® (GEHealthcare). As membranas foram hibridizadas 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 não radioativo CPD-Star (GEHealthcare).

OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS

Os amplicons obtidos foram separados em gel de agarose 1% e os fragmentos de tamanho esperado foram excisados do gel e purificados usando o Qiaquick DNA-Gel Extraction System (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Os amplicons purificados foram enviados para seqüenciamento.

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer*.

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BioEdit (Hall, 1999) e corrigidas manualmente quando necessário.

A busca por similaridade das seqüências obtidas foi feita usando a ferramenta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide) no banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

RESULTADOS

MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Para estabelecer o cultivo em laboratório de indivíduos do gênero *Ganaspis* e da família Diapriidae (Superfamília Proctotrupoidea) foram testados vários meios de cultivo.

O meio padrão para cultivo de *Drosophila* (Marques *et al.*, 1966) mostrou-se desvantajoso, pois a umidade presente na sua superfície fazia com que os microhimenópteros morressem grudados no mesmo. Assim, optou-se por um meio feito à base de centeio e solidificado com ágar. Primeiramente, pensou-se na adição de fermento biológico ao meio, como de costume, porém o meio acabou decompondo-se muito rapidamente. Além disso, foi utilizada uma quantidade maior de açúcar (para suprir os carboidratos necessários aos microhimenópteros). Por último procedeu-se à utilização do meio descrito na seção Materiais e Métodos que mostrou ótimos resultados, com boa ovoposição por parte das moscas e sem interferir na biologia dos microhimenópteros.

CICLO DE VIDA DOS MICROHIMENÓPTEROS CULTIVADOS

Tanto para indivíduos do gênero *Ganaspis* como para a família Diapriidae (Superfamília Proctotrupoidea), nós observamos que, a 17 graus, a eclosão dos machos demorou aproximadamente 30 dias, e das fêmeas em torno de 33 dias.

Machos das espécies parasitóides emergem das pupas antes das fêmeas (ao contrário de *Drosophila*). Em todos os casos, a emergência de vespas das pupas do hospedeiro ocorreu muito depois (de 10 a 20 dias) que a emergência de moscas de pupas não parasitadas. Em laboratório, o tempo de vida dos parasitóides foi de aproximadamente um mês.

Foi possível manter até sete gerações de *Ganaspis sp.*, as quais foram analisadas para a presença de *P* ou *gypsy* no presente trabalho. Após a sétima

geração os cultivos foram fechados. Os cultivos dos organismos da família Diapriidae também foram bem sucedidos no mesmo meio de cultivo e foi possível manter até o momento do fechamento do mesmo (3º geração).

ANÁLISE DO ELEMENTO *P*

As amplificações por PCR de regiões específicas do elemento *P*, usando como molde DNA genômico dos microhimenópteros e de *D. melanogaster*, mostraram produtos com tamanho semelhante ao esperado para o elemento *P* canônico (553 pb) amplificado com os *primers* P1 e P2, em todas as amostras estudadas (Figura 2).

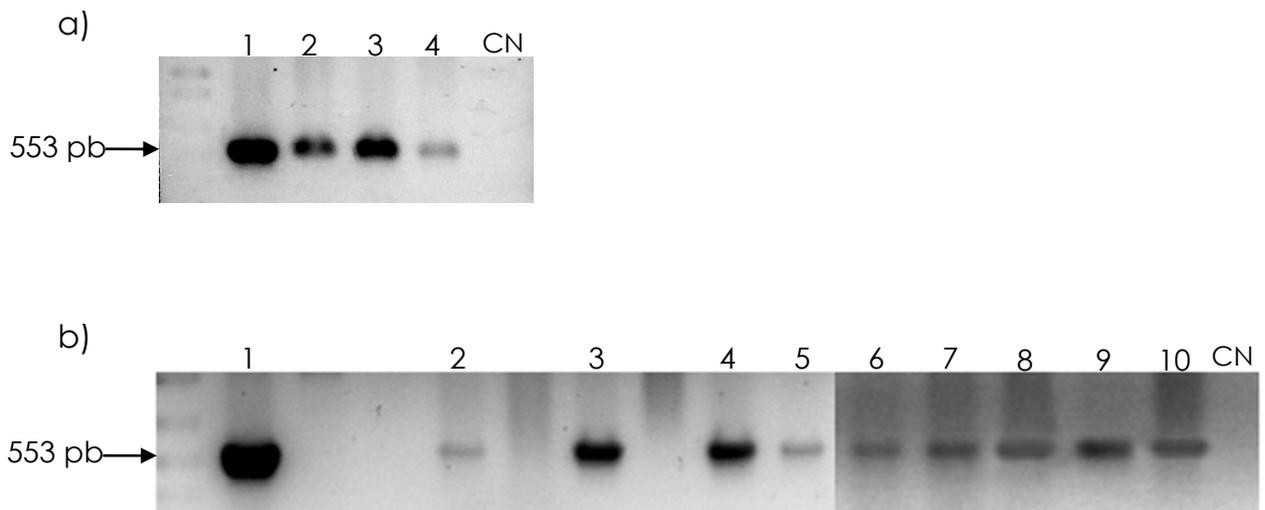


Figura 2. Resultados de algumas reações de amplificação por PCR de seqüências do elemento *P* (a partir dos *primers* P1 e P2) no genoma de vespas parasitóides de *Drosophila*. **a)** 1) *D. melanogaster* Harwich (controle positivo); 2) *Ganaspis sp.*; 3) Diapriidae; 4) Exemplar da superfamília Cynipoidea; CN) Controle Negativo. **b)** 1) *D. melanogaster* Harwich (controle positivo); 2) Diapriidae F1; 3) Diapriidae F2; 4) *Ganaspis sp.* F1; 5) *Ganaspis sp.* F2; 6) *Ganaspis sp.* F3; 7) *Ganaspis sp.* F4; 8) *Ganaspis sp.* F5; 9) *Ganaspis sp.* F6; 10) *Ganaspis sp.* F7.

A seta indica o tamanho do fragmento esperado, em pb. Marcador Molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

A análise dos produtos de PCR por *southern blot* mostrou homologia entre estes fragmentos e a seqüência do elemento *P* canônico usado como sonda (Figura 3).

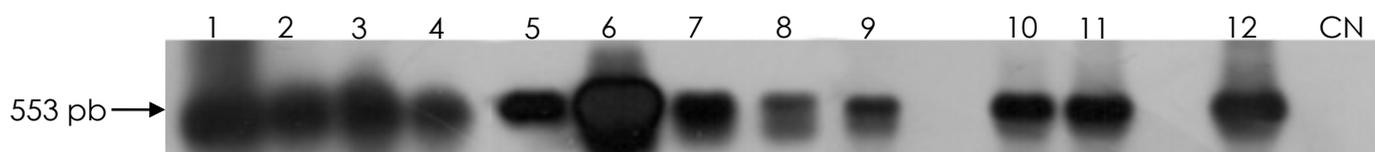


Figura 3. *Southern blot* de alguns produtos de PCR do DNA das vespas parasitóides e do controle *D. melanogaster* amplificados a partir dos *primers* P1 e P2. 1) *D. melanogaster* Harwich (controle positivo); 2) *Ganaspis* sp.; 3) Diapriidae; 4) Exemplar da superfamília Cynipoidea; 5) *Ganaspis* sp. coletada no Jardim Botânico; 6) *Ganaspis* sp. F1; 7) *Ganaspis* sp. F2; 8) *Ganaspis* sp. F3; 9) *Ganaspis* sp. F4; 10) *Ganaspis* sp. F5; 11) *Ganaspis* sp. F6; 12) *Ganaspis* sp. F7; CN) Controle Negativo.

A seta indica o tamanho do fragmento esperado, em pb.

Cabe ressaltar que, além de utilizar como sonda na hibridização o produto da amplificação dos *primers* dos elementos *P* e *gypsy* a partir dos plasmídeos onde estavam inseridos, foi utilizada outra abordagem, usando os plasmídeos contendo os elementos completos como sondas da hibridização, e não obtivemos diferenças nos resultados.

Os produtos de amplificação confirmados pela hibridização por *southern blot* como sendo homólogos ao elemento *P* canônico de *D. melanogaster* foram, então, purificados e seqüenciados. Os fragmentos amplificados mostraram 100% de similaridade ao elemento *P* canônico.

Esta similaridade foi vista para os indivíduos pertencentes ao gênero *Ganaspis* e a família Diapriidae. Além destes, foi seqüenciada uma amostra

pertencente ao gênero *Ganaspis* (Superfamília Cynipoidea), porém, coletada na área urbana de Porto Alegre e foi observado o mesmo grau de similaridade na seqüência.

ANÁLISE DO RETROTRANSPONON GYPSY

As amplificações por PCR de regiões específicas do retrotransposon *gypsy*, usando como molde DNA genômico dos microhimenópteros e de *D. melanogaster*, mostraram produtos com tamanho semelhantes ao esperado para o retrotransposon *gypsy* (485 pb) quando utilizados os *primers* GY3S2 e GY3AS2, em todas as amostras estudadas (Figura 4).

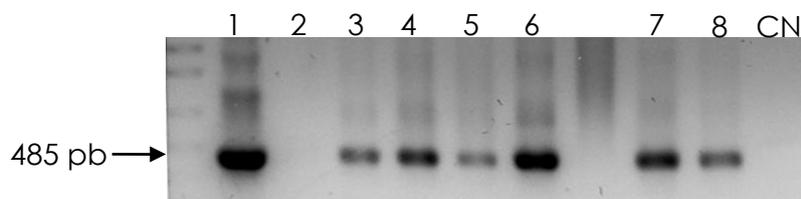


Figura 4. Resultados de algumas reações de amplificação por PCR de seqüências do elemento *gypsy* (a partir dos *primers* GY3S2 e GY3AS2) no genoma de vespas parasitóides de *Drosophila*. 1) *D. melanogaster* Harwich (controle positivo); 2) Exemplar da superfamília Cynipoidea; 3) *Ganaspis sp.*; 4) Diapriidae; 5) *Ganaspis sp.* F1; 6) *Ganaspis sp.* F5; 7) *Ganaspis sp.* F6; 8) *Ganaspis sp.* F7; CN) Controle Negativo.

A seta indica o tamanho do fragmento esperado, em pb. Marcador Molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

A análise destes produtos de amplificação, por *southern blot*, mostrou homologia entre estes e a seqüência do retrotransposon *gypsy* usado como sonda (Figura 5).

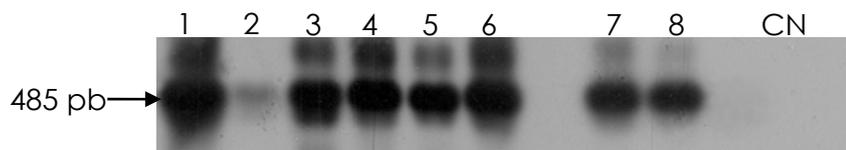


Figura 5. *Southern blot* do produto de PCR do DNA das vespas parasitóides e do controle *D. melanogaster* amplificados a partir dos *primers* GY3S2 e GY3AS2. 1) *D. melanogaster* Harwich (controle positivo); 2) Exemplar da superfamília Cynipoidea; 3) *Ganaspis* sp.; 4) Diapriidae; 5) *Ganaspis* sp. F1; 6) *Ganaspis* sp. F5; 7) *Ganaspis* sp. F6; 8) *Ganaspis* sp. F7; CN) Controle Negativo.

A seta indica o tamanho do fragmento esperado, em pb.

Os produtos de amplificação confirmados por *southern blot* como sendo homólogos ao retrotransposon *gypsy* de *D. melanogaster* foram purificados e sequenciados. A amostra da família Diapriidae, amplificada a partir do *primer* LTR D2, apresentou 100% de homologia com a seqüência de *gypsy* de *D. melanogaster*.

Entre os fragmentos amplificados, o que foi amplificado com os *primers* 3S2 e 3AS2 no DNA de outra vespa parasitóide, pertencente à superfamília Cynipoidea (família Eucoilidae, gênero *Ganaspis*), porém coletada em um local dentro da cidade de Porto Alegre, também apresentou 100% de similaridade ao retroelemento *gypsy* de *D. melanogaster*.

A amostra de *Ganaspis* amplificada com os *primers* 3S2 e 3AS2 apresentou 99% de similaridade ao retroelemento *gypsy* de *D. melanogaster*. Foi encontrada uma mutação na base 437, trocando uma timina por citosina (Figura 6a), mas não foi possível confirmar a mutação com o seqüenciamento do *primer* reverso. A reamplificação e um novo seqüenciamento da amostra apresentaram o mesmo resultado para a mutação (Figura 6b).

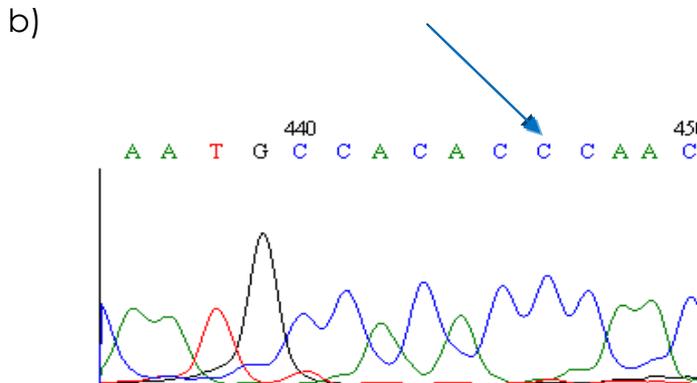
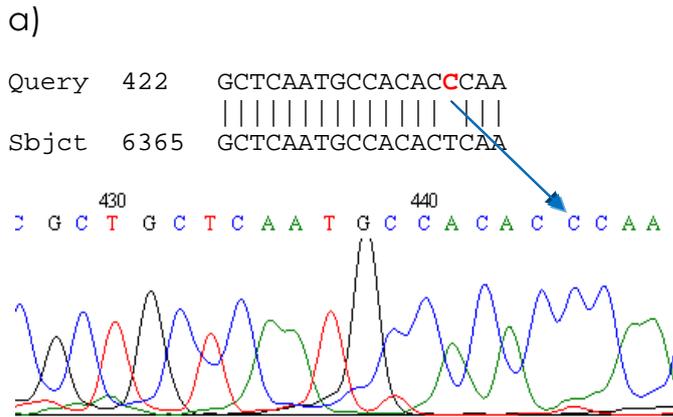


Figura 6. Amostras de *Ganaspis sp.* amplificadas com os *primers* 3S2 e 3AS2 que apresentaram 99% de similaridade ao retroelemento *gypsy* de *D. melanogaster*. A mutação na base 437, trocando uma timina por citosina, foi encontrada em dois seqüenciamentos diferentes. a) primeiro seqüenciamento e b) reamplificação e novo seqüenciamento da amostra.

ANÁLISE DE ACTINA

As amplificações por PCR de regiões específicas de actina, usando como molde DNA genômico dos microhimenópteros e de *D. melanogaster*, mostraram produtos com tamanho semelhante aos esperados para o fragmento de actina em todas as amostras estudadas. A banda de 744 pb correspondente ao fragmento de actina 79B de *D. melanogaster* somente foi observada no produto

da amplificação do DNA genômico desta espécie enquanto que as espécies restantes apresentaram banda com tamanho de aproximadamente 380 pb. (Figura 7).

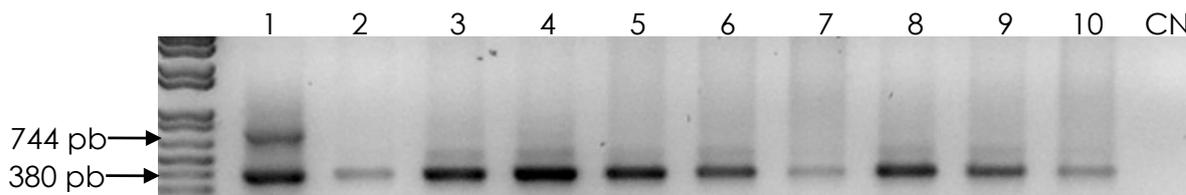


Figura 7. Amplificação do segmento do gene de actina 79B a partir do DNA genômico de *Drosophila* e vespas parasitóides associadas. L) Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 1) *D. melanogaster* Harwich; 2) Exemplar da superfamília Cynipoidea; 3) *Ganaspis sp.* F1; 4) *Ganaspis sp.* F2; 5) *Ganaspis sp.* F3; 6) *Ganaspis sp.* F4; 7) *Ganaspis sp.* F5; 8) *Ganaspis sp.* F6; 9) *Ganaspis sp.* F7; 10) Diapriidae; CN) Controle Negativo.

A seta indica os tamanhos dos fragmentos observados.

A análise destes produtos por *southern blot* mostrou homologia entre estes e a seqüência de actina usada como sonda (Figura 8). Como mostrado na figura 8, mesmo com o sinal amplificado pela técnica de hibridização, a banda de 744 pb correspondente ao fragmento de actina 79 de *D. melanogaster* continuou a aparecer unicamente na amostra de DNA de *D. melanogaster*.

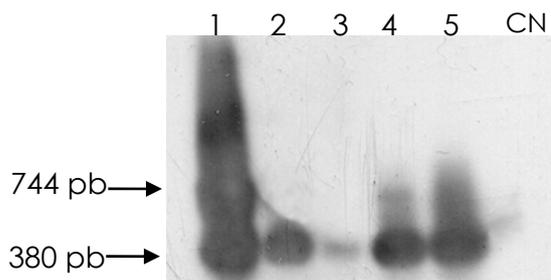


Figura 8. *Southern blot* do produto de PCR do DNA das vespas parasitóides e do controle *D. melanogaster* amplificados a partir dos *primers* de actina 79B. 1) *D. melanogaster* Harwich; 2) *Ganaspis* sp.; 3) Diapriidae; 4) Exemplar da superfamília Cynipoidea; 5) *Ganaspis* sp. F7; CN) Controle Negativo. A seta indica o tamanho dos fragmentos observados, em pb.

O seqüenciamento dos produtos confirmados por *southern blot* como sendo homólogos ao fragmento de actina usado como sonda foram purificados e seqüenciados. Os fragmentos amplificados mostraram 92 % de semelhança com os diferentes genes de actina de *Drosophila melanogaster*. As seqüências de actina obtidas a partir dos microhimenópteros do gênero *Ganaspis* e família Diapriidae serão depositadas na base de dados GenBank.

ANÁLISE DO GENE MITOCONDRIAL COII

As amplificações por PCR do gene mitocondrial *COII*, usando como molde DNA genômico dos microhimenópteros e de *D. melanogaster*, mostraram produtos com tamanho semelhante ao esperado unicamente em amostra de DNA genômico de *D. melanogaster* (Figura 9).

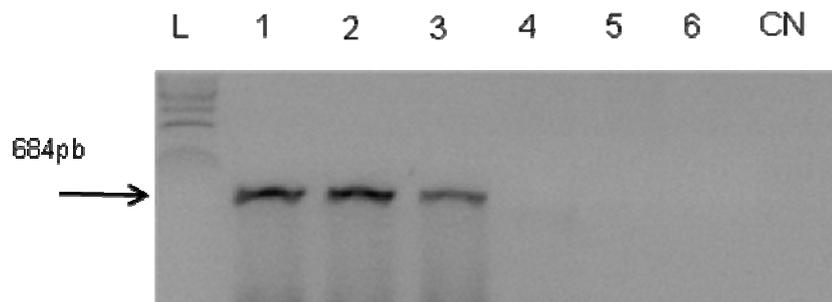


Figura 9. L) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 1) *D. melanogaster* (10 ng); 2) *D. melanogaster* (1 ng); 3) *D. melanogaster* (0,1 ng); 4) *Ganaspis sp.*; coletado no Jardim Botânico; 5) *Ganaspis sp.*; coletado na área urbana; 6) Diapriidae; CN) Controle Negativo. A seta indica o fragmento de tamanho esperado para *D. melanogaster*.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, inúmeros relatos de transferência horizontal de TEs têm surgido (Vázquez-Manrique *et al.*, 2000; Silva & Kidwell, 2000; Loreto *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2002; Herédia *et al.*, 2004; Castro & Carareto, 2004; Ludwig & Loreto, 2007), o que suporta a proposição de que este fenômeno é mais freqüente do que se supunha anteriormente. E a freqüência desse evento não é a mesma para as diferentes classes de elementos transponíveis. Segundo Silva *et al.*, (2004), a incidência de eventos de transmissão horizontal é significativamente maior entre os elementos da Classe II do que entre os da Classe I (dentre estes, retroelementos com LTRs teriam mais chances de sofrer TH do que retroelementos sem LTRs). Evidências mostram que o modo de transposição e a auto-regulação do número de cópias no genoma hospedeiro afetam sensivelmente a incidência do evento de transmissão horizontal (Malik *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004).

Uma das principais questões levantadas, neste caso, é que tipos de intermediários estão envolvidos no fenômeno de transferência horizontal de elementos transponíveis. Existem trabalhos que descrevem vírus "carregando" TEs (Miller & Miller, 1982) e vírus podem, portanto, atuar como lançadeiras (*shuttles*) de TEs para transferência horizontal (Fraser, 1986).

Sabe-se que vírus carregados por parasitóides podem ter um importante papel na supressão da resposta imunológica do hospedeiro, prevenindo o encapsulamento do ovo do parasitóide (Strand & Pech, 1995). A hipótese postulada por Yoshiyama *et al.* (2001) também poderia aplicar-se ao nosso trabalho, onde seria possível que vírus estão (estavam) presentes no sistema *Drosophila-parasitóide* e portanto, poderiam atuar (ou ter atuado) como vetores para transferir TEs entre as espécies.

Outra questão relevante é se a transferência horizontal é um fenômeno comum em sistemas hospedeiro-parasita. Existem poucos dados disponíveis. O

caso de transferência mais conhecido e bem documentado é o da transferência do elemento *P* de *D. willistoni* para *D. melanogaster* (Daniels *et al.*, 1990, Kidwell, 1992).

Um parasita com ampla distribuição, o ácaro *Proctolaelaps regalis*, é o candidato mais plausível que foi proposto como um vetor para a transferência do elemento *P* (Houck *et al.*, 1991). Esta hipótese é atraente, porque este ácaro se alimenta de ovos de *Drosophila* por “punção”, sugando o conteúdo. Como o ácaro não mata todos os ovos que ele ataca, é razoável supor que ele poderia transferir pequenas quantidades do conteúdo de um ovo para outro. Tal procedimento poderia induzir a transferência do elemento *P*. Alguns autores sugerem como sendo plausível que a transferência de partículas vírus-*like* (VLPs) do retroelemento *copia* poderia também resultar em transferência horizontal. O citoplasma é conhecido como a localização intracelular de *copia* VLPs (Shiba & Saigo, 1983), o qual contém todo o mecanismo necessário para a introdução de uma nova cópia do retrotransposon no genoma.

Outra importante questão a ser abordada é se transferências horizontais são comuns ou não em sistemas parasita-hospedeiro. Além do trabalho de Houck *et al.*, (1991), há poucos trabalhos demonstrando que uma proximidade ecológica especialmente íntima, como a relação parasita-hospedeiro tenha contribuído para transferência horizontal de um elemento transponível (Yoshiyama *et al.*, 2001; Dahl *et al.*, 2007).

A transferência horizontal de um elemento da família *mariner* entre uma vespa parasitóide e sua mariposa hospedeira é um bom exemplo da sobreposição ecológica entre doador e receptor que deve acompanhar o fenômeno de transferência horizontal (Yoshiyama *et al.*, 2001). Neste caso, o parasitóide possui um elemento *mariner* com 97% de identidade de seqüência com seu hospedeiro, enquanto espécies de parasitóides relacionados não possuem *mariner*. Entretanto, apesar da íntima associação física entre parasitóide e hospedeiro, um vetor, como um vírus, ou bactéria, pode ainda ser necessário para mediar a real transferência do DNA do transposon entre as células.

Assim sendo, o estudo de ácaros e/ou parasitóides como vetores de elementos transponíveis durante processos de transferência horizontal contribuiriam aportando novos dados nesta abordagem experimental.

Nossos dados obtidos pela amplificação de DNA genômico de *Gnathocampa* sp. e Diapriidae mostraram bandas com o tamanho esperado e o *southern blot* e seqüenciamento destas bandas fornecem dados que sugerem a presença dos elementos *P* e *gypsy* no genoma destes organismos.

Como a similaridade encontrada entre *P* e *gypsy* presentes em *Drosophila melanogaster* e nas vespas parasitóides foi muito alta, nós fizemos uma série de PCRs controles para verificar a possibilidade de que esta similaridade fosse resultado de contaminação por DNA genômico das moscas.

Para resolver esta questão, todas as amostras de DNA genômico utilizadas neste trabalho foram submetidas a reações de PCR com *primers* que amplificam um segmento do gene de *actina*. Em *Drosophila*, foram identificados seis genes que codificam as isoformas de actina (Fyrberg *et al.*, 1998), sendo as regiões codificantes altamente conservadas entre espécies evolutivamente distantes. Esta etapa teve como finalidade controlar a qualidade do DNA genômico (para confirmar se a falta de amplificação do elemento transponível não era devido à baixa qualidade do DNA). Outro achado interessante foi o fato de que, em *D. melanogaster*, esses *primers* amplificam um segmento de 744 pb (produto da presença de um intron na variante 79B) e outro de 380 pb, enquanto que nas amostras das vespas parasitóides, foi amplificado um segmento de aproximadamente 380 pb (de modo semelhante ao que ocorre com o DNA de *D. willistonii*). Essa diferença de amplificação ainda foi comprovada por *southern blot* e seqüenciamento do fragmento obtido, dando suporte à idéia que o DNA amplificado foi dos parasitóides e não material genômico das moscas.

O seqüenciamento com os *primers* para actina resultou em seqüências muito "limpas", que não demonstraram contaminação. Entretanto, como os elementos transponíveis são geralmente encontrados em múltiplas cópias nos genomas, a idéia de contaminação poderia persistir.

Para resolver este problema, usamos um controle “multicópia” optando pelo gene mitocondrial *COII*. Os *primers* utilizados mostraram-se eficientes para a amplificação de várias espécies de *Drosophila* em um trabalho do nosso grupo (Robe *et al.*, 2005).

Nesta série de controles internos dos PCRs, não foi visualizada qualquer amplificação utilizando os *primers* para o gene *COII* de *Drosophila* no genoma das vespas parasitóides, indicando que a presença de amplificação nos demais experimentos não foi devida a qualquer contaminação com DNA de *Drosophila*. Também foram testadas várias diluições conhecidas do DNA de moscas para verificar se pequenas quantidades poderiam ser amplificadas, o que foi confirmado. O DNA de *D. melanogaster* apresentou o produto de amplificação esperado mesmo em baixas concentrações, e o DNA genômico dos microhimenóperos não apresentou amplificação ou sinal de contaminação.

Baseados nesses controles, nós concluímos que as identidades de seqüências entre os elementos transponíveis encontrados nas vespas parasitóides de *D. melanogaster* descritos neste trabalho não são um artefato de contaminação experimental. Os resultados também confirmaram que não foram encontradas evidências de contaminação das amostras de parasitóides com DNA de *Drosophila* nos nossos experimentos.

Assim, este trabalho descreve, pela primeira vez, a presença de fragmentos de DNA com alta homologia aos elementos *P* e *gypsy* no genoma de vespas parasitóides de *Drosophila* pertencentes ao gênero *Ganaspis* sp. e família Diapriidae. Nossos resultados confirmam e ampliam os achados de que o transposon *P* e o retrotransposon *gypsy* são amplamente distribuídos em outros organismos (além do gênero *Drosophila*).

Usando *primers* degenerados desenhados a partir das seqüências destes elementos em *D. melanogaster*, nós mostramos que uma vespa parasitóide e seu hospedeiro, *Drosophila*, possuem seqüências homólogas ao retroelemento *gypsy* e ao elemento *P* com 100% de identidade na seqüência nucleotídica estudada.

Como não foram identificadas cópias completas destes elementos no genoma dos organismos estudados, uma possibilidade que não pode ser descartada é de que estes elementos existam de forma episomal, ou seja, podem estar nos genomas de organismos simbióticos e/ou vírus.

Portanto, com os nossos dados, não temos condições de afirmar a ocorrência de transferência horizontal destas seqüências (não podemos avaliar se as seqüências estão inseridas no genoma destes organismos). Além disto, ainda deve ser determinado se as seqüências existentes no genoma destas vespas são cópias completas de *P* e *gypsy*.

Nossas primeiras tentativas para extrair DNA genômico de indivíduos coletados na natureza, para confirmar a presença de elementos transponíveis por *southern blot* não foram bem sucedidas. A quantidade de DNA obtido foi pouca e, além disto, a baixa qualidade impediu ou dificultou a sua clivagem por enzimas de restrição e por tal motivo este procedimento não pôde ser realizado. Para solucionar este inconveniente foi estabelecido o cultivo dos microhimenópteros em laboratório.

A associação entre *Drosophila* e vespas parasitoides providencia excelentes sistemas modelo para investigações de aspectos ecológicos, comportamentais, genéticos e fisiológicos das interações hospedeiro-parasitóide (Norlander, 1980; Vet & Bakker, 1985; Carton *et al.*, 1986; Rizki & Rizki, 1990; Van Alphen & Visser, 1990; Carton & Nappi, 1991). Entretanto, pouco se sabe sobre o comportamento e biologia dos Eucilidae na região neotropical e a maioria dos estudos são sobre a taxonomia e análises populacionais (Diaz, 1998; Guimarães, 1999; Guimarães *et al.*, 2003). Portanto, o estabelecimento de um sistema de cultivo em laboratório destes animais facilita o estudo de vários aspectos.

Na natureza, os machos das espécies parasitas emergem das pupas antes das fêmeas (ao contrário de *Drosophila*) (Melk & Govind, 1999). Além disto ser visualizado, em todos os casos, a emergência de vespas das pupas do hospedeiro ocorreu muito depois (de 10 a 20 dias) do que a emergência de moscas de pupas não parasitadas. Em laboratório, os parasitóides vivem

aproximadamente um mês, enquanto que no campo parece ser de 2 a 3 semanas (Quicke, 1997).

No nosso sistema a temperatura de 17°C fez com que o desenvolvimento dos organismos seja um pouco mais lento, mas foi escolhida porque em temperaturas mais altas (25°C), ocorre a decomposição do meio de cultura antes do completo desenvolvimento e eclosão das vespas. Isto ocorre porque somente após aproximadamente 40 dias de cada geração, os parasitóides começavam a emergir das pupas.

Com o estabelecimento do cultivo foi possível obter quantidades maiores de DNA, que se comportaram como DNA de alto peso molecular durante a visualização em gel de agarose. Contudo, as amostras apresentaram dificuldades para serem clivadas e novamente a qualidade do southern blot viu-se comprometida.

Outros trabalhos que relatam a presença de elementos transponíveis em diferentes espécies de microhimenópteros, também demonstram dificuldades na obtenção de bons resultados visualizados como boas imagens através da técnica de *southern blot* (Dahl *et al.*, 2007; Rezende-Teixeira *et al.*, 2008).

A produção de um baixo rendimento nas extrações de DNA, acompanhado de uma baixa qualidade do mesmo já foi discutida por outros autores (Ratcliffe *et al.*, 2002) como sendo resultado da presença de compostos inibitórios na cutícula destas espécies.

Provavelmente este foi o motivo de não termos conseguido resultados satisfatórios no *southern blot* de DNA genômico. Foram realizadas tentativas, porém, os resultados não foram conclusivos, tendo em vista a dificuldade encontrada para realizar a clivagem deste material. Para confirmar a hipótese da clivagem parcial do DNA, uma das membranas foi re-hibridizada com uma sonda de rDNA, que hibridiza facilmente DNA de *Drosophila* e notou-se que realmente havia uma clivagem parcial, com pouquíssima hibridização. Foi utilizado como sonda o plasmídeo pDm 238 (Tautz *et al.*, 1988) que contém uma unidade completa (12 kb) do DNA ribossomal de *D. melanogaster* incluindo os

genes 28S, 18S, 5.8S e 2S, ao lado das regiões espaçadoras ITS, IGS, ETS (GenBank M21017 e M29800).

Seqüências homólogas a elementos *P* e *gypsy* têm sido identificadas em vários organismos, mas até o presente momento não existiam dados referentes à associação parasitóide-*Drosophila*. Nossos resultados somam-se aos de outros trabalhos que mostram a presença de TEs nos genoma de outras associações parasita-hospedeiro (Houck *et al.*, 1991; Yoshiyama *et al.*, 2001; Dahl *et al.*, 2007).

Tem sido postulado que a transferência horizontal entre espécies pode ser uma estratégia efetiva pela qual elementos transponíveis de DNA (classe II) escapam da inativação através do tempo evolutivo (Capy *et al.*, 1994).

Seqüências homólogas a *gypsy* de *D. melanogaster* são amplamente distribuídas no gênero *Drosophila* (Alberola & de Frutos 1996; Terzian *et al.* 2000). Tal fato foi atribuído, inicialmente, à existência de elementos ancestrais que foram transmitidos verticalmente ao longo da história evolutiva das espécies do gênero. Porém, análises mais detalhadas mostraram que há várias seqüências *gypsy* evoluindo independentemente no genoma, levando a uma alta heterogeneidade de seqüências. As similaridades entre essas seqüências são, muitas vezes, discrepantes em relação ao tempo de divergência das espécies hospedeiras e impossível de serem explicadas por meio de simples eventos de transferência vertical (Alberola & de Frutos, 97; Vásquez-Manrique *et al.*, 2000; Herédia *et al.*, 2004, 2007).

Recentemente, uma seqüência *gypsy-like* foi amplificada do genoma da pulga do gato doméstico (*Ctenocephalides felis*) em um *pool* de linhagens de laboratório e de campo (Dahl *et al.*, 2007). Foram detectadas identidades altas ao comparar esta com outras seqüências *gypsy-like* de espécies de *Drosophila*. Em contraste com algumas destas seqüências de *gypsy*, o fragmento de 410 pb de *C. felis* possui duas deleções, que estão localizadas nas região do gene *env*.

Malik *et al.* (2000) mostraram que o gene *env* tem sido adquirido independentemente, várias vezes, na história evolutiva dos retrotransposons com LTRs e sugerem que essa aquisição poderia aumentar a probabilidade de

ocorrência de eventos de transmissão horizontal. Uma dessas aquisições aconteceu nos Errantivirus, os quais formam um grupo monofilético de retrotransposons de insetos e adquiriram um gene, que codifica uma proteína com propriedades fusogênicas, a partir do genoma de baculovírus. O único elemento desse grupo com propriedades infecciosas comprovadas é o elemento *gypsy* de *D. melanogaster* (Song *et al.*, 1994), mas a capacidade potencial de codificar proteína Env funcional é evidenciada também para outros elementos (Terzian *et al.*, 2000).

A hipótese atrativa de que a intimidade especial da relação parasitóide-hospedeiro poderia facilitar a transferência de elementos transponíveis é demonstrada apenas em Yoshiyama *et al.*, (2001). A transferência horizontal de um elemento da família *mariner* entre uma vespa parasitóide e sua mariposa hospedeira é um bom exemplo da sobreposição ecológica entre doador e receptor que deve acompanhar o fenômeno de transferência horizontal (Yoshiyama *et al.*, 2001). Neste caso, o parasitóide possui um elemento *mariner* com 97% de identidade de seqüência com seu hospedeiro, enquanto espécies de parasitóides relacionados não possuem *mariner*. Entretanto, apesar da íntima associação física entre parasitóide e hospedeiro, um vetor, como um vírus, pode ainda ser necessário para mediar a real transferência do DNA do TE entre as células.

Embora numerosos estudos acrescentem suporte para a hipótese de transferência horizontal, com poucas exceções, como o caso do elemento *P* (Houck *et al.*, 1991), eles não apresentam uma proposta satisfatória de como a transferência pode ter ocorrido.

Vetores prováveis incluem vírus (Miller e Miller, 1982; Fraser *et al.*, 1985; Jehle *et al.*, 1995), vespas parasitóides (Yoshiyama *et al.*, 2001) e ácaros parasitas (Houck *et al.*, 1991). Recentemente, parasitas intracelulares também têm sido colocados na lista de possíveis vetores. Heath *et al.*, (1999) mostraram que um parasita intracelular do gênero *Wolbachia* pode ser transferido entre espécies de hospedeiros. A transferência de material nuclear entre *Wolbachia* e um inseto

hospedeiro também foi documentada, embora o mecanismo para tal transferência permaneça elusivo (Kondo *et al.*, 2002).

Associações hospedeiro-parasitóide são, inclusive, apropriadas para o estudo da transferência da bactéria endossimbionte *Wolbachia*, fenômeno que requer relações de intimidade entre as espécies. Vavre *et al.* (1999) demonstraram que himenópteros parasitóides de espécies de *Drosophila* são suscetíveis à infecção por *Wolbachia*. A alta similaridade de seqüências entre as bactérias encontradas nos parasitóides e em seus hospedeiros suporta a hipótese de transferências freqüentes desta bactéria para outras espécies e sugerem outros tipos de "trocas genéticas" entre espécies, especialmente nas associações hospedeiro-parasitóide. Acredita-se que a ampla distribuição de *Wolbachia* em artrópodes é claramente devida a transferência horizontal (Werren & O'Neill, 1997; Heath *et al.*, 1999; Vavre *et al.*, 1999).

Outro exemplo são os baculovírus. Esses vírus são específicos de Lepidoptera, e muitos TEs têm sido encontrados no genoma desses vírus (Capy *et al.*, 1998).

Associações hospedeiro-parasitóide, nas quais o parasitóide desenvolve-se às custas dos tecidos do hospedeiro antes de matá-lo são exemplos típicos de interações íntimas e de longa duração entre espécies de insetos (Godfray, 1994) que podem oferecer condições ideais para transferências gênicas.

Entretanto, a identificação experimental do fenômeno de transferência horizontal é difícil, tendo em vista que este parece ser um fenômeno raro. Contudo, a presença das seqüências *P* e *gypsy* encontradas em parasitóides de *Drosophila* é um fato instigante, levantando a possibilidade destas vespas serem vetores, pelo menos mecânicos, destas seqüências. Além disto, um estudo mais aprofundado da presença destas seqüências como, por exemplo, o seqüenciamento do elemento completo para ambos os transposons e a seqüência flanqueadora no ponto de inserção permitirá entender melhor a biologia destes no material genético no qual está integrado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por recursos do CNPq, FAPERGS e PROPESQ-UFRGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberola, T.M. e de Frutos, R. (1996) Molecular structure of a *gypsy* element of *Drosophila subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res* **24**, 914–923.
- Alberola, T.M., Bori, L. e de Frutos, R. (1997) Structural analysis of *Drosophila subobscura* *gypsy* elements (*gypsyDs*). *Genetica* **100**, 39-48.
- Bayev Jr, A.A., Lyubomirskaya, N.V., Dzhumagaliev, E.B., Ananiev, E.V., Amiantova, I.G. e Ilyin, Y.V. (1984) Structural organization of transposable element *mdg4* from *Drosophila melanogaster* and a nucleotide sequence of its long terminal repeats. *Nucleic Acids Res* **12**, 3707-3723.
- Boeke, J.D. (1988) Retrotransposons. In: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P (eds) RNA genetics, vol II. Retroviruses, viroids, and RNA recombination. CRC, Boca Raton, pp 59–103.
- Boeke, J.D. e Corces, V.G. (1989) Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu Rev Microbiol* **43**, 403–434.
- Capy, P., Anxolabéhère, D. e Langin, T. (1994) The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends in Genetics* **10**, 7-12.
- Capy, P., Bazin, C., Higuët, D. e Langin, T. (1998) Dynamics and evolution of transposable elements. Landes Bioscience, Austin, Texas.
- Capy, P. (2005) Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet Genome Res* **110**:457-61.
- Carton, Y., Bouletreau, M., Van Lenteren, J.C. e Van Alphen, J.C.M. (1986) The *Drosophila* parasitic wasps. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3 (ed.

M. Ashburner, H. L. Carson, J. N. Thompson), pp. 347–394. New York: Academic Press.

Carton, Y. e Nappi, A.J. (1991) The *Drosophila* immune reaction and the parasitoid capacity to evade it: Genetic and coevolutionary aspects. *Acta Oecologia* **12**, 89–104.

Castro, J.P., e Carareto, C.M.A. (2004) *P* elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. *Mol Phylogenet Evol* **32**, 383–387.

Clark, J.B., Maddison, W.P. e Kidwell, M.G. (1994) Phylogenetic analysis supports horizontal transfer of *P* transposable elements. *Mol Biol Evol* **11**, 40-50.

Clark, J.B., Silva, J.C. e Kidwell, M.G. (2002) Evidence for horizontal transfer of *P* transposable elements. In: Syvanen M e Kado CI Academic Press, pp. 161-171.

Dahl, A., Krämer, F. e Schnieder, T. (2007) Detection of a *gypsy-like* sequence in the genome of the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché 1835). *Parasitol Res* **100**, 311–316.

Daniels, S.B., Peterson, K.R., Strausbaugh, .L.D., Kidwell, M.G., e Chovnick, A. (1990) Evidence for horizontal transmission of the *P* element between *Drosophila* species. *Genetics* **124**, 339-355.

Diaz, N.B. (1998) Cynipoidea. In: Biodiversidad de artrópodos argentinos. Una perspectiva biotaxonomica. Buenos Aires, Ed. Sur, C. Morrone (ed.) 599pp. p.399-407.

Dorsett, D., Viglianti, G.A., Rutledge, B.J., e Meselson, M. (1989) Alteration of *hsp82* gene expression by the *gypsy* transposon and suppressor genes in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **3**, 454-468.

Finnegan, D.J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* **5**, 103-107.

Fraser, M.J., Brusca, J.S., Smith, G.E. e Summers, M.D. (1985) Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology* **145**, 356-361.

Fraser, M. J. (1986) Transposon mediated mutagenesis of Baculoviruses: transposon shuttling and implications for speciation. *Ann Ent Soc Am* **79**, 773-783.

Fyrberg, E.A., Fyrberg, C.C., Biggs, J.R., Saville, D., Beall, C.J., e Ketchum, A. (1998) Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochemical Genetics* **36**, 271-287.

Godfray, H.C. (1994) Parasitoids, behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton.

Guimarães, J.A., Zucchi, R.A., Diaz, N.B., Souza Filho, M.F. e Uchôa, M.A.F. (1999) Espécies de Eucoilinae (Hymenoptera: Figitidae) parasitóides de larvas frugívoras (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae) no Brasil. *An Soc Entomol Brasil* **28**, 263-273.

Guimarães, J.A., Gallardo, F.E., Diaz, N.B. e Zucchi, R.A. (2003) Eucoilinae species (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoids of fruit-infesting dipterous in Brazil. Identity, geographical distribution and host associations. *Zootaxa* **278**, 1-23.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98

Heath, B.D., Butcher, R.D.J., Whitfield, W.G.F. e Hubbard, S.F. (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr Biol* **9**, 313-316.

Herédia, F., Loreto, E.L.S. e Valente, V.L.S. (2004) Complex evolution of *gypsy* in Drosophilid species. *Mol Biol Evol* **21**, 1831-1842.

Herédia, F., Loreto, E.L.S. e Valente, V.L.S. (2007) Distribution and conservation of the transposable element *gypsy* in drosophilid species. *Genet Mol Biol* **30**, 133-138.

- Houck, M.A., Clark, J.B., Peterson, K.R. e Kidwell, M.G. (1991) Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* **253**, 1125-1128.
- Jehle, J.A., Fritsch, E., Nickel, A., Huber, J. e Backhaus, H. (1995) *TC14.7*: a novel lepidopteran transposon found in *Cydia pomonella* granulosis virus. *Virology* **207**, 369-379.
- Jordan, I.K., Matyunina, L.V. e McDonald, J.F. (1999) Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12621-12625.
- Kidwell, M.G. (1992) Horizontal transfer of *P* elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica* **86**, 275-286.
- Kidwell, M.G. e Lisch, D.R. (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol* **15**, 95-99.
- Kidwell, M.G. e Lisch, D.R. (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution Int J Org Evolution* **55**, 1-24.
- Kim, A., Terzian, C., Santamaria, P., Péliesson, A., Prud'homme, N. e Bucheton, A. (1994) Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1285-1289.
- Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M. e Fukatsu, T. (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14280-14285.
- Lee, S.H., Clark, J.B. e Kidwell, M.G. (1999) A *P* element-homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. *Insect Molecular Biology* **8**, 491-500.
- Loreto, E.L., da Silva, L.B., Zaha, A. e Valente, V.L. (1998) Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. *Genetica* **101**, 153-165.

- Loreto, E.L., Valente, V.L., Zaha, A., Silva, J.C. e Kidwell, M.G. (2001) *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. *J Hered* **92**, 375-381.
- Ludwig, A. e Loreto, E.L. (2007) Evolutionary pattern of the *gtwin* retrotransposon in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Genetica* **130**, 161-168.
- Malik, H.S., Burke, W.D. e Eickbush, T.H. (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol Biol Evol* **16**, 793-805.
- Malik, H.S., Henikoff, S. e Eickbush, T.H. (2000) Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res* **10**, 1307-1318.
- Marques, E.K., Winge, H. e Cordeiro, A.R. (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *DIS* **41**, 187.
- Melk, J. e Govind, S. (1999) Developmental analysis of *Ganaspis xanthopoda*, a larval parasitoid of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **202**, 1885-1896.
- Miller, D.W. e Miller, L.K. (1982) A virus mutant with an insertion of a *copia*-like transposable element. *Nature* **299**, 562-564.
- Mizrokhi, L.J. e Mazo, A.M. (1991) Cloning and analysis of the mobile element *gypsy* from *Drosophila virilis*. *Nucleic Acids Res* **19**, 913-916.
- Nordlander, G. (1980) Revision of the genus *Leptopilina* Forster, 1869, with notes on the status of some other genera (Hymenoptera, Cynipoidea: Eucoilidae). *Ent Scand* **11**, 428-453.
- O'Hare, K. e Rubin, G.M. (1983) Structure of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34**, 25-35.
- Oliveira de Carvalho, M., Silva, J.C., e Loreto, E.L. (2004) Analyses of P-like transposable element sequences from the genome of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **13**, 55-63.

Perkins, H.D. e Howells, A.J. (1992) Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10753-10757.

Quicke, D.L.J. (1997) Parasitic Wasps. New York: Chapman & Hall.

Ratcliffe, S.T., Robertson, H.M., Jones, C.J., Bollero, G.A. e Weinzierl, R.A. (2002) Assessment of parasitism of house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) pupae by Pteromalid (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitoids using a polymerase chain reaction assay. *J Med Entomol* **39**, 52-60.

Rezende-Teixeira, P., Siviero, F., Andrade, A., Santelli, R.V. e Machado-Santelli, G.M. (2008) *Mariner*-like elements in *Rhynchosira americana* (Sciaridae) genome: molecular and cytological aspects. *Genetica* DOI 10.1007/s10709-007-9193-y.

Rio, D.C. e Rubin, G.M. (1986) Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable element. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8929-8933.

Rizki, R.M. e Rizki, T.M. (1990) Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8388-92.

Robe, L.J., Valente, V.L., Budnik, M. e Loreto, E.L. (2005) Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. *Mol Phylogenet Evol* **36**, 623-40.

Robertson, H.M. (1997) Multiple *Mariner* transposons in flatworms and hydras are related to those of insects. *J Hered* **88**, 195-201.

Robertson, H.M. e Engels, W.R. (1989) Modified *P* elements that mimic the *P* cytotype in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **123**, 815-24.

Sarkar, A., Sengupta, R., Krzywinski, J., Wang, X., Roth, C. e Collins, F.H. (2003) *P* elements are found in the genomes of nematoceran insects of the genus *Anopheles*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 381-387.

- Sassi, A.K., Herédia, F., Loreto, E.L.S., Valente, V.L.S. e Rohde, C. (2005) Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genet Mol Biol* **28**, 734-739.
- Shiba, T. e Saigo, K. (1983) Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element *copia* in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **302**, 119–124.
- Silva, J.C. e Kidwell, M.G. (2000) Horizontal transfer and selection in the evolution of *P* elements. *Mol Biol Evol* **17**, 1542-1557.
- Silva, J.C., Loreto, E.L. e Clark, J.B. (2004) Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. *Curr Issues Mol Biol* **6**, 57-71.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., e Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* **87**, 651–701.
- Song, S.U., Gerasimova, T., Kurkulos, M., Boeke, J.D. e Corces, V.G. (1994) An *env*-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus. *Genes Dev* **8**, 2046–2057.
- Stacey, S.N., Lansman, R.A., Brock, H.W. e Grigliatti, T.A. (1986) Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Mol Biol Evol* **3**, 522-534.
- Strand, M.R., Pech, L.L. (1995) Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu Rev Entomol* **40**, 31-56.
- Tautz, D., Hancock, J.M., Webb, D.A., Tautz, C. e Dover, G.A. (1988) Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* **5**, 366-376.
- Terzian, C., Ferraz, C., Demaille, J. e Bucheton, A. (2000) Evolution of the *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Mol Biol Evol* **17**, 908-914.

Van Alphen, J.J. e Visser, M.E. (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu Rev Entomol* **35**, 59-79.

Van Regenmortel, M.H.V. (2000) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. *7th report of the ICTV. Academic*, San Diego.

Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P. e Bouletreau, M. (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* **16**, 1711-1723.

Vázquez-Manrique, R.P., Hernández, M., Martínez-Sebastián, M.J., De Frutos, R. (2000) Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. *Mol Biol Evol* **17**, 1185-1193.

Vet, L.E.M. e Bakker, K. (1985) A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. II. A quantitative study on eight eucoilid species. *Oikos* **44**, 487-498.

Werren, J.H. e O'Neill, S.L. (1997) The evolution of heritable symbionts. In: O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A. and Werren, J.H., eds. *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford, England. Pp1-41.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P. e Schulman, A.H. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* **8**, 973-82.

Yoshiyama, M., Tu, Z., Kainoh, Y., Honda, H., Shono, T., Kimura, K. (2001) Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. *Mol Biol Evol* **18**, 1952-8.

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O aumento do conhecimento sobre a estrutura, a função e a dinâmica dos elementos transponíveis, bem como sobre as possíveis consequências evolutivas de sua presença nos genomas hospedeiros, vem ocorrendo em ritmo acelerado. Ultimamente, estão sendo disponibilizadas várias seqüências de genomas completos, tornando possível a realização de estudos comparativos e pesquisas abrangentes de elementos transponíveis baseados em sua diversidade, número e distribuição cromossômica. Estes dados também podem ser usados para reconstruir filogenias, ou estimar a idade de uma família de TEs, e podem ser particularmente úteis para elucidar seu provável envolvimento na arquitetura e função do genoma (Hua-Van *et al.*, 2005).

Os TEs desempenham um papel evolutivo muito importante no genoma hospedeiro, independentemente do modo pelo qual foram adquiridos (transferência horizontal, hibridização ou recombinação). Essas seqüências, além de acarretarem efeitos deletérios, quando a inserção acontece em genes e regiões regulatórias, ou neutros, quando se inserem em regiões não-codificantes; também podem produzir mutações e mudanças genéticas que são significantes contribuições para a evolução de seus hospedeiros. Na verdade, um número cada vez maior de evidências sugere que a atividade dos elementos transponíveis pode influenciar o fenótipo dos hospedeiros de muitas maneiras: alguns de seus efeitos são imediatos, diretos e óbvios; outros, entretanto, são sutis e podem demorar longos períodos de tempo para se manifestar completamente (Kidwell e Lish, 2001).

Vários autores têm proposto que elementos transponíveis mantêm-se nos genomas hospedeiros principalmente por invasão via transmissão horizontal. Sua

manutenção vertical levaria, incondicionalmente, à inativação e, conseqüentemente, a uma degradação por acúmulo de mutações (Pinsker *et al.*, 2001). Silva e Kidwell (2000) ressaltam que, no caso do elemento *P*, a transmissão horizontal seria o principal mecanismo, e talvez a única fonte de pressão seletiva sobre a transposase deste elemento. Neste sentido, somente TEs capazes de transposição sobreviveriam nos genomas das espécies, através de sucessivas ondas de invasão. Jordan e McDonald (1998) também enfatizam que os múltiplos e recentes eventos de transmissão horizontal na história evolutiva de *copia* sejam os fenômenos responsáveis pela sua sobrevivência em uma ampla distribuição de espécies.

Casos convincentes de transmissão horizontal eram limitados, até há bem pouco tempo, a elementos de classe II como *P*, *mariner* e *hobo* (Daniels *et al.*, 1990a; Simmons, 1992; Clark *et al.*, 1994; Lohe *et al.*, 1995). Entretanto, evidências sobre a importância deste fenômeno para os retrotransposons vêm se acumulando nos últimos anos, principalmente para elementos da família *Ty1-copia*, *412*, *gtwin* e *gypsy* (Flavell *et al.*, 1997; Cizeron *et al.*, 1998; Jordan e McDonald, 1998; Terzian *et al.*, 2000; Vázquez-Manrique *et al.*, 2000; Herédia *et al.*, 2004, 2007; Ludwig e Loreto, 2007).

Estes últimos trabalhos, que tratam da discussão do papel da transferência horizontal para a evolução dos seres vivos, vêm nos alertando para o fato deste fenômeno ser mais freqüente do que pensávamos. Neste contexto, os elementos transponíveis, com sua maquinaria própria e capacidade de inserção, figuram como ótimos vetores de troca genética.

A ocorrência de transferência horizontal, entretanto, requer alguns pressupostos que envolvem sobreposição geográfica e ecológica entre as entidades envolvidas, além de um mecanismo ou vetor de transferência. Sobre a primeira premissa, a sobreposição de substratos para alimentação e ovoposição dos organismos estudados, além da íntima relação física entre o hospedeiro e parasitóide cumpre com os requisitos necessários. Quanto ao vetor responsável pela transferência, muitos autores têm discutido a possível atuação de vírus, ácaros parasitas, vespas parasitóides e bactérias endosimbiontes (Houck *et al.*,

1991; Kidwell, 1992, Yoshiyama *et al.*, 2001). Se *gypsy* pode atuar como um retrovírus endógeno, uma vez que ele codifica uma proteína de envelope e possui propriedades infecciosas (Kim *et al.*, 1994), não seria necessário qualquer vetor intermediário para sua transferência horizontal entre as espécies.

Essas hipóteses são promissoras, porém vale a pena frisar que até a data, nenhuma delas teve comprovação experimental. Assim, nem em populações naturais nem de laboratório, se conseguiu criar condições desse fenômeno ser experimentalmente induzido ou visualizado.

Foi com o objetivo de contribuir para a compreensão do fenômeno de transferência horizontal através da busca de possíveis vetores de elementos transponíveis que foram realizados os trabalhos descritos nesta Tese de Doutorado. Por serem os elementos transponíveis mais estudados, e sobre os quais existe uma maior quantidade de informação, os elementos *P* e *gypsy* foram escolhidos para o nosso estudo.

O primeiro passo, descrito no segundo capítulo desta Tese, foi a procura de seqüências com homologia aos elementos transponíveis *P* e *gypsy*, no genoma de ácaros parasitas e vespas parasitóides de *Drosophila*. Traçando um panorama geral da presença destes elementos nos diferentes organismos, nosso trabalho mostrou que podem ser amplificadas seqüências com homologia aos elementos *P* e *gypsy* de *D. melanogaster* a partir do genoma de dois ácaros predadores de *Drosophila*, *Proctolaelaps sp.* e *Macrocheles muscaedomesticae*. Além destes organismos, seqüências dos mesmos elementos transponíveis foram amplificadas do genoma de vespas parasitóides pertencentes a quatro superfamílias: Cynipoidea, Ichneumonoidea, Chalcidoidea e Proctotrupoidea.

Este trabalho mostrou, pela primeira vez, a presença dos elementos *P* e *gypsy* no genoma destes ácaros e destas vespas parasitóides.

O terceiro capítulo desta Tese buscou resolver algumas das questões específicas da relação *Drosophila*/parasitóide associado. Em primeiro lugar, fomos a campo na tentativa de amostrar organismos vivendo em condições

naturais. A seguir, estabelecemos as condições de criação dos parasitóides em laboratório, conseguindo com isto, aumentar o tamanho das amostras e garantir um bom rendimento de DNA para os experimentos de biologia molecular.

Apesar da grande quantidade de informação disponível sobre *P* e *gypsy*, em diferentes organismos, este é o primeiro estudo sobre a associação parasitóide-hospedeiro, de microhimenópteros e *Drosophila*, para estes TEs. Além do trabalho de Houck *et al.*, (1991), há poucos trabalhos demonstrando que uma proximidade ecológica especialmente íntima, como a relação parasita-hospedeiro tenha contribuído para transferência horizontal de um elemento transponível (Yoshiyama *et al.*, 2001; Dahl *et al.*, 2007).

Este tipo de estudo só foi feito para estabelecer as relações parasita-hospedeiro para vespas parasitóides de mariposa portando o elemento *mariner* (Yoshiyama *et al.*, 2001), onde os autores viram que o parasitóide possui um elemento *mariner* com 97% de identidade de seqüência com seu hospedeiro, enquanto espécies de parasitóides relacionados não possuem *mariner*. Outro exemplo interessante encontra-se no trabalho de Dahl *et al.*, (2007), no qual os autores encontraram seqüências *gypsy-like* na pulga que parasita o gato doméstico.

A existência de seqüências com homologia aos elementos *P* e *gypsy* no genoma das vespas parasitóides que nós estudamos, e que são candidatas a vetores para elementos transponíveis em *Drosophila*, é um fato realmente interessante.

As análises para o elemento *gypsy* do nosso trabalho foram realizadas utilizando uma região de 485 pb do gene *env*, a mesma região estudada por Herédia *et al.* (2004) em 23 espécies da família Drosophilidae. Estes autores mostraram que este elemento possui um padrão complexo de evolução que inclui transmissão vertical, polimorfismo ancestral e detectaram nove possíveis casos de transmissão horizontal. Esta região também foi escolhida no nosso trabalho por ser a mais representativa em número de seqüências disponíveis no GenBank, podendo assim ser realizada uma análise filogenética em um próximo

momento. Com os resultados dos próximos seqüenciamentos e clonagens poderá ser realizada a análise filogenética com estes dados.

Alberola e De Frutos (1996) analisaram diferentes regiões de *gypsy* completo de *D. melanogaster*, *D. subobscura* e *D. virilis* e detectaram percentagens de divergência muito semelhantes ao longo das três ORFs neste retroelemento. Este dado é interessante, no sentido de validar nossas estimativas de divergência de uma região de *gypsy* para o elemento como um todo.

Vespas parasíticas são possivelmente um dos mais diversos grupos de insetos, constituindo um grande número de espécies ainda não estudadas em climas tropicais, subtropicais e temperados (Quicke, 1997). Estão presentes em uma variedade de *habitats* e ocupam muitos nichos ecológicos. Vespas parasíticas (ordem Hymenoptera) são parasitóides obrigatórios e matam seus hospedeiros quando completam seu desenvolvimento.

Uma das dificuldades iniciais do trabalho era a pouca quantidade de DNA obtido para realizar todas as análises necessárias. Com as coletas, eram obtidos somente alguns indivíduos. Com o objetivo de aumentar a quantidade de organismos disponíveis e, conseqüentemente, de DNA, foi proposta a criação destes organismos em laboratório, parasitando *D. melanogaster*.

Foram feitas inúmeras tentativas na busca de padronizar o meio de cultura adequado, o número de indivíduos necessários, entre outros aspectos da criação.

Não só foi estabelecida a criação de *Ganaspis sp.* (por até sete gerações), como foi estabelecida a criação dos organismos pertencentes à Superfamília Proctotrupeoidea (até o presente momento, por 3 gerações).

Entretanto, mesmo com uma quantidade razoável de DNA para os procedimentos, ainda existe outro impedimento: este DNA obtido contém algumas impurezas que dificultam sua utilização.

A produção de um baixo rendimento nas extrações de DNA, acompanhado de uma baixa qualidade do mesmo já foi discutida por outros autores (Ratcliffe *et al.*, 2002) como sendo resultado da presença de compostos inibitórios na cutícula destas espécies.

Foram testadas várias formas de se “limpar” este DNA, seja com kits comerciais ou protocolos disponíveis. As principais dificuldades encontradas foram no sequenciamento destas amostras (onde só obtivemos resultados positivos utilizando o equipamento que permite a “leitura” de menores quantidades de DNA) e na clivagem do DNA para a realização da técnica de *southern blot*.

Foram também realizadas tentativas de se visualizar cópias completas destes elementos no genoma dos microhimenópteros, por *southern blot*, porém, os resultados não foram conclusivos, tendo em vista a dificuldade encontrada para realizar a clivagem deste material (que parece ter realmente algum composto na cutícula que dificulte a clivagem pelas enzimas). Para confirmar a hipótese da clivagem parcial do DNA, uma das membranas foi re-hibridizada com uma sonda de rDNA, que hibridiza facilmente DNA de *Drosophila* e notou-se que realmente havia uma clivagem parcial, com pouquíssima hibridização. Foi utilizado como sonda o plasmídeo pDm 238 (Tautz *et al.*, 1988) que contém uma unidade completa (12 kb) do DNA ribossomal de *D. melanogaster* incluindo os genes 28S, 18S, 5.8S e 2S, ao lado das regiões espaçadoras ITS, IGS, ETS (GenBank M21017 e M29800).

Assim, entre as perspectivas, está melhorar a qualidade (limpeza) do DNA genômico para poder concluir a análise por *southern blot*.

Como não foram identificadas cópias completas destes elementos no genoma dos organismos estudados, uma possibilidade que não pode ser descartada é a de que estes elementos existam não-cromossomicamente, ou seja, possam estar nos genomas de organismos simbióticos, como *Wolbachia*, e/ou vírus. Ainda deve ser determinado se seqüências completas de *gypsy* e *P* podem existir no genoma destes microhimenópteros.

Ácaros são difíceis de analisar molecularmente, porque rendem quantidades muito pequenas de DNA, ainda mais se o DNA não estiver limpo o suficiente para uma amplificação por PCR eficiente (Jeyaprakash e Hoy, 2002).

As tentativas iniciais de manter os indivíduos de *Macrocheles muscaedomesticae* vivos em laboratório, para conseguir mais indivíduos, não obtiveram sucesso. O encontro de seqüências com homologia com *P* e *gypsy* neste e em outros ácaros (Capítulo II desta Tese) entretanto, é promissor.

O vetor de TEs envolvidos em transferência horizontal poderia ser outra fonte de diferenças entre Classe I e II. Até agora, as etapas envolvidas na TH não têm sido explicadas, e bactérias e vírus são freqüentemente propostos como prováveis vetores. Em artrópodos, *Wolbachia* poderia ser um bom candidato a vetor. Na verdade, esta α -proteobactéria endossimbionte é encontrada em cerca de 15-20% dos artrópodes, e é maternalmente transmitida. Além disso, vários eventos de transferência horizontal de *Wolbachia* foram descritas entre espécies de *Drosophila* e seus parasitóides (Vavre *et al.*, 1999).

Os indivíduos pertencentes à ordem Hymenoptera têm um sistema de determinação sexual haplodiplóide, então elementos transponíveis com efeitos deletérios serão expostos a seleção em machos haplóides (Sheppard e Heydon, 1986), e como resultado está previsto que sejam rapidamente eliminados dos genomas de himenópteros (Bigot *et al.*, 1992).

Entretanto, Bigot *et al.* (1994) encontraram que MLEs (*mariner-like elements*) estavam amplamente distribuídos em 25 de 27 espécies de himenópteros que os autores testaram. Os MLEs de duas dessas espécies foram sequenciados. Estes elementos podem ser mantidos apesar da haploidia nos machos porque eles não têm qualquer efeito deletério direto sobre a viabilidade dos insetos hospedeiros. Em adição, Bigot *et al.* (1994) encontraram evidências para sugerir que a maioria dos MLEs dos himenópteros residem em uma seqüência de inserção específica e sugerem que a sua inserção dos MLEs nesta região pode ser seletivamente neutra, explicando, então, sua manutenção em genomas de himenópteros. Uma explicação alternativa para esta inserção

específica é que MLEs em genomas de himenópteros são antigos e têm sido associados com seus genomas hospedeiros desde antes da divergência do taxa hospedeiro. Portanto, esta seqüência de inserção pode não ser conservada como resultado da preferência do MLE por um sítio de inserção seletivamente neutro, mas como resultado da inserção de um MLE ancestral que subsequente divergiu com o taxon hospedeiro.

Os mecanismos pelos quais a transferência horizontal de elementos não infectivos poderia ocorrer permanecem obscuros e provavelmente envolvem diversos vetores (Houck *et al.* 1991). Sabe-se que retrovírus possuem a capacidade de infectar novas espécies hospedeiras por transferência horizontal devido à sua propriedade infectiva conferida pela proteína do envelope (Env). O retrovírus endógeno *gypsy* de *D. melanogaster* codifica uma proteína Env (Kim *et al.* 1994; Song *et al.* 1994). Portanto, *gypsy* poderia potencialmente ser transferido de um indivíduo a outro sem a necessidade de um vetor, aumentando a probabilidade de transferência, quando comparado a retrotransposons não infecciosos.

Embora comum entre bactérias, acredita-se que a transferência gênica entre bactérias e eucariotos multicelulares ocorra raramente. No entanto, a presença de endosimbiontes, como *Wolbachia pipientis*, dentro de algumas linhagens germinativas eucarióticas poderia facilitar a transferência gênica bacteriana para genomas hospedeiros eucarióticos (Hotopp *et al.*, 2007).

Transmissão horizontal de *Wolbachia* parece ser freqüente em associações hospedeiro-parasitóide. Pode este fenômeno estar envolvido em outros intercâmbios genéticos entre espécies? O caso dos elementos transponíveis reveste-se de especial interesse, uma vez que se considera terem circulado entre as espécies (Kidwell, 1992). Podemos, assim, perguntar se eles utilizaram a mesma rota hospedeiro-parasitóide como *Wolbachia* e, ainda mais, se *Wolbachia* carregou-os enquanto "saltava" através das espécies (Vavre *et al.*, 1999).

Contudo, a presença destas seqüências é um fato instigante na busca de vetores e na possibilidade das vespas parasitóides serem vetores, pelo menos

mecânicos, destes elementos. Portanto, a continuidade do presente trabalho prevê ensaios de amplificação por PCR de possíveis seqüências de *Wolbachia* no genoma das vespas parasitóides e/ou nos ácaros parasitas de *Drosophila*.

Seqüências de mais dois taxa de vespas estão sendo ainda analisadas, além das do ácaro *M. muscaedomesticae*. Entretanto, existem dificuldades quanto à identificação dos organismos. Não existem muitas chaves taxonômicas disponíveis para microhimenópteros neotropicais, nos quais só foi possível se chegar ao nível de superfamília na maioria dos organismos. Contudo, novos contatos estão sendo feitos para poder ser concluída esta parte da análise.

Outro resultado interessante encontrado neste trabalho (mas que não está no corpo da tese) foi a amplificação por PCR, purificação e seqüenciamento de um fragmento amplificado com os *primers* para o gene mitocondrial *COII* a partir do genoma do ácaro *Macrocheles muscaedomesticae*, que poderá ser usado em outros estudos evolutivos futuros. Finalmente, cabe mencionar que mais um artigo resultará desta Tese. Ele diz respeito à análise das seqüências (ainda em andamento) de *P* e *gypsy* amplificadas do genoma de *M. muscaedomesticae*.

Concluimos este trabalho com várias dúvidas para serem ainda respondidas, mas inúmeras perspectivas foram abertas. Inclusive, seria necessário o seqüenciamento dos elementos completos isolados dos possíveis vetores – ácaros e vespas - para se ter uma visão ampla do grau de similaridade, principalmente nas regiões não codificantes.

Os dados apresentados nesta Tese demonstram ainda que a distribuição do elemento *P* e do retroelemento *gypsy* é ainda maior do que se havia suposto anteriormente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberola TM e De Frutos R (1996) Molecular structure of a *gypsy* element of *Drosophila subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res* 24: 914-923.

Alberola TM, Bori L e De Frutos R (1997) Structural analysis of *Drosophila subobscura* *gypsy* elements (*gypsyDs*). *Genetica* 100: 39-48.

Anxolabéhère D, Kidwell MG e Periquet G (1988) Molecular characteristics of diverse populations are consistent with the hypothesis of a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements. *Mol Biol Evol* 5: 252-269.

Ashburner, M (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1331 pp.

Axtell RC (1963) Effect of Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) on house fly production from dairy cattle manure. *J Econ Entomol* 56: 17-321.

Axtell RC (1964) Phoretic relationship of some common manure-inhabiting Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) to the house fly. *Ann Entomol Soc Am* 57: 84-87.

Bayev Jr AA, Lyubomirskaya NV, Dzhumagaliev EB, Ananiev EV, Amiantova IG e Ilyin YV (1984) Structural organization of transposable element *mdg4* from *Drosophila melanogaster* and a nucleotide sequence of its long terminal repeats. *Nucleic Acids Res* 12: 3707-3723.

Bigot Y, Hamelin MH, Capy P e Periquet G (1994) *Mariner*-like elements in hymenopteran species: insertion site and distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(8):3408-3412.

Bigot Y, Lutcher F, Hamelin MH e Periquet G (1992) The 28S ribosomal RNA-encoding gene of Hymenoptera: inserted sequences in the retrotransposon-rich

regions. *Gene* 121: 347-352.

Boeke JD e Stoye JP (1997) Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH e Varmus HE (eds) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 343-435.

Brookfield JF (2005) The ecology of the genome – mobile DNA elements and their hosts. *Nature Rev Genet* 6: 128-134.

Brosius J (1999) Genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences. *Genetica* 107: 209-238.

Bucheton A (1995) The relationship between the *flamenco* gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *Trends Genetics* 11: 349-353.

Burke WD, Eickbush DG, Xiong Y, Jakubczak J e Eickbush TH (1993) Sequence relationship of retrotransposable elements R1 and R2 within and between divergent insect species. *Mol Biol Evol* 10(1):163-85.

Capy P, Anxolabéhère D e Langin T (1994) The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends Genet* 10(1): 7-12.

Capy P, Bazin C, Higuët D e Langin T (1998) *Dynamics and evolution of transposable elements*. Landes Bioscience, Austin, Texas. 197pp.

Capy P, Gasperi G, Biemont C e Bazin C (2000) Stress and transposable elements: coevolution or useful parasites? *Heredity* 85: 101-106.

Carton Y e Nappi AJ (1997) *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol Today* 13: 218-226.

Carton Y e Nappi AJ (2001) Immunogenetics aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52: 157–164.

Carton Y, Boulétreau M, Van Alphen JMM e Van Lenteren JC (1986) The *Drosophila* Parasitic Wasps. In: The Genetics e Biology of *Drosophila*. Ashburner M, Carson HL e Thompson Jr. JN (eds). Academic Press, New York 3e: pp 347-394.

Casola C, Lawing A, Betran E e Feschotte C (2007) *PIF*-like transposons are common in *Drosophila* and have been repeatedly domesticated to generate new host genes. *Mol Biol Evol* 24: 1872–1888.

Castro JP e Carareto CM (2004) *Drosophila melanogaster* *P* transposable elements: mechanisms of transposition and regulation. *Genetica* 121: 107-118.

Cizeron G, Lemeunier F, Loevenbruck C, Brehm A e Biéumont C (1998) Distribution of the retrotransposable element *412* in *Drosophila* species. *Mol Biol Evol* 15: 1589-1599.

Clark JB, Maddison WP e Kidwell MG (1994) Phylogenetic analysis supports horizontal transfer of *P* transposable elements. *Mol Biol Evol* 11: 40-50.

Clark JB, Silva JC e Kidwell MG (2002) Evidence for horizontal transfer of *P* transposable elements. In: Syvanen M e Kado CI Academic Press, New York, pp. 161-171.

Craig NL, Craigie R, Gellert M e Lambowitz AM (2002) *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, DC. 1204 pp.

Cummings MP (1994) Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *TREE* 9: 141-145.

Dahl A, Krämer F e Schnieder T (2007) Detection of a *gypsy-like* sequence in the genome of the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché 1835) *Parasitol Res* 100: 311–316

Daniels SB, Chovnick A e Boussy IA (1990a) Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 7: 589-606.

Daniels SB, Peterson KR, Strausbaugh LD, Kidwell MG e Chovnick A (1990b) Evidence for horizontal transmission of the *P* element between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339-355.

Davis MB, Dietzet J, Standiford DM and Emerson Jr CP (1998) Transposable element insertions respecify alternative exon splicing in three *Drosophila* myosin heavy chain mutants. *Genetics* 150: 1105-1114

de Almeida LM e Carareto CM (2005) Multiple events of horizontal transfer of the *Minos* transposable element between *Drosophila* species. *Mol Phylogenet Evol* 35: 583-594.

Drosophila 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the phylogeny. *Nature* 450: 203-218.

Edson KM, Vinson SB, Stoltz DB e Summers MD (1981) Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. *Science* 211: 582-583.

Fellowes MD, Kraaijeveld AR e Godfray HC (1998) Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc Biol Sci* 265(1405): 1553--1558.

Fellowes MDE e Godfray HCJ (2000) The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity* 84: 1–8.

Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5: 103-107.

Flavell AJ, Pearce SR, Heslop-Harrison P e Kumar A (1997) The evolution of *Ty1-copia* group retrotransposons in eukaryote genomes. *Genetica* 100: 185-195.

Fleury F, Allemand R, Vavre F, Fouillet P e Boulétreau M (2000) Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive inferiority in *Drosophila* parasitoids. *Proc Roy Soc Lond B* 265: 1005–1010.

Fleury F, Ris N, Allemand R, Fouillet P, Carton Y e Boulétreau M (2004) Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica* 120: 181–194.

Ganko E (2006) LTR Retrotransposon-Gene Associations in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Evol* 62: 111-120.

Ganko EW, Bhattacharjee V, Schliekelman P e McDonald JF (2003) Evidence for the contribution of LTR retrotransposon to *C. elegans* gene evolution. *Mol Biol Evol* 20: 1925-1931.

Godfray HCJ (1994) Parasitoids, behavioral and evolutionary ecology. Princeton Univ Press, Princeton, NJ. 488 pp.

Hagemann S e Pinsker W (2001) *Drosophila P* transposons in the human genome? *Mol Biol Evol* 18: 1979–1982.

Hawkins CP e MacMahon J A (1989) Guilds: the multiple meanings of a concept. *Annu Rev Entomol* 34: 423-451.

Heath BD, Butcher RDJ, Whitfield GF e Hubbard SF (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr Biol* 9: 313- 316.

Herédia F, Loreto ELS e Valente VLS (2004) Complex evolution of *gypsy* in *Drosophilid* species. *Mol Biol Evol* 21:1831-1842.

Herédia F, Loreto ELS e Valente VLS (2007) Distribution and conservation of the transposable element *gypsy* in *drosophilid* species. *Genet Mol Biol* 30: 133-138.

Hotopp JC, Clark ME, Oliveira DC, Foster JM, Fischer P, Torres MC, Giebel JD, Kumar N, Ishmael N, Wang S, Ingram J, Nene RV, Shepard J, Tomkins J, Richards S, Spiro DJ, Ghedin E, Slatko BE, Tettelin H e Werren JH (2007) Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317: 1753-6.

Houck MA, Clark JB, Peterson KR e Kidwell MG (1991) Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* 253: 1125-1128.

Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P (2005) Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenet Genome Res* 110(1-4): 426-40.

Huigens ME, de Almeida RP, Boons PAH, Luck RF e Stouthamer R (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc R Soc B* 271: 509- 515.

Hurst GDD e Werren JH (2001) The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* 2: 597-606.

Ilyn YV, Chmeliauskaite VG e Georgiev GP (1980) Double-stranded sequences in RNA of *Drosophila melanogaster*: relation to mobile dispersed genes. *Nucleic Acid Res* 8: 3439-3457.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequence analysis of human genome. *Nature* 409: 860-921.

Jaenike J e James AC (1991) Aggregation and the coexistence of mycophagous *Drosophila*. *J Anim Ecol* 60, 913- 928.

Jaenike J, Polak M, Fiskin A, Helou M e Minhas M (2007) Interspecific transmission of endosymbiotic *Spiroplasma* by mites. *Biol Lett* 3: 23-25.

Jakubczak JL, Xiong Y e Eickbush TH (1990) Retrotransposable elements R1 and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3295-3299.

Jehle JA, Fritsch E, Nickel A, Huber J e Backhaus H (1995) TCI4.7: a novel lepidopteran transposon found in *Cydia pomonella* granulosis virus. *Virology* 207(2): 369-79.

Jehle JA, Nickel A, Vlak JM e Backhaus H (1998) Horizontal escape of the novel Tc1-like lepidopteran transposon TCp3.2 into *Cydia pomonella* granulovirus. *J Mol Evol* 46(2):215-224.

Jeyaprakash, A e Hoy, MA (2002) Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). *Biol Control* 25: 136- 142.

Jordan IK e McDonald JF (1998) Evolution of the *copia* retrotransposon in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol Biol Evol* 15: 1160-1171.

Jordan IK, Rogozin IB, Glazko GV and Koonin EV (2003) Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet* 19: 68-72.

Kidwell MG (1992) Horizontal transfer. *Curr Opin Genet Dev* 2(6): 868-873.

Kidwell MG e Lisch DR (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol* 15(3):95-99.

Kidwell MG e Lisch DR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genomic evolution. *Evolution Int J Org Evolution* 55: 1-24.

Kim A, Belyaeva ES e Aslanian MM (1990) Autonomous transposition of gypsy mobile elements and genetic instability in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 224: 03-308.

Kim A, Terzian C, Santamaria P, Péliçon A, Prud'homme N e Bucheton A (1994) Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1285-1289.

Kondo N, Nikoh N, Ijichi N, Shimada M e Fukatsu T (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(22):14280-14285.

Kraaijeveld AR, Van Alphen JJM e Godfray HCJ (1998) The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology* 116: S29–S45.

Krijger CL e Sevenster JG (2001) Higher species diversity explained by stronger spatial aggregation across six neotropical *Drosophila* communities. *Ecol Lett* 4: 106- 115.

Lee SH, Clark JB e Kidwell MG (1999) A *P* element-homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. *Insect Mol Biol* 8(4): 491-500.

Lerat E e Capy P (1999) Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. *Mol Biol Evol* 16: 1198-1207.

Lohe AR, Moriyama EN, Lidholm DA e Hartl D (1995) Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of *mariner*-like transposable elements. *Mol Biol Evol* 12: 62-72.

Lorenc A e Makalowski W (2003) Transposable elements and vertebrate protein diversity. *Genetica* 118: 183-191.

Loreto EL, da Silva LB, Zaha A e Valente VL (1998) Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. *Genetica* 101: 153-165.

Loreto EL, Valente VL, Zaha A, Silva JC e Kidwell MG (2001) *Drosophila mediopunctata* *P* elements: a new example of horizontal transfer. *J Hered* 92(5): 375-381.

Ludwig A e Loreto EL (2007) Evolutionary pattern of the *gtwin* retrotransposon in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Genetica* 130(2):161-168.

Mager DL, Hunter DG, Schertzer M and Freeman JD (1999) Endogenous retroviruses provide the primary polyadenization signal for two human genes (HHLA2 and HHLA3). *Genomics* 59: 255-263.

Malik HS, Henikoff S e Eickbush TH (2000) Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res* 10: 1307-1318.

Marín I e Lloréns C (2000). *Ty31Gypsy* retrotransposons: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. *Mol Biol Evol* 17: 1040-1049.

Maruyama K e Hartl DL (1991) Evidence for interspecific transfer of the transposable element *mariner* between *Drosophila* and *Zaprionus*. *J Mol Evol* 33: 514-524.

McAllister BF (1995) Isolation and characterization of a retroelement from a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 4: 253-262.

McAllister BF e Werren JH (1997) Phylogenetic analysis of a retrotransposon with implications for strong evolutionary constraints on reverse transcriptase. *Molecular Biology and Evolution* 14(1): 69-80.

Mejлумian L, Pelisson A, Bucheton A e Terzian C (2002) Comparative and functional studies of *Drosophila* species invasion by the *gypsy* endogenous retrovirus. *Genetics* 160: 201-209.

Miller K, Lynch C, Martin J, Herniou E e Tristem M (1999) Identification of multiple *Gypsy* LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. *J Mol Evol* 49: 358-366.

Mizrokhi LJ e Mazo AM (1991) Cloning and analysis of the mobile element *gypsy* from *Drosophila virilis*. *Nucleic Acids Res* 19: 913-916.

Montenegro H, Solferini VN, Klaczko LB e Hurst GDD (2005) Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* 14, 281- 287.

Nault LR (1997) Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann Entomol Soc Am* 90: 521:541.

Nekrutenko A e Li WH (2001) Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends in Genetics* 17: 619-621.

O'Hare K e Rubin GM (1983) Structure of *P* transposable elements and their sites of

insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. Cell 34: 25-35.

Oliveira de Carvalho M, Silva JC e Loreto EL (2004) Analyses of *P*-like transposable element sequences from the genome of *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol 13(1):55-63.

Pavan C e Stunkel TP (1982) Microhimenoptera parasito de *Drosophila*. Ciência e cultura (supl.) 34(7): 717.

Pélisson A, Teyssset L, Chalvet F, Kim A, Prud'Homme N, Terzian C e Bucheton A (1997) About the origin of retroviruses and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus with the *Drosophila flamenco* host gene. Genetica 100: 29-37.

Pereira C e de Castro MP (1945) Contribuição para o conhecimento da espécie tipo de *Macrocheles* Latr. (Acarina): *M. muscaedomesticae* (Scopoli, 1772). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo 16: 153-156.

Perkins HD e Howells AJ (1992) Genomic sequences with homology to the *P* element of *Drosophila melanogaster* occur in the blowfly *Lucilia cuprina*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 10753-10757.

Pinsker W, Haring E, Hagemann S e Miller WJ (2001) The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. Chromosoma 110: 148-158.

Polak M (1996) Ectoparasitic effects on host survival and reproduction: the *Drosophila-Macrocheles* association. Ecology 77(5): 1379-1389.

Quicke DLJ (1997) Parasitic Wasps. Chapman & Hall, London. 470 pp.

Ratcliffe ST, Robertson HM, Jones CJ, Bollero GA e Weinzierl RA (2002) Assessment of parasitism of house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) pupae by Pteromalid (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitoids using a polymerase chain reaction assay. J Med Entomol 39: 52-60.

Rezende-Teixeira P, Siviero F, Andrade A, Santelli RV e Machado-Santelli GM (2008) *Mariner-like* elements in *Rhynchosciara americana* (Sciaridae) genome: molecular and cytological aspects. *Genetica* DOI 10.1007/s10709-007-9193-y.

Rio DC e Rubin GM (1986) Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable element. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8929-8933.

Rodriguez JGC, Wade F e Wells CN (1962) Nematodes as a natural food for *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae), a predator of the house fly egg. *Ann Entomol Soc Am* 55:507-511.

Root RB (1967) The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. *Ecol. Monogr* 37: 317-350.

SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z e Bennetzen JL (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.

Sarkar A, Sengupta R, Krzywinski J, Wang X, Roth C e Collins FH (2003) *P* elements are found in the genomes of nematoceran insects of the genus *Anopheles*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 381–387.

Sassi AK, Herédia F, Loreto ELS, Valente, VLS e Rohde C (2005) Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genet Mol Biol* 28: 734-739.

Shiba, T and Saigo, K (1983) Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element *copia* in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 302: 119–124.

Silva JC e Kidwell MG (2000) Horizontal transfer and selection in the evolution of *P* elements. *Mol Biol Evol* 17: 1542-1557.

Silva JC, Loreto EL e Clark JB (2004) Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. *Curr Issues Mol Biol* 6: 57-71.

Simmons GM (1992) Horizontal transfer of *hobo* transposable elements within the *Drosophila melanogaster* species complex: evidence from DNA sequencing. *Mol Biol Evol* 9: 1050-1060.

Song SU, Gerasimova T, Kurkulos M, Boeke JD e Corces VG (1994) An env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus. *Genes Dev* 8: 2046-2057.

Stacey SN, Lansman RA, Brock HW e Grigliatti TA (1986) Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 3: 522-534.

Syvanen M e Kado CI (2002) *Horizontal Gene Transfer*. Academic Press, New York, 445pp.

Tautz D, Hancock JM, Webb DA, Tautz C e Dover GA (1988) Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 5(4): 366-376.

Terzian C, Ferraz C, Demaille J e Bucheton A (2000) Evolution of the *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Mol Biol Evol* 17: 908-914.

Ullu E e Tschudi C (1984) *Alu* sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* 312: 171-172.

Varricchio P, Gargiulo G, Graziani F, Manzi A, Pennacchio F, Digilio M, Tremblay E e Malva C (1995) Characterization of *Aphidius ervi* (Hymenoptera, Braconidae) ribosomal genes and identification of site-specific insertion elements belonging to the non-LTR retrotransposon family. *Insect Biochem Mol Biol* 25(5): 603-12.

Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P e Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16: 1711-1723.

Vázquez-Manrique RP, Hernández M, Martínez-Sebastián MJ e De Frutos R (2000) Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. Mol Biol Evol 17: 1185-1193.

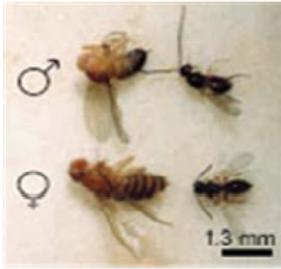
Waage JK e Hassel MP (1982) Parasitoids as biological control agents – a fundamental approach. Parasitology 84: 241-268.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P e Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat Rev Genet 8(12):973-82.

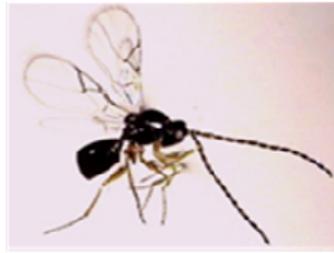
Yoshiyama M, Tu Z, Kainoh Y, Honda H, Shono T e Kimura K (2001) Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. Mol Biol Evol. 18(10): 1952-8.

Anexos

IMAGENS DE MICROHIMENÓPTEROS



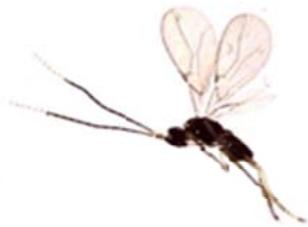
Adultos de *D. melanogaster* e *Ganaspis xanthophoda*, mostrando seus tamanhos relativos. Melk e Govind, 1999.



Ganaspis sp. Fêmea (esquerda) e macho (direita). Sassi, 2007.



Exemplares da Superfamília Proctotrupoidea, Família Diapriidae. Fêmea (esquerda) e macho (direita). Sassi, 2007.



Exemplar da Superfamília Ichneumonoidea. Sassi, 2003.



Exemplar da Superfamília Chalcidoidea. Sassi, 2003.