

## INVESTIGAÇÃO DE ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *P* EM LINHAGENS DE *Drosophila simulans* (STURTEVANT, 1919) (DIPTERA, DROSOPHILIDAE) DO BRASIL

YASMIN ABELAIRA<sup>1</sup>; MARCO SILVA GOTTSCHALK<sup>2</sup>; MONICA LANER BLAUTH<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [yasminabelaira@hotmail.com](mailto:yasminabelaira@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marco.gottschalk@yahoo.com](mailto:marco.gottschalk@yahoo.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [blauth.monica@gmail.com](mailto:blauth.monica@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos elementos transponíveis (TEs) foi realizada pela pesquisadora Bárbara McClintock (McClintock, 1951), que observou a capacidade de sequências mudarem de *locus* dentro do genoma e se moverem de um cromossomo para outro, e nomeou este mecanismo de transposição.

O elemento *P* é um dos elementos transponíveis melhor estudado. Foi primeiramente descrito em *D. melanogaster* e sua mobilização em células germinativas causa uma síndrome chamada disgenesia do híbrido (KIDWELL, M.; KIDWELL, J., 1977; SVED, 1976), caracterizada pela esterilidade parcial ou total, diversas quebras cromossômicas, altas taxas de mutações e recombinações em machos (CLARK; KIDWELL, 1997).

Daniels et al. (1990) evidenciaram que o elemento *P* não estava presente nas linhagens de *D. melanogaster* mais antigas. Para explicar a origem deste TE neste genoma, foi proposta a transferência horizontal do *P* de *D. willistoni* para *D. melanogaster*. O que embasa esta ideia é que: a sequência do *P* encontrado em *D. melanogaster* varia em apenas um nucleotídeo com o presente em *D. willistoni* na posição 32 (A > G), o que gera uma incongruência entre a filogenia do gênero *Drosophila* com a filogenia do elemento *P* (SILVA; KIDWELL, 2000); há uma distribuição descontínua deste TE nas linhagens de *D. melanogaster*; as duas espécies compartilham o mesmo nicho ecológico e utilizam os mesmos sítios de ovoposição, podendo ser parasitadas pelo ácaro *Proctolaelaps regalis* que poderia servir como vetor desta transferência horizontal (HOUCK et al., 1991).

Estudos recentes mostraram a presença do elemento *P* em *Drosophila simulans* da África do Sul, Flórida e Japão, desde 2012, 2010 e 2008 respectivamente, (KOFLEER et al., 2015 YOSHITAKE et al., 2018). A comparação da sequência do elemento *P* de *D. simulans* com *D. melanogaster* mostra a diferença de um nucleotídeo na posição 2040 (G > A), sugerindo uma possível transferência horizontal do elemento *P* de *D. melanogaster* para *D. simulans* devido a semelhança de suas sequências (KOFLEER et al., 2015).

Tendo em vista que não há estudos sobre elemento *P* em *D. simulans* da América do Sul, este presente trabalho busca investigar se este elemento já está presente nas linhagens do Brasil.

### 2. METODOLOGIA

Os exemplares de *D. simulans* utilizados foram coletados nos seguintes locais e anos: Florianópolis – SC (2019 e 2005), Ribeirão Preto – SP (2018), Capão do Leão (Horto Botânico Irmão Theodoro Luis) – RS (2018, 2014 e 2013), Rio Grande, Rio Grande (Ilha dos Marinheiros) – RS (2011), e Tangará da Serra – MT (2007 e

2008), e foram disponibilizados de acervos do Laboratório de Evolução e Genética de Insetos (LEGIN).

A extração de DNA foi feita de cinco indivíduos machos de cada amostra, utilizando o kit *Dneasy Blood & Tissue Kit*, seguindo o protocolo do fabricante (Qiagen).

Os iniciadores usados nas PCR foram do gene nuclear ribossomal 28S, usado no controle da qualidade do DNA, sendo realizado previamente à reação com o uso dos iniciadores para o elemento *P*. O primer para o elemento *P* foi sintetizado com auxílio do software Primer-BLAST disponibilizado pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com local de anelamento ilustrado na Figura 1, amplificando a região onde foi descrita a mutação no nucleotídeo 2040 (G > A) de *D. simulans*.

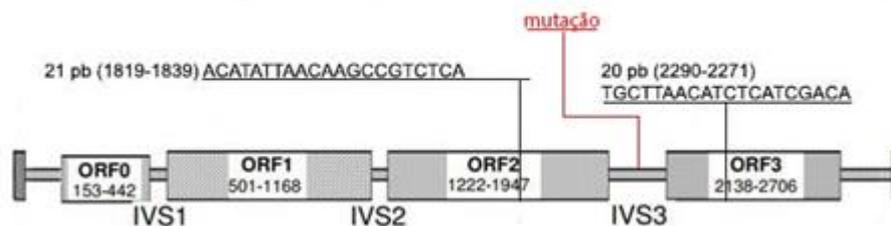


Figura 1 – Representação do elemento *P* canônico de *Drosophila melanogaster*. Sequência de 2,9kb mostrando as regiões codificadoras (ORF 0,1,2,3), os íntrons (IVS1, IVS2 e IVS3), a sequência de anelamento dos iniciadores sintetizados e o local da mutação na posição 2040. Os números entre parênteses indicam a posição do primer em pb. Modificado de Blauth (2005)

As reações utilizaram concentrações variáveis de DNA molde de *D. simulans*, entre 5 a 30ng, tendo como controle positivo 6ng de DNA de *D. melanogaster*, devido a grande identidade da sequência do elemento *P* entre as duas espécies, enquanto que para o controle negativo foi utilizado água. As condições da reação foram 2,5mMol de MgCl<sub>2</sub>, 20mMol de cada iniciador (*front* e *reverse*), tampão de reação 1x, 10mMol de dNTPs e 0,75U de taq DNA polimerase (Quatro G), obtendo-se um volume final de 15uL. O programa de amplificação utilizado para ambos os iniciadores foi de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento por 30 segundos a 50°C e extensão a 72°C por 60 segundos.

A verificação da extração de DNA genômico e produto de amplificação foi feita utilizando gel de agarose 0,8% eluído em TAE (Tris 10 mM, ácido acético 0,6% e EDTA 1 mM). A estimativa de quantidade de amostra de DNA foi feita comparando com o DNA de bacteriófago Lambda comercial (Invitrogen) e a estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados foi feita por comparação com padrão de peso molecular 1kB ou 50pb DNA *ladder* (Ludwig).

Os produtos de PCR das linhagens de São Paulo e Rio Grande do Sul foram encaminhados para sequenciamento em ambas orientações, a partir dos iniciadores usados na amplificação. A sequência do DNA das amostras foi editada utilizando o programa Staden 3.3 (STADEN, 1996). A comparação das sequências foi feita por alinhamento no programa ClustalW (Larkin et al., 2007).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da PCR foram descritos na Tabela 1, sendo que todos os controles positivos deram positivos e os controles negativos não geraram produto de amplificação, validando o resultado encontrado nas reações.

Tabela 1 – Resultados obtidos nas PCRs com as amostras de DNA das linhagens selecionadas para este estudo, com os iniciadores controle para qualidade do DNA (28S) e iniciadores para detectar a presença do elemento *P*.

Amostra	Iniciador 28S	Iniciador P
Capão do Leão, RS - 2013	Positivo	Negativo
Capão do Leão, RS - 2014	Positivo	Negativo
Capão do Leão, RS - 2018	Positivo	Positivo
Florianópolis, SC - 2005	Negativo	Não realizado
Florianópolis, SC - 2019	Positivo	Positivo
Ribeirão Preto, SP - 2018	Positivo	Positivo
Rio Grande, RS - 2011	Negativo	Não realizado
Tangará da Serra, MT - 2007	Positivo	Não realizado
Tangará da Serra, MT - 2008	Positivo	Não realizado

O resultado negativo na PCR utilizando os iniciadores 28S para as amostras de Rio Grande de 2011 e de Florianópolis de 2005, pode ser explicado devido as amostras estarem armazenadas em álcool 70% desde a sua coleta, o que causa degradação do DNA ao longo do tempo, diminuindo a quantidade de DNA íntegro na amostra, impedindo o sucesso da reação de PCR. Isto pode ser corroborado no estudo de GRUTZMACHER et al., (2006) que observou o efeito do período de armazenamento de *Acromyrmex heyeri* em álcool 75% na qualidade de DNA extraído e concluiu que quanto maior o período de armazenamento, menor é o sucesso de amplificação.

Apesar do resultado positivo para a amostra do Capão do Leão de 2018, as amostras de 2013 e 2014 obtiveram um resultado negativo para a presença do *P*, o que mostra uma distribuição descontínua e indica uma invasão deste TE nessas linhagens posteriormente a 2014.

A análise de uma parte da sequência do elemento *P* das linhagens do Capão do Leão e de Ribeirão Preto mostrou que as sequências são idênticas a das linhagens de outros continentes (KOFLEER et al., 2015; YOSHITAKE et al., 2018), o que indica uma rápida dispersão deste TE entre os continentes pela falta de mutações acumuladas em sua sequência. A linhagem de Florianópolis de 2019 também foi positiva para a presença do elemento *P*, porém o sequenciamento ainda deverá ser realizado.

### 4. CONCLUSÕES

A similaridade das sequências do elemento *P* em *D. simulans* da América do Sul com as sequências de linhagens da América do Norte, África e Ásia sugerem que este elemento dispersou rapidamente entre os continentes.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAUTH, M. L. Expressão de elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. Tese (doutorado em Genética e Biologia Molecular) – **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2005.

CLARK, J. B.; KIDWELL, M. G. A phylogenetic perspective on *P* transposable element evolution in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11428-11433, 1997.

DANIELS, S. B.; PETERSON, K. R.; STRAUSBAUGH, L. D.; KIDWELL, M. G.; CHOVNICK, A. Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, v. 124, p. 339-355, 1990.

GRUTZMACHER, D. D.; LOECK, A. E.; OLIVEIRA, A. C.; FISCHER, S.; ELIAS, S. A. Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de dna extraído de *Acromyrmex heyeri* (FOREL, 1899) (HYMPTERA: FORMICIDAE)

HOUCK, M. A.; CLARK, J. B.; PETERSON, K. R.; KIDWELL, M. G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. **Science**, v. 253, p. 1125-1129, 1991.

KIDWELL, M. G.; KIDWELL, J. F. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. **Genetics**, v. 86, p. 813-833, 1977.

KOFLER, R.; HILL, T.; NOLTE, V.; BETANCOURT, A. J.; SCHLÖTTERER, C. The recent invasion of natural *Drosophila simulans* populations by the *P*-element. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 6659-6663, 2015.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; THOMPSON, J. D. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. v. 23, p. 2947-2948, 2007.

MCCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 16, p. 13-47, 1951.

SILVA, J. C.; KIDWELL, M. G.; Horizontal transfer and selection in the evolution of *P* elements. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1542-1557, 2000.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**. v. 5, p. 233, 1996.

SVED, J. A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a possible explanation in terms of spatial organization of chromosomes. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 29, p. 375-388, 1976.

YOSHITAKE, Y.; INOMATA, N.; SANO, M.; KATO, Y.; ITOH, M. The *P* element invaded rapidly and caused hybrid dysgenesis in natural populations of *Drosophila simulans* in Japan. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 9590-9599, 2018.