

BRUNA WILDEMANN

**ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DO  
POLIMORFISMO DE INVERSÃO CROMOSSÔMICA DE  
*Drosophila polymorpha* (Diptera, Drosophilidae) E SUA  
RELAÇÃO COM GENES DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)  
INDUZIDOS POR ESTRESSE FÍSICO/QUÍMICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Angelica F. Maris; Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Daniela C. De Toni

FLORIANÓPOLIS  
2014



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wildemann, Bruna

Análise do desenvolvimento e estudo do polimorfismo de inversão cromossômica de *Drosophila polymorpha* (Diptera, Drosophilidae) e sua relação com genes de choque térmico (Hsps) induzidos por estresse físico/químico / Bruna Wildemann ; orientador, Angelica F. Maris ; coorientador, Daniela C. De Toni. - Florianópolis, SC, 2014.  
106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Arranjos cromossômicos. 3. Ciclo de vida. 4. Elementos de Müller. 5. Grupo cardini. I. Maris, Angelica F.. II. De Toni, Daniela C.. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.



“Análise do desenvolvimento e estudo do polimorfismo de inversão cromossômica de *D. polymorpha* (Diptera, Drosophilidae) e sua relação com genes de choque térmico (Hsps) induzidos por estresse físico/químico.”

por

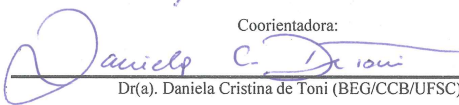
Bruna Wildemann

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 12/PPGBCD/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientadora:

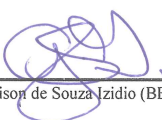
  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Angelica Francesca Maris (Presidente/Orientadora)

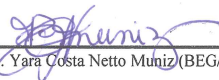
Coorientadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Daniela Cristina de Toni (BEG/CCB/UFSC)

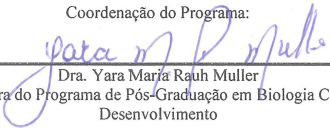
Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Luis Eduardo Maestrelli Bizzo (UNIVALI)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Geison de Souza Izidio (BEG/CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Yara Costa Netto Muniz (BEG/CCB/UFSC)

Coordenação do Programa:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Yara Maria Rauh Muller  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 11 de agosto de 2014.



Dedico esta conquista aos meus pais, Osmar e Salete.





## AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram e fizeram parte desta conquista. Muito obrigada:

As minhas orientadoras, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela De Toni por toda orientação, atenção e carinho ao longo dos 4 anos que fiz parte da equipe do laboratório de Drosofilideos, e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angelica Maris por ter aceitado fazer parte deste trabalho, me orientando e aprendendo um pouco sobre o mundo das Drosófilas.

Aos membros da banca, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Muniz, Prof. Dr. Geison Izídio, Prof. Dr. Luis Bizzo e Prof. Dr.<sup>a</sup> Mitsue Brianti por gentilmente aceitarem o convite e contribuírem com meu trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Thyago, Mauro, Michele, Marcos, prof. Dr. Luis Bizzo, Prof. Dr. Paulo Hoffmann, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Norma Machado e tantos outros que passaram por lá e auxiliaram nas coletas, manutenção do estoque, limpeza de vidrarias, etc.

A equipe do laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de Drosófilas da Universidade do estado de São Paulo - UNICAMP, em especial ao prof. Dr. Louis Klazcko e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mitsue Brianti por terem me recebido e dedicado seu tempo no ensinamento da técnica de hibridização *in situ* (*FISH*).

Aos meus pais, Osmar e Salete a quem dedico esse trabalho, pois são os responsáveis por tudo que conquistei até agora. Muito obrigada pelo apoio, amor e carinho.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Gordon por todo amor e dedicação comigo e por iluminar os meus dias.

A toda minha família e todos os meus amigos que estando perto ou distante são muito importantes na minha vida.

A CAPES pela bolsa de estudos, FAPESC no financiamento das pesquisas e FATMA pelo auxílio no trabalho de campo.



## RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o ciclo de vida, o polimorfismo de inversão cromossômica e a possível relação dos arranjos com genes de estresse (*hsps*). O material de estudo foi coletado em três diferentes unidades de conservação (UCs) de Santa Catarina: Parque estadual da Serra do Tabuleiro, Reserva Biológica da Canela Preta e Reserva Biológica do Aguai. Primeiramente foi feito o estudo do desenvolvimento de *D. polymorpha*, registrando a duração média do seu ciclo de vida bem como a maturidade sexual dos machos e fêmeas. A determinação dos elementos de Müller em *D. polymorpha* foi realizada por homologia de bandas com a espécie *D. unipunctata*. A fim de determinar os arranjos mais frequentes nas regiões de coleta, foi feito o estudo do polimorfismo de inversão cromossômica. Os arranjos 2RA e 2RD, já descritos anteriormente, apresentaram alta frequência nas populações. Estes arranjos provavelmente estão fixados nestas populações e possivelmente estão sendo mantidos pela ação da seleção natural. Com o auxílio de mapa cromossômico de *D. polymorpha* mais atualizado, a localização de um ponto de quebra de cada uma das inversões 2RA e 2RD foi reanotada. Também descrevemos uma nova inversão no cromossomo X de *Drosophila neocardini* (Grupo *cardini*). A expressão de *puffs* nos cromossomos politênicos de larvas de *D. polymorpha*, quando submetidas a estresse, permitiu estimar os possíveis genes *hsps* induzidos, quando comparando sua localização nos elementos de Müller em outras espécies. Esta análise revelou conservação entre *D. polymorpha* e *D. unipunctata*, que partilham grande reorganização gênica ao longo dos elementos quando comparadas a *D. melanogaster*. A análise comparativa dos elementos por homologia de bandas não verificou a ocorrência de *puffs* em resposta aos estresses testados (choque térmico, anoxia e privação alimentar) muito próximos ou dentro das regiões de inversão. Também não verificamos diferenças marcantes entre a expressão dos mesmos entre os indivíduos com ou sem os arranjos estudados. No entanto, o gene *hsp70* não está tão distante das inversões no braço cromossômico 2R, e talvez fosse interessante testar sua expressão com métodos moleculares uma vez que mudanças na expressão de *hsps* tem sido importantes na adaptação de outras espécies.

Palavras-chave: arranjos cromossômicos, ciclo de vida, seleção natural, *hsp*, grupo *cardini*, elementos de Müller



## ABSTRACT

The general objective of this work was to study the life cycle and chromosomal inversion polymorphisms, and their possible relation with heat shock genes. The object of our study was collected in three different conserved areas in the Santa Catarina: Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, Reserva Biológica da Canela Preta e Reserva Biológica do Aguai. The life cycle of *D. polymorpha* was described, as was the age at which sexual maturity is reached for both males and females. In order to be able to determine Müller's elements for *D. polymorpha*, a chromosomal homology between *D. polymorpha* and *D. unipunctata* was performed. A chromosomal polymorphism was carried out in order to establish the most frequent chromosomal arrangements in *D. polymorpha* from the collection sites. The arrangements 2RA and 2RD showed high frequencies in the populations. These arrangements are possibly being maintained due to natural selection. They also may have preserved the new gene configuration since they can provide a suitable combination of environmental conditions in which this species is located. Furthermore, during the study of chromosomal polymorphisms, the breakpoints of inversions 2RA and 2RD were re-evaluated. Also, a new paracentric inversion was described in chromosome X in *Drosophila neocardini* (*cardini* group). The expression of *puffs* in the polytene chromosomes allowed for the comparative analyses of their location and *hsp* genes location when they are induced in different species. The analysis showed conservation between *D. polymorpha* and *D. unipunctata* elements. Also, these species have in common the extensive reorganization of their elements when compared to *D. melanogaster*. The comparative analysis of Müller's elements through banding homology did however not confirm occurrence of puffs in response to stressors (heat shock, hypoxi, starvation) near or inside inversion loops, neither did it produce noticeable differences between their gene expression in individuals with or without the arrangements. The *hsp70* gene shows a certain proximity to the inversion loops in the chromosome 2R, and the possible intervention in its expression is not totally discarded. Its expression should be tested by means of molecular tools since changes in *hsps* expressions have been relevant in the adaptation reported in other species.

Key-words: Chromosomal arrangements, life cycle, natural selection, *hsp*, *cardini* group, Müller's elements



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. . Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....   | 17 |
| Figura 2. Filogenia do gênero <i>Drosophila</i> .....   | 19 |
| Figura 3. Classificação e divisão das espécies do grupo <i>cardini</i> .....  | 20 |
| Figura 4. . <i>Drosophila polymorpha</i> .....  | 21 |
| Figura 5. Placa metafásica de glânglio cerebral de macho de <i>D. polymorpha</i> .....  | 22 |
| Figura 6. Cromossomos politênicos de <i>D. polymorpha</i> . .....   | 23 |
| Figura 7. Cariótipos <i>D. medipunctata</i> (ancestral) e <i>D. melanogaster</i>  | 24 |
| Figura 8. Formação de gametas recombinantes.....  | 27 |
| Figura 9. Efeito de posição.....  | 29 |
| Figura 10. Mapa de Santa Catarina .....   | 37 |
| Figura 11. Ciclo de vida de <i>D. polymorpha</i> .....  | 41 |
| Figura 12. Configuração cariotípica de <i>D. unipunctata</i> e <i>D. polymorpha</i> .....   | 43 |
| Figura 13. Elementos de Müller A, B e C em <i>D. polymorpha</i> .....   | 45 |
| Figura 14. Elementos de Müller D e E em <i>D. polymorpha</i> .....  | 46 |
| Figura 15. Rearranjos encontrados em cromossomos politênicos de linhagens de <i>D. polymorpha</i> provenientes do Parque estadual da Serra do Tabuleiro. .... | 47 |
| Figura 16. Rearranjos encontrados em cromossomos politênicos de linhagens de <i>D. polymorpha</i> provenientes da Reserva Biológica da Canela Preta.....      | 48 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17. Rearranjos encontrados em cromossomos politênicos de linhagens de <i>D. polymorpha</i> provenientes da Reserva Biológica Estadual do Aguaf ..... | 48 |
| Figura 18. Comparação do padrão de pufação da região 42c entre indivíduo controle e submetido a choque térmico de 37°C .....                                | 50 |
| Figura 19. Comparação do padrão de pufação das regiões 62c, 64a/b, 77/78 entre indivíduo controle e submetido a choque térmico de 37°C                      | 51 |
| Figura 20. Comparação do padrão de pufação da região 02 entre indivíduo controle e indivíduo submetido a choque térmico 37°C ....                           | 52 |
| Figura 21. Comparação do padrão de pufação da região 42c entre indivíduo controle e submetido à anoxia.....   | 53 |
| Figura 22. Comparação do padrão de pufação da região 77/78 entre indivíduos controle e submetidos à anoxia .....  | 54 |
| Figura 23. Comparação do padrão de pufação da região 02 entre indivíduo controle e submetido a anoxia.....  | 55 |
| Figura 24. Comparação do padrão de pufação da região 42c e 41b entre indivíduo controle e submetido à privação alimentar de 12h....                         | 56 |
| Figura 25. Comparação do padrão de pufação da região 62c, 64a/b e 77/78 entre indivíduo controle e submetido à privação alimentar de 12h .....              | 57 |
| Figura 26. Comparação do padrão de <i>puffs</i> entre os elementos de Müller de <i>D. polymorpha</i> e <i>D. melanogaster</i> .....                         | 65 |
| Figura 27. . Localização de genes <i>hsp70</i> nos elementos de Müller E em três espécies.....  | 67 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. . Homologia cromossômica entre os elementos de Müller em <i>D. melanogaster</i> e espécies do gênero <i>Drosophila</i> .....   | 24 |
| Tabela 2. Espécies do subgrupo cardini e o número de inversões até o momento descritas.....  | 30 |
| Tabela 3. Arranjos descritos para <i>Drosophila polymorpha</i> .....   | 30 |
| Tabela 4. Concentração de mRNA de <i>hsps</i> em populações de RNA de vários estágios do desenvolvimento normal de <i>D. melanogaster</i> .....  | 32 |
| Tabela 5. Principais genes de proteínas de choque térmico ( <i>hsps</i> ), localização nos cromossomos politênicos e fatores estressantes que induzem a expressão gênica em <i>Drosophila melanogaster</i> ..... | 33 |
| Tabela 6. Homologia cromossômica entre os elementos de Müller em <i>D. unipunctata</i> (Brianti et al., 2012) e <i>D. polymorpha</i> .....   | 43 |
| Tabela 7. Número total de isolinhagens e de isolinhagens que apresentaram determinado arranjo nos respectivos locais de coleta ..  | 49 |



# SUMÁRIO

## CAPITULO I

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 17 |
| 1.1 <i>Drosophila</i> e seu ciclo de vida .....  | 17 |
| 1.2 Grupo cardini e <i>Drosophila polymorpha</i> .....   | 18 |
| 1.3 Cromossomos politênicos e Elementos de Müller .....  | 22 |
| 1.4 Polimorfismo de inversão cromossômica .....  | 25 |
| 1.5 <i>Hsps</i> e mecanismo de defesa a estresse.....  | 31 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 35 |
| 2.1 Objetivo Geral.....  | 35 |
| 2.2 Objetivos específicos .....  | 35 |
| 3. MATERIAS E MÉTODOS .....  | 37 |
| 3.1 Coleta de <i>D. polymorpha</i> .....   | 37 |
| 3.2 Identificação e estoque.....   | 38 |
| 3.3 Análise do ciclo de vida e desenvolvimento .....   | 38 |
| 3.4 Preparação citológica .....  | 38 |
| 3.5 Homologia de bandas – Elementos de Müller .....  | 38 |
| 3.6 Indução de <i>puff</i> .....   | 39 |
| 4. RESULTADOS .....  | 41 |
| 4.1 Ciclo de vida e desenvolvimento de <i>D. polymorpha</i> .....  | 41 |
| 4.2 Elementos de Müller em <i>D. polymorpha</i> .....  | 42 |
| 4.3 Análise do polimorfismo de inversão cromossômica .....   | 47 |
| 4.4 Indução de <i>puff</i> .....   | 50 |
| 5. DISCUSSÃO.....  | 59 |
| 6. CONCLUSÕES.....   | 71 |
| 7. PERSPECTIVAS .....  | 73 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 75 |
| APÊNDICE .....   | 87 |
| 1. Ciclo de vida de <i>D. polymorpha</i> .....   | 87 |
| 2. Registro de uma nova inversão reanotação de pontos de<br>quebras de inversões em espécies do grupo <i>cardini</i> ..... | 93 |



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Drosophila* e seu ciclo vida

Há mais de um século de estudo *Drosophilas* têm sido usadas como organismo modelo auxiliando a desvendar uma série de processos biológicos na genética e hereditariedade, desenvolvimento embrionário, envelhecimento, ecologia, conservação, entre outros aspectos. Pertencente à Ordem Diptera (Classe Insecta), da Família Drosophilidae, o Gênero *Drosophila*, apesar de ser um organismo distante filogeneticamente dos humanos, apresenta grande homologia de seqüências gênicas, mecanismos biológicos fundamentais e vias que controlam o desenvolvimento e sobrevivência, mostrando um padrão conservado entre a evolução destas espécies, assim como todos bilatérios (Jennings, 2011).

Como organismo modelo, moscas da espécie *D. melanogaster*, em particular, são um dos mais bem conhecidos e estudados, com ciclo de vida completamente elucidado. Sofrem metamorfose completa, completando todas as fases do seu ciclo (ovo, larva, pupa, adulto) em torno de 10 dias à 25°C e com disponibilidade adequada de alimento (figura 1, Prasad & Joshi, 2003). Aspectos de cada etapa do desenvolvimento estão relacionados com as peculiaridades da história de vida de cada espécie.

Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Esquema representando a duração das fases do ciclo de vida à temperatura de 25°C.



As características na história de vida são componentes críticos da adaptabilidade e frequentemente refletem respostas adaptativas da pressão ambiental. Populações naturais de *Drosophila melanogaster* exibem padrões de expectativa de vida, fecundidade, tempo de desenvolvimentos, tamanho corporal e resistência ao estresse que variam previsivelmente ao longo do gradiente ecológico (Paaby, 2009). Além disto, a interação com fatores genéticos, geradores da sua história evolutiva, age também como fator determinante no ciclo das espécies (Prasad & Joshi, 2003).

Assim, há uma considerável variabilidade interespecífica no tempo de duração de cada etapa do desenvolvimento, o que acaba também tornando este gênero um modelo animal de estudo bastante versátil (Jennings, 2011). O conhecimento aprofundado das fases do desenvolvimento em *Drosophila* pode elucidar questões evolutivas neste gênero, auxiliando na compreensão dos mecanismos de diferenciação morfológica durante o processo de especiação, entre outras.

Frente à relevância do ciclo de vida de uma espécie tanto na compreensão de aspectos ecológicos particulares como a manutenções dos estoques para o estudo, um dos objetivos propostos neste projeto é elucidar o ciclo de vida de *D. polymorpha*, caracterizando cada uma de suas etapas do desenvolvimento do ovo ao adulto.

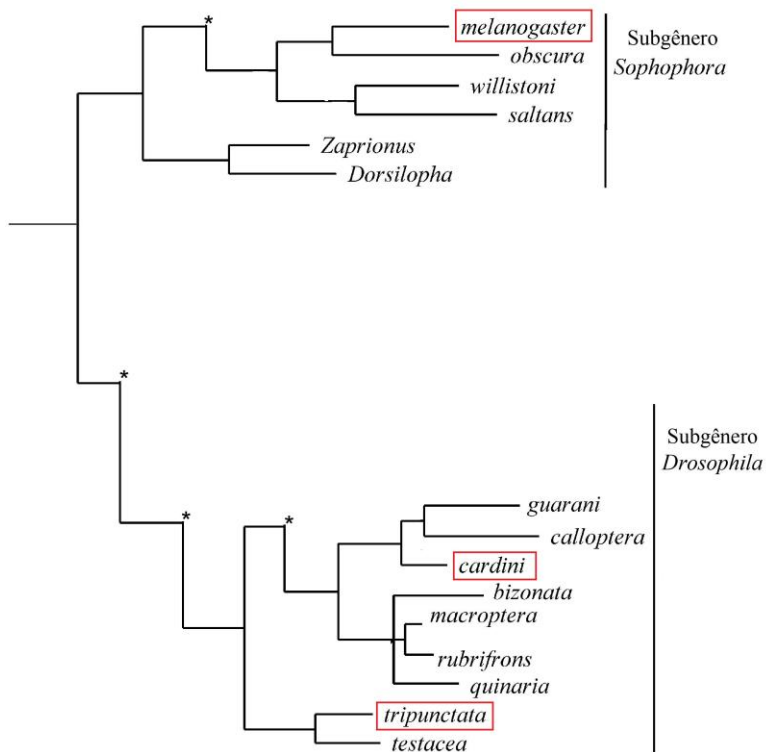
Até o momento, há apenas a informação de que o ciclo de vida desta espécie tem duração de 15 dias à 22°C (Markow & O'Grady, 2006).

## 1.2 Grupo *Cardini* e *Drosophila polymorpha*

A família Drosophilidae (Classe Insecta: Ordem Diptera) compreende mais de 4000 espécies (Bächli, 2014) que são conhecidas popularmente como mosca-da-fruta ou do vinagre. Estas espécies estão agrupadas em 62 gêneros e o maior deles é o gênero *Drosophila* composto por 15 subgêneros. Entre os 15 subgêneros descritos para o gênero *Drosophila*, merecem destaque por seu alto número de espécies os subgêneros *Drosophila*, com 759 espécies, e *Sophophora* com 233 espécies; subgêneros que divergem cerca 55 de milhões de anos (Wheeler, 1981; Robe, 2005).

A radiação evolutiva que originou o subgênero *Drosophila* foi a mais complexa e sofreu várias sub-radiações. O grupo *cardini* está compreendido dentro da radiação *tripunctata* deste subgênero, que teve sua origem no Novo Mundo (Throckmorton, 1975, figura 2).

Figura 2. Filogenia do gênero *Drosophila* - subgêneros *Sophophora* e *Drosophila*. Destaque em vermelho para os grupos *melanogaster*, *cardini* e *tripunctata* os quais serão mencionados neste trabalho; \* Para a clareza da figura foram omitidos os ramos. Figura modificada de Remsen e O'Grady, 2002.



O grupo *cardini* foi estabelecido por Sturtevant em 1942 e divide-se em dois subgrupos com distribuição diferenciada: Subgrupo *dunni*, com total de sete espécies distribuídas nas ilhas do Caribe e subgrupo *cardini* com nove espécies distribuídas na América neotropical – do México ao sul do Brasil e o norte da Argentina (Heed e Russell, 1971; figura 3).

Figura 3. Classificação e divisão das espécies do grupo *cardini* nos seus respectivos subgrupos. Destaque para *D. polymorpha*, objeto de estudo deste trabalho. Ao lado de cada espécie se encontra a referência de sua primeira descrição.

|  |   |
|--|---|
| Família:<br><u>Drosophilidae</u>       |   |
| Gênero:<br><u><i>Drosophila</i></u>    |   |
| Subgenero:<br><u><i>Drosophila</i></u> |   |
| Grupo:<br><u><i>D. cardini</i></u>     |   |
| Subgrupo:<br><u><i>cardini</i></u>     |   |
|  | <i>D. bedichecki</i> (Heed & Russal, 1971)<br><i>D. acutilabella</i> (Stalker, 1953)<br><i>D. cardini</i> (Sturtevant, 1916)<br><i>D. cardinoides</i> (Dobzhansky & Pavan, 1943)<br><i>D. neocardini</i> (Streisinger, 1946)<br><i>D. neomorpha</i> (Heed & Wheeler, 1957)<br><i>D. parthenogenetica</i> (Stalker, 1953)<br><i>D. polymorpha</i> (Dobzhansky & Pavan, 1943) |
| <i>dunni</i>                           | <i>D. procardinoides</i> (Frydenberg, 1956)   |
|  | <i>D. antilea</i> (Heed, 1962)<br><i>D. arawakana</i> (Heed, 1962)<br><i>D. belladunni</i> (Heed & Krishnamurthy, 1959)<br><i>D. caribiana</i> (Heed, 1962)<br><i>D. dunni</i> (Townsend & Wheeler, 1955)<br><i>D. nigrodunni</i> (Heed & Wheeler, 1957)<br><i>D. similis</i> (Williston, 1896)   |

Os padrões de morfologia externa do grupo *cardini* são bastante característicos, com tergitos que se fundem nas laterais, o que facilita a identificação taxonômica do grupo. No entanto, entre espécies deste grupo, a diferença na morfologia externa é bastante sutil sendo muitas



vezes necessário recorrer à morfologia da genitália interna e externa do macho, ou seja: *edeagus* e os *sustilus*, respectivamente (De Toni et al., 2005).

A espécie *Drosophila polymorpha* (figura 4), pertencente a subgrupo *cardini*, tem recebido historicamente grande atenção dos pesquisadores devido aos seus polimorfismos de pigmentação (Da Cunha, 1949; Heed e Blake, 1963; Martinez e Cordeiro, 1970, Brisson et al., 2005; Brisson, et al., 2006) e inversões cromossômicas (Da Cunha et al., 1953; Heed e Russel, 1971; Rohde e Valente, 1996; De Toni et al. 2001). Sua distribuição é ampla: desde o sul da América do Norte até o sul da América do Sul (Bächli, 2014) e se caracteriza por apresentar uma distribuição clinal do polimorfismo de pigmentação, com indivíduos mais claros ao sul e mais escuros ao norte (Heed, 1963). Esta espécie apresenta também um padrão fenotípico sazonal (Machado et al., 2001), onde os indivíduos escuros aumentam em número durante os períodos mais frios do ano, por volta de 13°C, o que parece ter uma explicação fisiológica ainda não totalmente elucidada.

Figura 4. *Drosophila polymorpha*. Espécie objeto de estudo deste trabalho. Fonte: Presente trabalho



No Brasil, o grupo *cardini* tem apresentado considerável frequência em estudos taxonômicos em regiões de Mata Atlântica (Bizzo et al, 2010; De Toni et al., 2007). A espécie *D. polymorpha* em particular, se mostra mais frequente na região Sul do país (Da Cunha et al., 1953), sendo encontrada tanto em florestas quanto em ambientes abertos e úmidos (Sene et al., 1980). Além disto, esta espécie apresenta preferência por locais preservados ou com pouca intervenção humana (Gottschalk et al., 2007). Em coletas realizadas no Estado de Santa Catarina, em área coberta por Mata Atlântica de Florianópolis, De Toni e Hofmann (1994) encontraram *D. polymorpha* em todos os meses do ano e constataram esta espécie como a segunda mais abundante dentro das comunidades analisadas.

### 1.3 Cromossomos politênicos e elementos de Müller

Os cromossomos politênicos foram descritos por Balbiani em 1881, como estruturas nucleares em células das glândulas salivares e dos túbulos de Malpighi de larvas da mosca do gênero *Chironomus*. Em *Drosophila* foram pela primeira vez observados por Painter em 1933. Também conhecidos como cromossomos gigantes, os cromossomos politênicos são formados pelo processo de endoreplicação, ou seja, replicação do DNA sem a divisão celular, que ocorre para suprir a grande necessidade da transcrição durante o desenvolvimento. As cromátides replicadas de um par de cromossomos homólogos correspondentes formam um feixe com um padrão visível de bandas e interbandas. Este padrão de banda revela-se espécie-específico, motivando estudos em vários grupos de espécies, o que, aliado aos arranjos cromossômicos demonstraram ser excelentes ferramentas para inferir e comparar filogenias entre espécies relacionadas, bem como auxiliar no estudo da evolução cariotípica e determinação da diversidade genética dentro das populações (Schaeffer et al., 2008).

A espécie *D. polymorpha* apresenta número diplóide de cromossomos ( $2n$ ) igual a oito, com seu genoma constituído por dois pares cromossomos metacêntricos (cromossomos II e III), um par de cromossomos puntiformes (IV) e um par sexual acrocêntrico (X, Y). O cromossomo Y é heterocromático, e unido ao cromocentro no núcleo politenizado (figura 5, 6).

Figura 5. Placa metafásica de glânglio cerebral de macho de *D. polymorpha*.  $2n = 8$ . Barra representa  $10\mu\text{m}$  (Rhode e Valente, 1996).

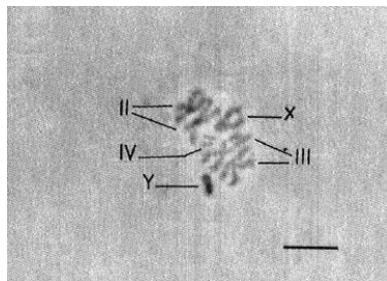
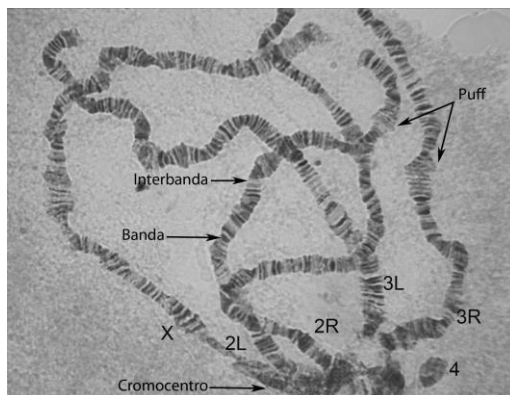


Figura 6. Cromossomos politênicos de *D. polymorpha*. Setas indicam padrão alternado de bandas (escuras) e interbandas (claras), cromocentro (região de heterocromatina incluindo a centromérica, que une os braços dos cromossomos) e *puffs* (regiões expandidas indicando expressão gênica). Números ordinais (2, 3, 4) e X representam a nomenclatura dos braços cromossômicos enquanto as letras L (*left*) e R (*right*) os braços esquerdo e direito respectivamente. Fonte: Presente trabalho



Em 1940, Müller propôs que o cariótipo ancestral de *Drosophila* seria formado por um grupo de cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos puntiformes, que ainda podem ser encontrados em algumas espécies, como *D. mediopunctata* (grupo tripunctata). Usando *Drosophila melanogaster* como referência, cada um dos pares de cromossomos ancestrais foram designados com letras (elementos de Müller: A, B, C, D, E, F) e os diferentes cariótipos seriam derivados de um simples rearranjo dos braços por fusão ou fissão cêntrica (Clayton e Gest, 1986; figura 7; tabela 1). Esta nomenclatura permitiu identificar e comparar grupo de genes equivalentes em diferentes espécies do gênero *Drosophila*, pois neste gênero, em geral, o conteúdo gênico dos elementos cromossômicos pouco varia. A manutenção do conteúdo dos genes nos braços cromossômicos deve-se à escassez de rearranjos entre estes braços, ou seja, de inversões paracêntricas (que não envolvem o centrômero) e translocações (Clayton e Gest, 1986; Powel, 1997).

Figura 7. Cariótipos *D. medipunctata* (ancestral) e *D. melanogaster*. Números X, 2, 3, 4 e 5 representam nomenclatura para braços cromossômicos. Letras entre parênteses indicam os elementos de Müller com respectivas cores. Fonte: Modificado de Brianti, et al., 2012.

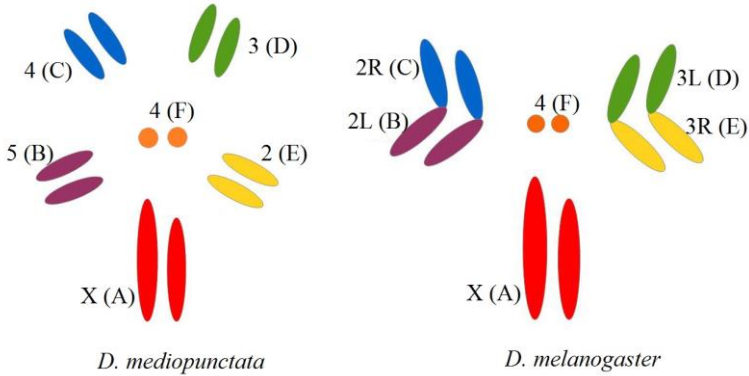


Tabela 1. Homologia cromossômica entre os elementos de Müller em *D. melanogaster* e espécies do gênero *Drosophila*.

| Espécie                | Elementos de Muller |    |    |    |    |            |
|------------------------|---------------------|----|----|----|----|------------|
|                        | A                   | B  | C  | D  | E  | F          |
| <i>D. melanogaster</i> | X                   | 2L | 2R | 3L | 3R | 4          |
| <i>D. unipunctata</i>  | X                   | 2R | 3R | 3L | 2L | Pontual(?) |
| <i>D. medipunctata</i> | X                   | 5  | 4  | 3  | 2  | Pontual(?) |
| <i>D. roehrae</i>      | X                   | 5  | 4  | 3  | 2  | Pontual(?) |
| <i>D. repleta</i>      | X                   | 3  | 5  | 4  | 2  | Pontual(?) |
| <i>D. virilis</i>      | X                   | 4  | 5  | 3  | 2  | Pontual(?) |

(Müller, 1940, Ranz, et al., 1997, Whiting et al., 1989, Brianti et al., 2012).

Esta hipótese proposta por Müller foi testada através de diferentes estudos comparativos: análise de desequilíbrio de ligação de genes que apresentam homologia em diferentes espécies (Stutervant e Novitski,

1941; Patterson e Stone, 1952); emparelhamento de regiões aparentemente homólogas de cromossomos politênicos em híbridos interespecíficos (Throckmorton, 1982; Krimbas e Loukas, 1984); comparação de padrões de bandas dos cromossomos politênicos (eficaz para analisar espécies proximamente relacionadas) (Stalker, 1972; Yoon et al., 1972); e similaridade de padrões de “*puffs*” (regiões expandidas representando intensa transcrição gênica) nos cromossomos durante o desenvolvimento das larvas (Ashburner e Berendes, 1978). Todavia, estes estudos muitas vezes não conseguiram demonstrar diretamente a similaridade das sequências entre locos homólogos, assim sendo, a utilização de ferramentas moleculares, como a localização física de genes ou fragmentos de DNA específicos pela técnica de hibridação *in situ*, e a comparação de genomas sequenciados pode garantir a detecção destas homologies.

Até o momento foi relatado que genes ortólogos estão localizados no mesmo elemento de Müller em diferentes espécies de *Drosophila* (Sturtevant e Novitski 1941; Richards et al., 2005, Brianti et al., 2012). Blocos de genes são mantidos no mesmo elemento e até mesmo na mesma posição, especialmente em espécies relacionadas, como é o caso dos genes *hsp68* e *hsp70* em *D. repleta* e *D. buzzati* (Ranz et al., 1997).

Recentemente a comparação dos blocos sintênicos, entre 12 espécies do gênero *Drosophila*, com genomas inteiramente sequenciados, confirmou que os elementos de Müller são muito conservados. Os genes estão, em grande parte (95%), localizados no mesmo elemento e as inversões paracêntricas são o mecanismo dominante que embaralha a ordem de genes ao longo de um cromossomo (Bhutkar et al., 2008; Schaeffer et al., 2008). Em poucos casos excepcionais, os genes se movimentam entre os braços cromossômicos (Gonzalez et al., 2006; Bhutkar et al., 2007).

Até o momento não há registro na literatura sobre a determinação dos elementos de Müller para espécies do grupo cardini.

#### **1.4 Polimorfismo de inversão cromossômica**

O polimorfismo de inversão cromossômica é uma característica importante quando se considera a evolução do genoma em muitos grupos de animais, especialmente em Dípteros, estes contribuem nos processos de adaptação, especiação e na evolução da heteromorfia dos cromossomos sexuais (Kirkpatrick, 2010). As inversões são a forma de rearranjo cromossômico mais comum na história evolutiva de *Drosophila* e tornaram-se um dos sistemas mais estudados em genética

de populações em espécies deste gênero de moscas (Balanyà, et al., 2004).

A primeira evidência de uma inversão cromossômica foi publicada por Alfred Sturtevant em 1921. Nos próximos 50 anos, grande parte inspirados por Dobzhansky e seu grupo, muitos estudos foram dedicados ao assunto, principalmente abordando a abundância deste polimorfismo e a diferença na taxa de fixação das inversões entre espécies de *Drosophila* (Dobzhansky, 1970).

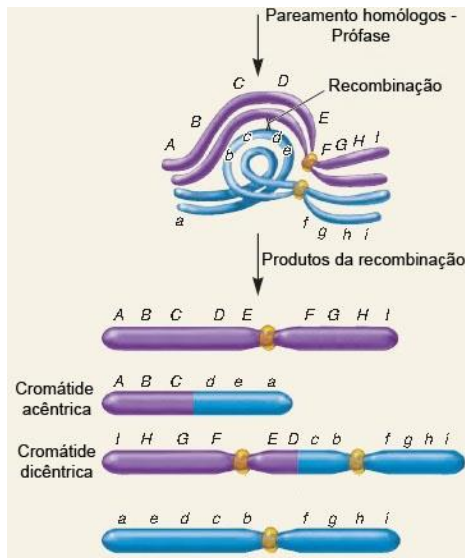
Uma inversão ocorre quando um cromossomo sofre quebra em dois pontos distintos e o segmento resultante é reinserido na posição invertida. Em muitos casos, não existe nenhuma diferença no conteúdo gênico entre o cromossomo normal e o invertido, apenas a ordem linear das bases do DNA que se altera. Inversões podem ser classificadas como: Pericêntricas, as quais incluem os dois braços de um mesmo cromossomo juntamente com o centrômero e as paracêntricas, que se restringem aos braços cromossômicos, excluindo regiões centroméricas. Este último tipo de inversões é o mais comumente encontrado na natureza. Estima-se que três quartos das espécies de *Drosophila* sejam polimórficas para inversões paracêntricas em populações naturais (Navarro et al., 2005).

Diferentes mecanismos podem gerar uma inversão cromossômica. Um deles é a recombinação ectópica entre elementos transponíveis. A inserção dos elementos transponíveis ocorre geralmente nas regiões de ponto de quebra, regiões conhecidas como *hot spots*, permitindo assim a formação de outros arranjos. Estes *hot spots* podem, ou não, ser conservados entre as espécies do gênero, promovendo variabilidade genética e/ou morfológica a partir da regulação diferencial de genes envolvidos no desenvolvimento, como os da família *Hox* (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo). Outro mecanismo envolve quebra cromossômica e reparo incorreto (Sonoda et al., 2006). No entanto, a contribuição de cada um dos dois mecanismos na geração de inversões em *Drosophila* ainda não está totalmente esclarecida (Guillén e Ruiz, 2012).

As inversões paracêntricas são consideradas alterações deletérias quando em heterozigotos. Isto porque caso haja um *crossing-over* entre cromátides invertidas e sem a inversão, resultará em gametas com cromossomos desbalanceados em conteúdo gênico, ou seja, uns com falta de alguns genes e acêntricos, e outros com genes duplicados e dicêntricos (figura 8). No caso de indivíduos heterozigotos para a inversão, os gametas recombinantes produzem zigotos de menor viabilidade e, por conseguinte, estes indivíduos apresentam fertilidade

reduzida. Portanto um dos resultados das inversões seria a inibição da produção de gametas viáveis recombinantes para esta região do cromossomo.

Figura 8. Formação de gametas recombinantes desbalanceados como resultados de crossing-over entre cromátides com e sem inversão cromossômica paracêntrica. (Modificado de Brooker, 2012).



Em *Drosophila*, estima-se que não exista esta perda de fertilidade dos heterozigotos. Isto porque nos machos não ocorre recombinação, já que são aquiasmáticos e, nas fêmeas, durante a ovogênese, apenas um dos quatro produtos meióticos se torna um óvulo, enquanto os outros três se tornam corpúsculos polares. Provavelmente devido ao fato que cromátides recombinantes migram mais lentamente que as não-recombinantes, geralmente são estas últimas é que formam os pronúcleos e se tornam óvulos funcionais. Assim, é esperado que as inversões em *Drosophila* sejam neutras em relação à produção de gametas funcionais, mesmo inibindo a recombinação (Krimbas e Powell, 1992).

Inversões cromossômicas em organismos coletados em populações naturais formam arranjos com frequências consideráveis e variando bastante entre as linhagens de *Drosophila* (Krimbas e Powell 1992). Por serem em princípio deletérias, é esperado que as inversões

fossem eliminadas das populações. No entanto, o polimorfismo de inversões cromossômicas é bastante comum e diversas inversões chegam a se fixar. Esta questão intrigou biólogos evolucionistas, os quais questionaram o que poderia estar mantendo e espalhando estas inversões (Kirkpatrick, 2010).

Muitas explicações foram apresentadas para justificar esta grande frequência de inversões paracêntricas encontradas em populações naturais e inicialmente apontou-se o mecanismo de deriva genética como principal responsável por esta disseminação. No entanto é muito improvável que este seja o caso em espécies de *Drosophila*, visto o tamanho efetivo da população, na ordem de  $10^6$  (Lande, 1984, Charlesworth, 2009). Assim, a explicação mais plausível é baseada no efeito causado pela redução de recombinação dos genes contidos em uma inversão, mantendo bloco de genes coadaptados, ou seja, em forte desequilíbrio de ligação corroborando com a seleção natural (Dobzhansky, 1970).

A taxa de crossing-over existente entre genes próximos dos pontos de quebra da inversão se revela menor do que a de genes localizados no meio da alça (Sturtevant, 1931). Apesar desta variação no potencial de recombinação dos genes neste caso, muitos marcadores genéticos localizados próximos ou entre os arranjos mostram uma associação significativa entre eles. Esta associação sugere que a seleção está agrupando e mantendo combinações favoráveis de alelos (Kirkpatrick et al., 2006) que estariam influenciando no sucesso da espécie. Assim, muitas vezes, os polimorfismos podem se encontrar sob seleção e a variação na frequência dos arranjos pode ocorrer de acordo com a distribuição sazonal e geográfica das diferentes espécies (Anderson et al., 2005).

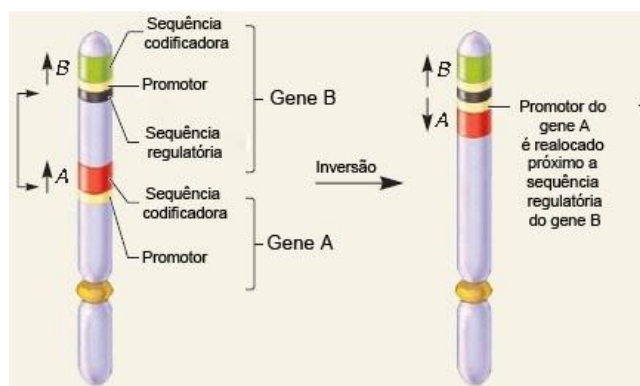
Talvez as evidências mais contundentes da atuação da seleção natural sobre as inversões sejam as observações em *D. subobscura* nas populações européias e nas populações de colonização recente, na costa oeste da América do Sul e do Norte. Poucos anos após a introdução desta espécie na América, suas populações passaram a apresentar o mesmo padrão clinal das populações européias, com algumas inversões muito frequentes nas regiões temperadas e que diminuem de frequência em direção ao equador (Prevosti et al., 1988). Mesmo depois de mais de 35 anos de fluxo gênico, as clinas permanecem estáveis (Solé et al., 2002).

Uma mutação que modifica a estrutura do cromossomo, no caso as inversões, pode também estar associada na alteração de genes. As regiões de ponto de quebra podem dividir um gene ao meio e desta



forma inibir a sua função. Muitas vezes o gene pode permanecer intacto, porém sua expressão pode ser alterada ao ser realocado próximo de seqüências regulatórias de outros genes, como silenciadores ou promotores. Este fato pode estar contribuindo com a propagação das inversões e é conhecido como hipótese de “efeito de posição” (figura 9). Apesar de até o momento esta hipótese ter recebido pouca atenção de pesquisadores, a relativa alta densidade e compactação da estrutura do genoma de *Drosophila* (>90% de eucromatina funcional, Celniker, 2003) faz com que essa hipótese seja bastante aceitável (Guillén e Ruiz, 2012).

Figura 9. Efeito de posição causado pela inversão cromossômica. Reposicionamento da região promotora do gene A próxima a região regulatória do gene B em cromátide invertida pode alterar a expressão do gene A uma vez que a seqüência regulatória tem leitura bidirecional (Modificado de Brooker, 2012).



Recentemente, pesquisa realizada por Guillén e Ruiz (2012) mostrou uma série de alterações gênicas nas regiões de ponto de quebra de inversões em *Drosophila mojavensis*, espécie endêmica de regiões desérticas. Os autores propuseram que estas inversões contribuem para o valor adaptativo da espécie, pois regulam de forma positiva a produção de proteínas chaperonas de estresse térmico, indicando também a seleção natural como explicação mais plausível para a rápida evolução cromossômica da espécie.

Dentro do subgrupo *cardini*, até o momento existem inversões descritas em apenas cinco espécies (tabela 2). *Drosophila polymorpha*, como seu nome indica, é a espécie mais polimórfica do grupo, com 18 arranjos descritos até o momento (tabela 3).

As inversões são possíveis de serem identificadas e registradas pela análise dos cromossomos politênicos. Para isso foram criados fotomapas de referência os quais se tornaram uma importante ferramenta no estudo de genética, especialmente em *Drosophila* e outros dípteros (O'Grady et al., 2001). A espécie *D. polymorpha* teve seu primeiro mapa publicado em 1996 por Rhode e Valente e recentemente este mapa foi aprimorado por Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S. (no prelo).

Tabela 2. Espécies do subgrupo cardini e o número de inversões até o momento descritas.

| <b>Espécie</b>                | <b>Número de arranjos descritos</b> |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Drosophila cardini</i>     | 1                                   |
| <i>Drosophila cardinoides</i> | 6                                   |
| <i>Drosophila neocardini</i>  | 3                                   |
| <i>Drosophila polymorpha</i>  | 18                                  |

(Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

Tabela 3. Arranjos descritos para *Drosophila polymorpha*

| <b>Arranjos heterozigotos</b>                     | <b>Primeira descrição</b>                                |
|---|--|
| 2RA   | Rohde e Valente, 1996                                    |
| XA, XB, 2LA, 2LB, 2RB, 2RC, 2RD,<br>3RA           | De Toni et al., 2001                                     |
| XC, 3LA, 3LC, 3RB, 3RC, 3RD,<br>3RE, 2RA+C, 2RA+D | Cordeiro J., De Toni D.C. e<br>Valente V.L.S. (no prelo) |

## 1.5 *Hsps (Heat Shock Proteins) e mecanismos de defesa a estresse*

Situações ambientais inesperadas podem surpreender os organismos vivos levando-os a condições de estresse, onde uma rápida resposta diante destas condições pode ser determinante na sobrevivência do indivíduo (Sorensen et al., 2003). Diferentes genes cujas expressões respondem ao estresse ambiental já foram mapeados e sequenciados, mostrando que conferem algum tipo de proteção contra estes fatores imprevisíveis.

Em todos os organismos vivos a elevação de temperatura é seguida pela rápida indução de alguns genes conhecidos como “*heat shock genes*” que transcrevem as proteínas de choque térmico - “*heat shock proteins (Hsps)*”. Sua descoberta foi consequência da indução de um grupo de *puffs* em cromossomos politênicos de larvas de *D. busckii* expostas a choque térmico e a DNP (2,4-dinitrofenol) por Ritossa (1962). Estas *hsps* são sintetizadas em uma quantidade significativamente aumentada logo após o efeito estressor, protegendo a célula da desnaturação de suas proteínas e consequente indução à apoptose. A agregação de polipetídeos induzidos durante o estresse aumenta as chances de sobrevivência dos organismos por garantir a manutenção das estruturas terciárias e quaternárias destas moléculas (Feder e Hoffmann, 1999).

É importante salientar que as *hsps* são de fundamental importância para a sobrevivência das células, não apenas em condição de estresse, onde se vê aumento na síntese de proteínas dirigidas à reparação de danos celulares, mas também em eventos de transporte e enovelamento de proteínas em formação, onde novamente exercem seu papel de chaperonas (Feder e Hoffmann, 1999).

A expressão das principais *hsps* em *D. melanogaster* durante os diferentes estágios do desenvolvimento em condições normais, foi detalhada por Mason *et al*, 1985. De acordo com os autores, a *hsp83* apresenta alta expressão em todos os estágios do desenvolvimento, enquanto *hsp68* e *70* apresentaram baixa expressão para os mesmos estágios. As *hsps* 23, 26 e 27 estão principalmente presentes durante o 3º estágio larval e no estágio de pupa (tabela 4).

Tabela 4. Concentração de mRNA de *hsps* em populações de RNA de vários estágios do desenvolvimento normal de *D. melanogaster*.

|                             | <i>Hsp83</i> | <i>Hsp70</i> | <i>Hsp68</i> | <i>Hsp27</i> | <i>Hsp26</i> | <i>Hsp23</i> | <i>Hsp22</i> |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Embrião                     | +++          | +/-          | +/-          | ++           | ++           | -            | -            |
| 3º estágio larval (inicial) | +++          | +/-          | +/-          | +/-          | +/-          | +/-          | -            |
| 3º estágio larval (tardio)  | +++          | +/-          | +/-          | +++          | +++          | ++++         | -            |
| Pre-pupa                    | +++          | +/-          | +/-          | ++++         | ++++         | ++++         | -            |
| Pupa (tardia)               | +++          | +            | +            | +            | +            | +            | -            |
| Adulto/4 dias (fêmea)       | +++          | +/-          | +/-          | +/-          | +/-          | -            | -            |
| Adulto /4 dias (macho)      | +++          | +/-          | +/-          | ++           | +++          | -            | -            |

Intensidade da expressão avaliada em relação aos sinais da *hsp83*. – não detectado, +/- baixa detecção, + detectado <30% *hsp83*, ++30%-70% *hsp 83*, +++70%-130% *hsp83*, ++++ >130% *hsp83*. (Mason et al., 1985).

As regiões conhecidas como *puffs* presentes nos cromossomos politênicos, representam locais de intensa atividade transcricional que se mostram relativamente constantes durante o desenvolvimento larval (Beermann, 1956). Assim, qualquer oscilação neste padrão, durante o desenvolvimento, reflete o recrutamento diferencial de genes em resposta a fatores externos.

Em outros estudos sobre a indução dos genes em *D. melanogaster* observou-se ainda que: (1) os *puffs* são induzidos por vários tipos de estresse além do calor (Ashburner, 1970); (2) eles são produzidos em poucos minutos após o gatilho de estresse (Ashburner, 1970); (3) estão associados aos RNAs recém-sintetizados (Ritossa, 1962) e (4) são encontrados em outras espécies de *Drosophila* e em muitos tecidos diferentes (Berendes, 1965).

Pesquisas envolvendo indução da ativação destes genes têm sido frequentemente realizadas em *Drosophila melanogaster*. Esta espécie teve a capacidade de indução da transcrição destes *loci* estudada frente a agentes estressantes como temperatura (Sorensen et al., 2003; Hoekstra e Montooth, 2013), privação alimentar (Harbison et al., 2005), ecdisona (hormônio da muda), etanol (Vlassova *et. al.*, 1983; Montooth et al., 2006) entre outros (tabela 5).

Tabela 5. Principais genes de proteínas de choque térmico (*hsp*s), localização nos cromossomos politênicos e fatores estressantes que induzem a expressão gênica em *Drosophila melanogaster*. 3L: cromossomo 3, braço esquerdo (*Left*), 3R: cromossomo 3, braço direito (*Right*). Números presente na nomenclatura se referem ao peso molecular em kDa.

| Nomenclatura(s) | Localização (cromossomo) | Fator(es) estressante(s)  |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>hsp22</i>    | 3L                       | Stress oxidativo, calor   |
| <i>hsp23</i>    | 3L                       | Calor, frio, anoxia       |
| <i>hsp26</i>    | 3L                       | Calor, frio, anoxia       |
| <i>hsp27</i>    | 3L                       | Privação alimentar, calor |
| <i>hsp60</i>    | X                        | Calor                     |
| <i>hsp68</i>    | 3R                       | Privação alimentar, calor |
| <i>hsp70</i>    | 3R                       | Calor, anoxia             |
| <i>hsp83</i>    | 3L                       | Frio                      |

(Pierre et al., 2014)

*Drosophila melanogaster* e *D. polymorpha* apresentam uma relativa distância filogenética e estão agrupadas em diferentes subgêneros sendo estes *Sophophora* e *Drosophila* respectivamente. Este fato permite fazer uma análise no nível de conservação de processos e genes que mantiveram sua expressão aumentada em situações adversas ao longo da evolução.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar o ciclo de vida *D. polymorpha*, o polimorfismo de inversão cromossômica em populações de Santa Catarina e a relação dos arranjos encontrados com possível papel adaptativo via a modulação da expressão de genes de estresse (*hsps*).

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a duração do ciclo de vida de populações sul-americanas de *D. polymorpha* não submetidas aos efeitos de endocruzamento, e suas peculiaridades referentes ao tempo de cada estágio de desenvolvimento.

- Determinar a relação entre os braços cromossômicos e os elementos de Müller em *Drosophila polymorpha*.

- Determinar os arranjos que se apresentam com maior frequência na espécie *D. polymorpha* em regiões conservadas do estado de Santa Catarina

- Registrar possíveis novas inversões de modo a complementar o mapa cromossômico de referência de *D. polymorpha*, determinando a frequência das mesmas nas populações a serem estudadas, para verificar se existem indícios de arranjos adaptativos na espécie.

- Verificar se os genes de choque térmico (*hsps*) poderiam ter um papel adaptativo na manutenção dos polimorfismos de inversão de *D. polymorpha*.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de *Drosophila polymorpha*

Amostras das populações de *Drosophila* foram obtidas por meio de armadilhas confeccionadas com garrafas PET (Roque et al., 2011) (total de 80 armadilhas) e pela captura de indivíduos adultos com rede entomológica sobre recipientes com isca de banana, abacaxi e laranja fermentadas que foram deixadas por no mínimo três dias nas áreas de coleta. Indivíduos sobrevoando seus recursos tróficos naturais (frutos fermentados), também foram capturados.

As coletas ocorreram em três unidades de conservação (UCs) representativas das regiões norte, central e sul da distribuição da floresta ombrófila densa no estado de Santa Catarina: Reserva Biológica Estadual da Canela Preta (CP - 27°16'49.55"S; 49°8'31.17"O), no município de Botuverá; Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (TB - 27°48'20"S; 48°33'50"O) em Florianópolis e Reserva Biológica Estadual do Aguai (AG - 28°34'49.55"S; 49°34'25"O), em Siderópolis (figura 10). O esforço amostral foi concentrado nos meses mais quentes (outubro a abril) de 2012/2014, nos quais o número de indivíduos é maior (De Toni et al., 2007; Bizzo et al., 2010).

Figura 10. Mapa do estado de Santa Catarina. Marcações em vermelho representam os pontos de coleta. Imagem Google Earth, 2014.



### **3.2 Identificação e manutenção da espécie em laboratório**

Indivíduos da espécie *D. polymorpha* foram identificados com o uso de microscópio estereoscópico por meio da identificação de características morfológicas peculiares da espécie (chave classificatória de Freire-Maya e Pavan, 1949) e também através da dissecação de genitália masculina, quando necessário, seguindo a técnica de Wheeler et al. (1966).

Para a análise do polimorfismo de inversão, fêmeas desta espécie, após identificadas, foram isoladas em meio de cultura para oviposição e formação de isolinhagens (linhagens formadas a partir de uma fêmea fecundada na natureza).

As linhagens foram cultivadas em meio de cultura de batata liofilizada (Bizzo et al., 2012) e alimentadas com fermento biológico.

### **3.3 Análise do ciclo de vida e desenvolvimento:**

Assim que indivíduos adultos emergiram das linhagens cultivadas, 20 casais foram colocados em frascos separados contendo meio de cultura e foram observados a cada hora em um regime de luminosidade de 12 horas à temperatura de 22°C. Os indivíduos foram alimentados e observados até completarem o ciclo. Aspectos relevantes que determinam seu ciclo de vida como tempo de duração para maturidade sexual, estágios larvais e pupa, foram descritos.

### **3.4 Preparação citológica**

A preparação citológica do material analisado foi feito a partir de glândulas salivares de larvas de terceiro estágio (Ashburner, 1967). Os melhores núcleos foram fotografados para análise mais detalhada com uso de microscópio com captura de imagem e foram aperfeiçoadas com o uso do programa Adobe® Photoshop® CS3 (v10.0.1, *Adobe Systems Inc.*). Para o estudo do polimorfismo de inversão, pelo menos cinco larvas de cada isolinhagem foram obtidas, e de cada larva, cinco núcleos politenizados foram analisados.

### **3.5 Homologia de bandas – Elementos de Müller**

A fim de determinar os elementos de Müller através da homologia de bandas, foi feita a comparação do mapa cromossômico de *D. polymorpha* (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo)

com *D. unipunctata* (Brianti et al., 2012). Esta última espécie teve a definição dos elementos de Müller determinada por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) recentemente.

### 3.6 Indução de *puffs*

**Choque térmico:** 20 larvas de 3º estágio *D. polymorpha* foram acondicionadas em tubos e submetidas a um choque térmico de 37°C por 40min por aquecimento dos tubos em banho maria (Ritossa, 1962).

**Anoxia:** 20 larvas de 3º estágio de *D. polymorpha* foram mergulhadas em solução NaCl 0,9 em recipiente totalmente vedado por 1 hora.

**Privação alimentar:** 20 larvas de *D. polymorpha* foram submetidas à privação alimentar por 12 horas. Por esse período as larvas foram mantidas em meio preparado com agar-agar e água na concentração de 1%.

Assim que submetidas aos estresses químicos e físicos, as larvas foram dissecadas para a preparação de lâminas e a análise dos seus cromossomos politênicos que foram fotografados e registrados. Os métodos para os experimentos de anoxia e privação alimentar foram testados no presente trabalho e o tempo de exposição das larvas nestes estresses foram determinados de acordo com o melhor momento de indução observado. Foram realizadas duplicatas destes experimentos e, quando os resultados obtidos foram discrepantes, se procedeu uma terceira repetição.

O controle usado para comparação com os cromossomos induzidos foram preparados a partir de larvas mantidas à temperatura ambiente (25°C) e regime de luminosidade de 12hrs. Pelo menos cinco larvas de cinco linhagens diferentes tiveram seus cromossomos analisados nestas condições.

As coletas contaram com o apoio e auxílio da FAPESC (Fundação de amparo à pesquisa e inovação de Santa Catarina) e CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior).

Os procedimentos de preparo de lâminas para a análise dos cromossomos politênicos, armazenamento das linhagens e os testes de indução foram realizados no laboratório de Drosofilídeos da UFSC.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ciclo de vida e desenvolvimento de *D. polymorpha*

A caracterização do ciclo de vida de *D. polymorpha*, do ovo ao adulto e o estudo da maturação sexual, são aspectos importantes que mostram como peculiaridades destas etapas estão relacionadas com características ecológicas específicas da espécie.

No primeiro e segundo dia do experimento do ciclo de vida de *D. polymorpha*, nenhum estágio larval foi detectado, apenas ovos. No terceiro dia, o primeiro estágio larval foi observado. No quinto dia o segundo estágio larval e no sexto dia o terceiro estágio larval. No sétimo dia a fase de pupa apareceu e no décimo quarto dia ocorreu a eclosão do indivíduo adulto. Assim, o tempo de desenvolvimento de *D. polymorpha*, do ovo ao adulto tem duração de 14 dias (figura 11).

No teste da maturidade sexual, apenas seis frascos dos 20 iniciais permaneceram com casais vivos até o fim do experimento. Foram observados dois machos com comportamento de corte no quarto dia, três no quinto dia e seis no sexto dia. Uma fêmea mostrou receptividade no quinto dia e outra no sexto dia. Embora estes dados sejam preliminares, a maturidade sexual do macho é claramente observada no quinto dia após eclosão do adulto e das fêmeas no sexto dia. (figura 11)

Figura 11. Ciclo de vida de *D. polymorpha*. Esquema representando as fases e a duração de cada uma delas. No total, o ciclo de vida, do ovo ao adulto tem duração de 14 dias. Fonte: presente trabalho



## 4.2 Elementos de Müller em *D. polymorpha*

Os genes de choque térmico foram bastante estudados na espécie *D. melanogaster*, onde a posição dos mesmos nos cromossomos e seus padrões de expressão está bem estabelecida. Para possibilitar a comparação na expressão de *hsps* de *D. polymorpha*, em um primeiro momento foi necessário verificar quais os elementos de Müller que constituem cada cromossomo da espécie *D. polymorpha*. A maior parte das recombinações ocorridas nos cromossomos na radiação das espécies tem sido fusão de cromossomos acrocêntricos ancestrais (elementos de Müller) e recombinações dentro de cada elemento (paracêntricas), o que manteve a maior parte dos genes conservados dentro de cada elemento.

Os elementos de Müller para *D. polymorpha* foram determinados a partir da comparação e homologia de bandas com *D. unipunctata*, onde foram recentemente estabelecidos por *FISH* (Brianti et al., 2012). Para isso, foram usados os mapas cromossômicos de ambas as espécies. Estas espécies apresentam configuração cariotípica similar (figura 12) e estão filogeneticamente relacionadas, divergindo a mais de 6,6 milhões de anos atrás (Hatadani et al., 2009) enquanto *D. melanogaster* divergiu há mais de 55 milhões de anos (Robe, 2005) de *D. polymorpha*. Além do padrão de bandas, foi considerado o tamanho dos cromossomos e o grau de polimorfismo.

Os cromossomos politênicos apresentam regiões conhecidas como *landmarks*, marcos que facilitam a identificação dos elementos. Estas regiões são reconhecidas por bandas ou *puffs* característicos e em espécies relacionadas alguns marcos permanecem os mesmos.

A correspondência dos elementos de Müller encontra-se na tabela 6. Os marcos usados para identificação descritos por Brianti e colaboradores (2012) para espécies do grupo *trinpunctata* e algumas regiões nítidas de homologia foram marcadas no mapa de *D. unipunctata* e homologadas com *D. polymorpha* são mostradas na figura 13 e 14.

Figura 12. Configuração cariotípica de *D. unipunctata* e *D. polymorpha*. Braços cromossômicos e elementos de Müller (entre parênteses) correspondentes de acordo com as cores nas duas espécies. Interrogação em par cromossômico de *D. unipunctata* provavelmente corresponde aos chamados cromossomos Bs, compostos por heterocromatina, raros em *Drosophilas*. Cromossomo puntiforme no centro corresponde ao cromossomo 4, elemento F. Modificado de Brianti et al., 2012.

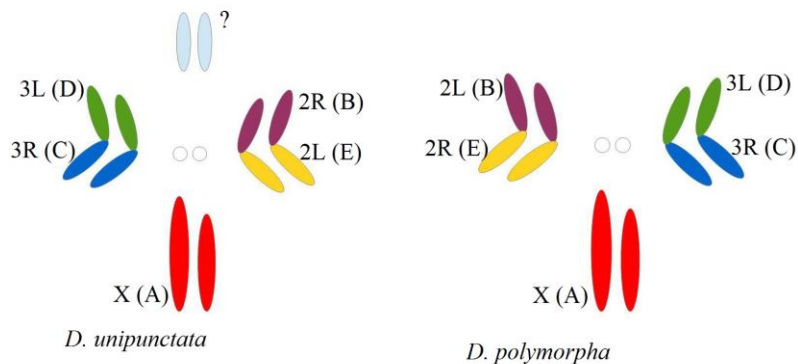


Tabela 6. Homologia cromossômica entre os elementos de Müller em *D. unipunctata* (Brianti et al., 2012) e *D. polymorpha*.

| Espécie               | Elementos de Müller |    |    |    |    |   |
|-----------------------|---------------------|----|----|----|----|---|
|                       | A                   | B  | C  | D  | E  | F |
| <i>D. unipunctata</i> | X                   | 2R | 3R | 3L | 2L | 4 |
| <i>D. polymorpha</i>  | X                   | 2L | 3R | 3L | 2R | 4 |

De acordo com Brianti *et al*, 2012, em espécies do grupo *tripunctata* (*D. mediopunctata*, *D. unipunctata* e *D. roehrae*), o elemento D é muito conservado em seu padrão de bandas, e é facilmente reconhecido pela presença de um *puff* na secção 46A. O padrão similar de bandas possibilitou identificar o elemento D em *D. polymorpha*,

como sendo o braço L do cromossomo 3, onde nesta espécie se verifica a presença de dois pequenos *puffs* consecutivos na região 77-78, bem típicos deste braço, não muito marcantes em *D. unipunctata* (figura 13).

No elemento B, duas bandas escuras bem marcadas em sua extremidade distal o caracterizam. Estes marcos também podem ser observados no elemento correspondente em *D. polymorpha*, o braço 2L. Verificamos que o elemento B de *D. polymorpha* ainda apresenta um *puff* hexagonal diferenciado na região distal, secção 23a – 24c (figura 13).

O elemento A em espécies do grupo *tripunctata* não apresenta um padrão homosequencial, entretanto, pode ser facilmente reconhecido pelo acúmulo de heterocromatina na ponta proximal do cromossomo, e na ponta distal, pela presença de *puff* em forma de leque na secção 1a. Porém, em *D. unipunctata*, a presença de uma inversão pericêntrica neste cromossomo pode mudar sua configuração, dificultando a identificação pela ponta proximal. Para espécies do grupo *cardini*, este elemento apresenta um padrão de bandas bastante similar (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo) e com os mesmos marcos descritos para o grupo *tripunctata* (figura 13).

Os elementos C e E precisam ser analisados com mais cuidado, pois são cromossomos bastante polimórficos e apresentam grande variação no grupo *tripunctata*, tornando o reconhecimento mais difícil. No entanto, este fato auxiliou na identificação dos mesmos em *D. polymorpha*, pois também são os mais polimórficos nesta espécie. O elemento E é o mais longo dos dois, facilitando a distinção do elemento C. No elemento C do grupo *tripunctata*, a ponta distal é bastante característica, especialmente as cinco primeiras bandas. Já em *D. polymorpha* verificamos que este elemento é mais facilmente identificado pela presença de uma banda escura que antecede o primeiro *puff* da região distal. O elemento E, além de muito polimórfico e o mais longo entre espécies do grupo *tripunctata*, também apresenta dois *puffs* adjacentes na região mediana do cromossomo, nas secções 31-33a especificamente em *D. unipunctata*. Os *puffs* correspondentes em *D. polymorpha* foram encontrados na secção 48b-50c. Verificamos que o elemento E em *D. polymorpha* pode ser mais facilmente identificado pela sua ponta distal a qual apresenta uma banda escura e larga na secção 41b e pela secção 43 - 44c, a qual apresenta uma região listrada seguida um pequeno *puff* (figura 13 e 14).

Ainda, a fim de corroborar com a homologia proposta, observou-se a similaridade dos elementos D e E, entre *D. repleta* e *D. unipunctata*, visto que pertencem ao mesmo subgênero (*Drosophila*).



Ranz et al., 1997, mapeou alguns genes em *D. repleta*, fazendo uso de alguns genes *hsp*s (*hsp70*, *hsp27*), também usados por Brianti et al., 2012 como marcadores na identificação dos elementos de Müller em *D. unipunctata*. Em ambos os trabalhos os genes hibridizaram os mesmos elementos, *hsp27* no elemento D e *hsp70* no elemento E.

Figura 13. Elementos de Müller A, B e C em *D. polymorpha* (mapa de Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo) de acordo com a homologia, usando mapa politênicos *D. unipunctata* (Brianti et al., 2012) como referência. Círculos representam marcos e os traços algumas regiões de homologia.

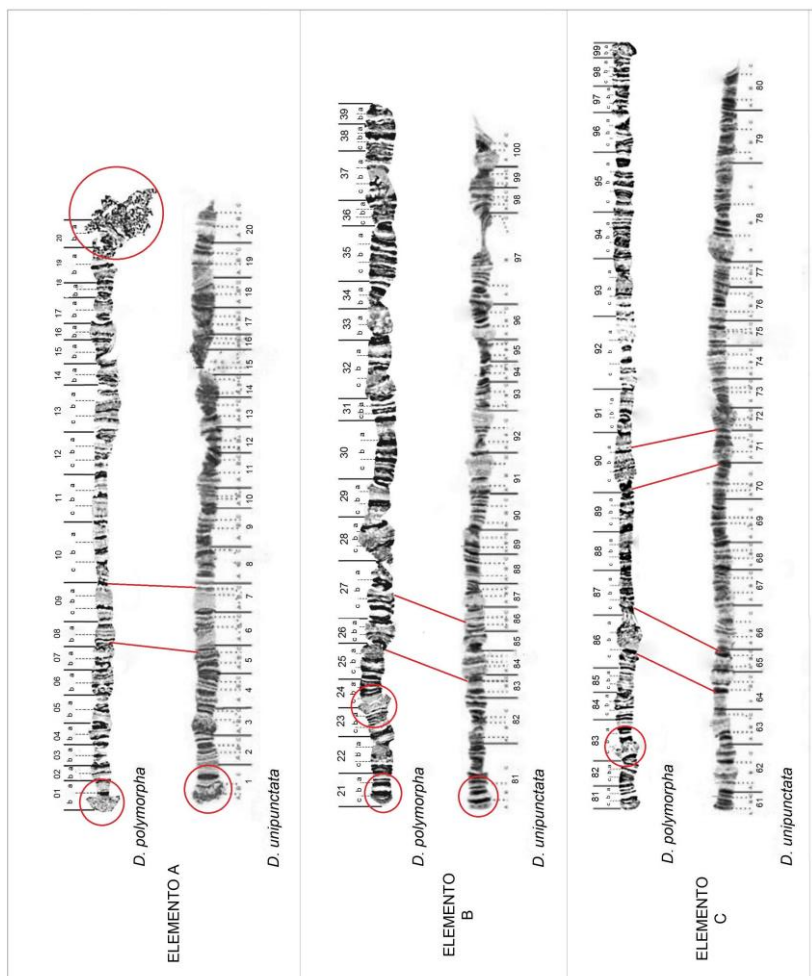
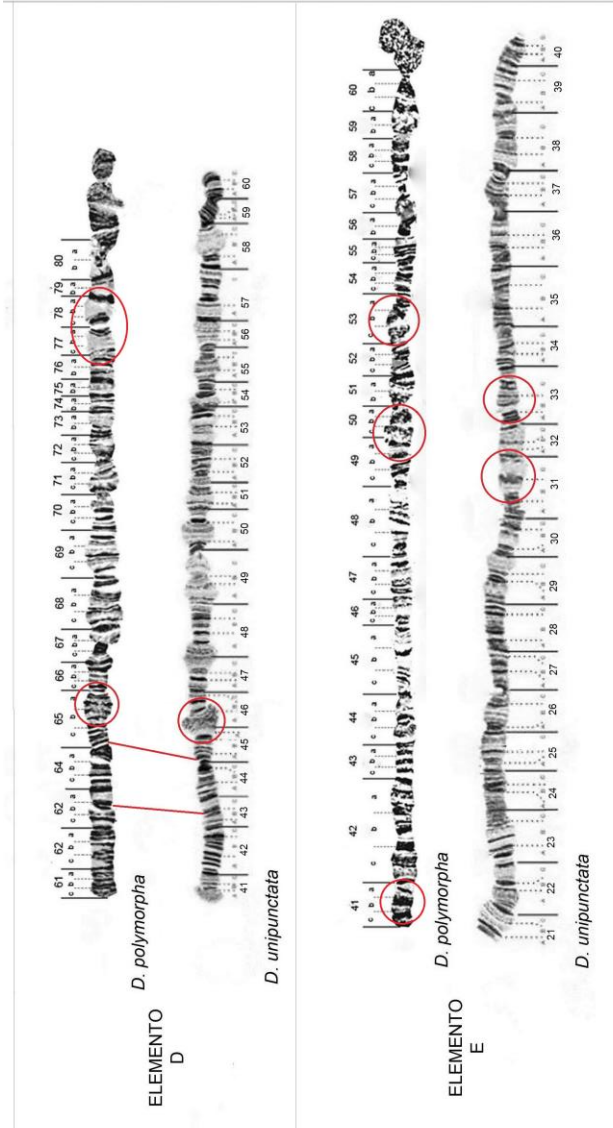


Figura 14. Elementos de Müller D e E em *D. polymorpha* (mapa de Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo) de acordo com a homologia, usando mapa politênicos *D. unipunctata* (Brianti et al., 2012) como referência. Círculos representam marcos e os traços algumas regiões de homologia.



### 4.3 Análise do polimorfismo de inversão

O total de linhagens analisadas para o estudo do polimorfismo de inversão cromossômica foram 32, sendo 11 isolinhages coletadas no Parque estadual da Serra do Tabuleiro (TB), oito na Reserva Biológica da Canela Preta (CP) e 13 na Reserva Biológica Estadual do Aguai (AG). As linhagens dos três locais de coleta apresentaram quatro arranjos cromossômicos diferentes (XA, 2RA, 2RD, 2RA+D) em diferentes frequências (figuras 15, 16 e 17; tabela 7).

Figura 15. Rearranjos encontrados em cromossomos politênicos de linhagens de *D. polymorpha* provenientes do Parque estadual da Serra do Tabuleiro. A) XA, B) 2RA, C) 2RD, D) 2RA+D. Rearranjos previamente descritos de acordo com mapa cromossômico da espécie. Fonte: Presente trabalho

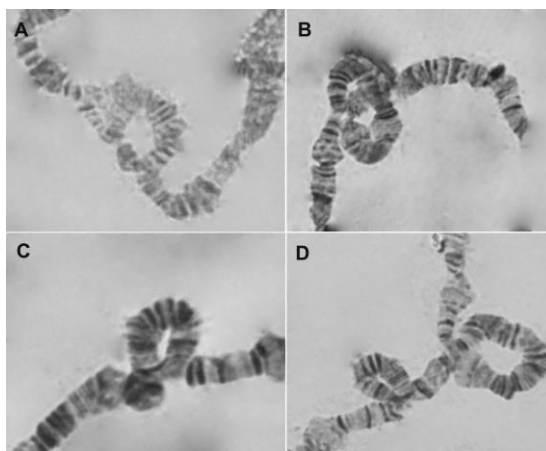


Figura 16. Rearranjos encontrados em cromossomos politênicos de linhagens de *D. polymorpha* provenientes da Reserva Biológica da Canela Preta. A) XA, B) 2RA, C) 2RD, D) 2RA+D. Rearranjos previamente descritos de acordo com mapa cromossômico da espécie. Fonte: Presente trabalho.

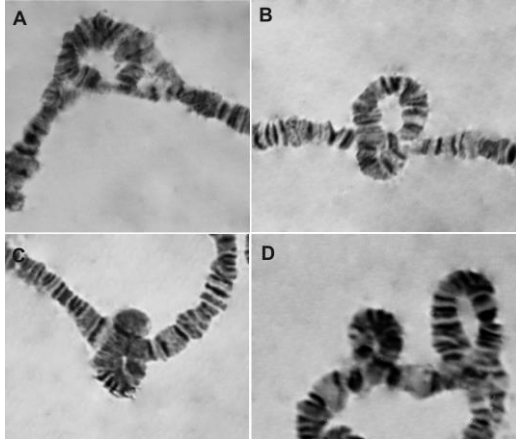
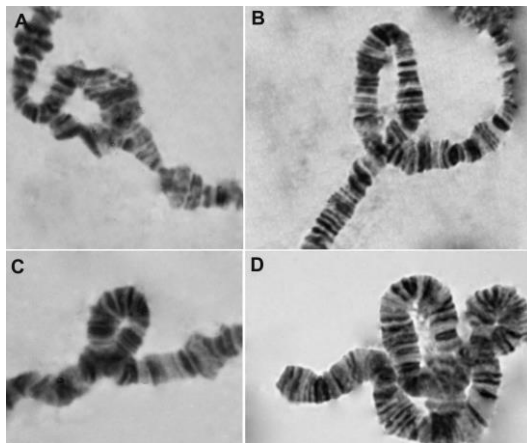


Figura 17. Rearranjos encontrados em cromossomos politênicos de linhagens de *D. polymorpha* provenientes da Reserva Biológica Estadual do Aguai. A) XA, B) 2RA, C) 2RD, D) 2RA+D. Rearranjos previamente descritos de acordo com mapa cromossômico da espécie. Fonte: Presente trabalho.



Linhagens provenientes de TB e AG apresentaram com maior frequência o rearranjo 2RA. Cinco linhagens das 11 provenientes do TB e todas as 13 linhagens de AG apresentaram este arranjo. As linhagens da CP apresentaram com maior frequência a inversão 2RD, a qual está presente em todas as linhagens (tabela 8).

Uma vez identificado um arranjo na isolinhagem, pelo menos cinco indivíduos desta isolinhagem foram registrados com determinada inversão.

Tabela 8. Número total de isolinhagens e de isolinhagens que apresentaram determinado arranjo nos respectivos locais de coleta: TB – Parque da Serra do Tabuleiro, CP – Reserva Biológica da Canela Preta, AG – Reserva Biológica do Aguaí.

| Locais | Total de<br>isolinhasgens | Nº de isolinhagens com os arranjos |     |       |    |     |
|--------|---------------------------|------------------------------------|-----|-------|----|-----|
|        |                           | 2RA                                | 2RD | 2RA+D | XA | st* |
| TB     | 11                        | 05                                 | 04  | 02    | 02 | 02  |
| CP     | 08                        | 04                                 | 08  | 05    | 03 | 0   |
| AG     | 13                        | 13                                 | 03  | 06    | 01 | 0   |

\*standard – isolinhagem com arranjos de banda/interbanda padrão em todos os braços cromossômicos.

Nota: Uma mesma isolinhagem pode apresentar mais de um rearranjo cromossômico.

#### 4.4 Indução de *puffs*

**Choque térmico:** Larvas de 3º estágio de *D. polymorpha* foram submetidas a um choque térmico de 37°C por 40min. A subsequente análise dos cromossomos politênicos mostrou que em pelo menos 45% dos indivíduos analisados houve indução de *puff* (descompactação da cromatina e consequente expressão gênica) da secção 42c do cromossomo 2R (figura 18) e das secções, 62c, 63a e 77/78 do cromossomo 3L (figura 19). A secção 02 do cromossomo X também apresentou alteração do estágio de compactação em relação ao material controle em pelo menos 50% dos indivíduos analisados (figura 20).

Figura 18. Comparação do padrão de pufação da região 42c entre indivíduo controle e submetido a choque térmico de 37°C. Cromossomo politênico 2R (Elemento de Müller E) de *D. polymorpha*. Número (42) representa secção e letra (c) subsecção de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

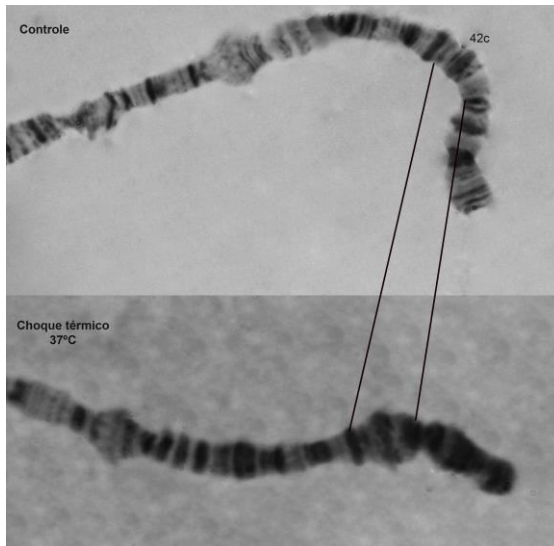


Figura 19. Comparação do padrão de pufação das regiões 62c, 64a/b, 77/78 entre indivíduo controle e submetido a choque térmico de 37°C. Cromossomo politênico 3L (Elemento de Müller D) de *D. polymorpha*. Números representam seções e letras subseções de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

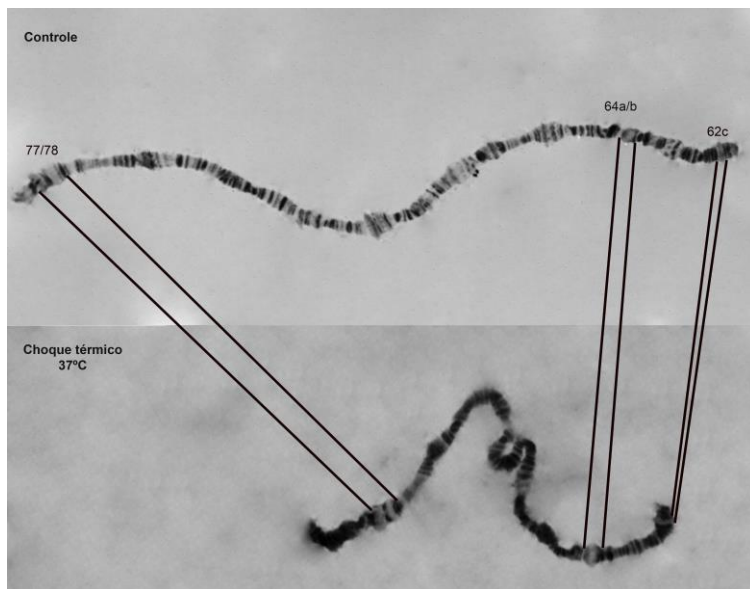
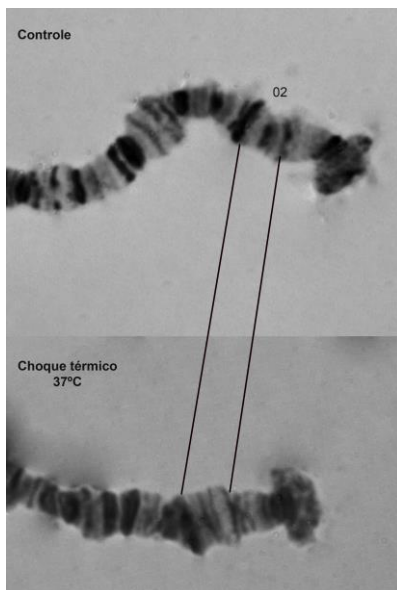


Figura 20. Comparação do padrão de pufação da região 02 entre indivíduo controle e indivíduo submetido a choque térmico 37°C. Cromossomo politênico X (Elemento de Müller A) de *D. polymorpha*. Número (02) representa secção de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).





**Anoxia:** Larvas de 3º estágio de *D. polymorpha* foram submetidas a anoxia por 1 hora. Após este período a análise dos cromossomos politênicos mostrou expressiva expansão do *puff* na secção 42c do cromossomo 2R, em mais de 60% dos indivíduos analisados (figura 21). As secções 77/78 do cromossomo 3R também mostraram significativa diferença no padrão de pufação em relação ao controle em mais de 40% dos indivíduos (figura 22). No cromossomo X, a secção 02 apresentou razoável expansão, em pelo menos 40% dos indivíduos (figura 23).

Figura 21. Comparação do padrão de pufação da região 42c entre indivíduo controle e submetido à anoxia. Cromossomo politênico 2R (Elemento de Müller E) de *D. polymorpha*. Número (42) representa secção e letra (c) subsecção de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

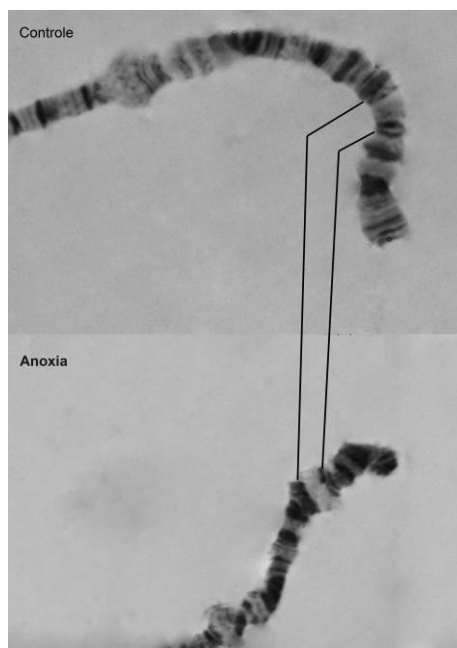


Figura 22. Comparação do padrão de pufação da região 77/78 entre indivíduos controle e submetidos à anoxia. Cromossomo politênico 3L (Elemento de Müller D) de *D. polymorpha*. Número (77/78) representa seções de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

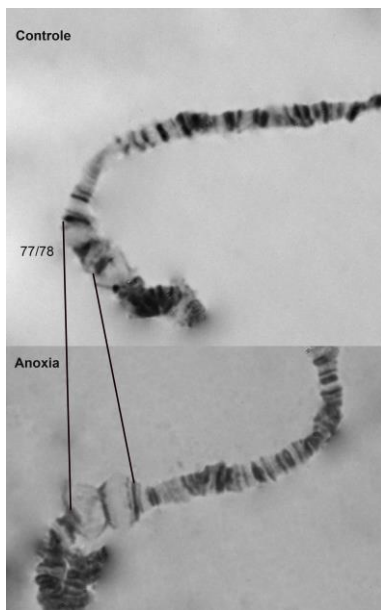
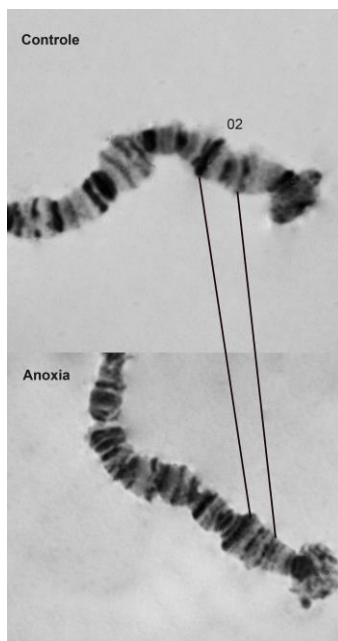


Figura 23. Comparação do padrão de pufação da região 02 entre indivíduo controle e submetido a anoxia. Cromossomo politênico X (Elemento de Müller A) de *D. polymorpha*. Número (02) representa secção de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).



**Privação alimentar:** Larvas de 3º estágio de *D. polymorpha* foram submetidas à privação alimentar por um período de 12 h. Após este período foi possível observar considerável diferença no padrão de pufação nas seções 41b e 42c do cromossomo 2R (figura 24). Pelo menos 80% dos analisados apresentaram *puffs* maiores nestas regiões. O cromossomo 3L também apresentou padrão diferencial de pufação. As seções 62a, 64a/b e 77/78 apresentaram-se mais expandidas em pelo menos 55% dos indivíduos analisados (figura 25).

Figura 24. Comparação do padrão de pufação da região 42c e 41b entre indivíduo controle e submetido à privação alimentar de 12h. Cromossomo politênico 2R (Elemento de Müller E) de *D. polymorpha*. Número (41,42) representa secção e letra (a,b) subsecção de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

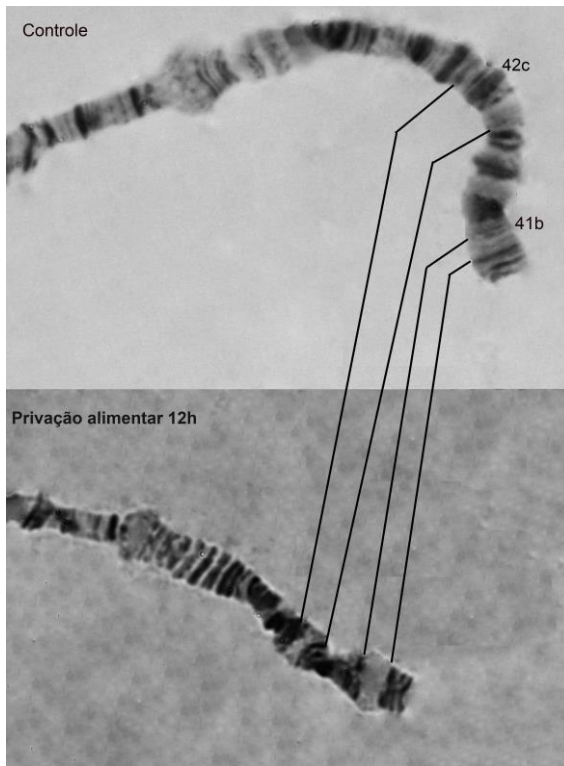
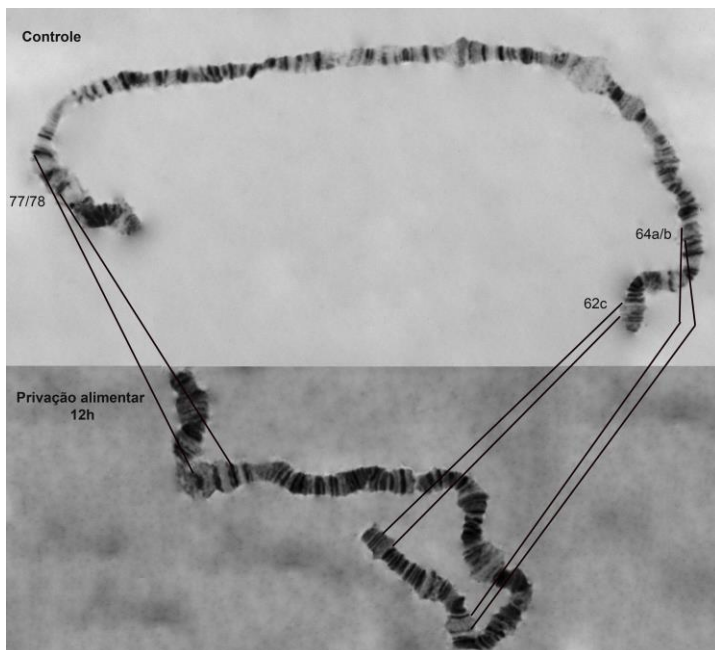


Figura 25. Comparação do padrão de pufação da região 62c, 64a/b e 77/78 entre indivíduo controle e submetido à privação alimentar de 12h. Cromossomo politênico 3L (Elemento de Müller D) de *D. polymorpha*. Números representam secção e letra subsecção de acordo com mapa cromossômico da espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).





## 5. DISCUSSÃO

A média de 14 dias para o ciclo de vida de *D. polymorpha* determinada neste trabalho se assemelha a dados provenientes do Tucson *Drosophila* Stock Center, ciclo do ovo ao adulto com duração 15 dias à temperatura e condições similares (Markow e O'Grandy, 2006). Linhagens provenientes de San Diego Stock Center, à temperatura de 18-25°C, registrou média de 12-16 dias no ciclo de vida de espécies do grupo *cardini*. As variações na duração do ciclo são difíceis de ser explicadas, no entanto é importante considerar o meio de cultura usado na manutenção das linhagens, procedência das linhagens e condições e tempo de manutenção em laboratório, pois interferem na duração do ciclo de vida (Bizzo et al., 2012).

A maioria das espécies de *Drosophila*, ao eclodirem, os indivíduos adultos não são maduros sexualmente (Markow, 1996) e *D. polymorpha* segue este padrão. A maturação sexual requer alguns semanas dependendo da espécie e, em algumas delas, os machos maturam antes que as fêmeas, porém na grande maioria as fêmeas maturam antes. Os resultados deste trabalho mostram que *D. polymorpha* se enquadra no primeiro caso, com a maturação do macho no quinto dia e da fêmea no sexto dia após eclosão. As similaridades e variações na maturação sexual entre espécies muito se deve a distância filogenética entre elas.

Ainda, é importante ressaltar que o comportamento de corte dos machos não indica plenamente o estado de maturação sexual. Isso é demonstrado pelo fato de que machos imaturos podem copular sem liberarem esperma, e fêmeas podem se tornar receptivas antes de apresentarem ovários maduros (Markow, 1996). Além disso, diferenças nestes aspectos também podem acontecer devido a variações genéticas intraespecíficas ou devido à composição do meio de cultura utilizado. Novas isolinhagens serão coletadas a fim de reforçar os resultados aqui apresentados.

A fim de facilitar comparações com cromossomos de outras espécies e tornar o estudo de evolução cromossômica mais instigante, foi realizada a identificação dos elementos de Müller para *D. polymorpha*. Embora os elementos de Müller para *D. polymorpha* neste trabalho terem sido aqui determinados por homologia de bandas, a confiabilidade desta determinação é grande, uma vez que para isso foi usado o mapa cromossômico de *D. unipunctata* como referência. *D. unipunctata* e *D. polymorpha* apresentam padrão de bandas bastante similar, e seus grupos encontram-se no mesmo gênero (*Drosophila*), divergindo a mais

de 6,6 milhões de anos atrás (Hatadani et al., 2009). Além disso, os elementos de Müller são extremamente conservados, com cerca de 95% dos genes localizados no mesmo elemento entre as espécies com estes cromossomos (Schaeffer et al., 2008).

O estudo do polimorfismo de inversão cromossômica e a descrição de novos arranjos em *D. polymorpha* tem sido investigado por Rhode e Valente, 1996, De Toni, et al., 2001 e Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., (no prelo) anteriormente. Heed e Russel, 1971 também relataram a presença de arranjos nesta espécie, porém sem o registro dos pontos de quebra em um mapa cromossômico.

De acordo com a última versão do mapa cromossômico de *D. polymorpha* (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo), o elemento mais polimórfico nesta espécie é o elemento C, seguido do elemento E. Em seguida, os elementos A e D apresentam o mesmo grau de polimorfismo, com três inversões descritas, e o elemento B é o menos polimórfico, com apenas duas inversões. Nas populações analisadas no presente trabalho, o elemento E foi o mais polimórfico, seguido do elemento A. Nos outros elementos não foram encontradas inversões.

Na espécie *D. unipunctata* os dados de polimorfismo são similares. A ordem decrescente de polimorfismo dos elementos é: E → B e C, com o mesmo grau de polimorfismo → A → D. O grande polimorfismo no elemento E também foi observado em espécies do grupo *repleta*, onde aproximadamente 70% das inversões estão concentradas neste elemento (Wasserman, 1992). Ainda, estudos comparando a taxa de fixação de inversões entre espécies, como *D. virilis* e *D. montana* (Vieira et al., 1997) e *D. repleta* e *D. buzzati* (Ranz et al., 2003), afirmam a tendência do elemento E como o mais polimórfico, acumulando o maior número de inversões fixadas. Comparação entre outros dípteros, como por exemplo, *Anopheles gambiae* com *A. funestus*, também mostrou maior taxa de fixação de inversões no elemento E (Sharakhov et al., 2002).

Inferindo os elementos de Müller em espécies do subgrupo *cardini*, de acordo com a homologia do padrão de bandas, observamos que não existe o mesmo grau de polimorfismo entre os elementos nas espécies do grupo. Aparentemente, o polimorfismo de inversão, mesmo em espécies filogeneticamente muito próximas, não segue um padrão conservado de correspondência nos elementos de Müller. Há casos em que todos os cromossomos de uma espécie possuem diversas inversões paracêntricas enquanto em outra espécie muito próxima na escala evolutiva, o polimorfismo de inversão está concentrado em apenas um elemento, como em *D. miranda* e *D. pseudoobscura* (Bartolomé e



Charlesworth, 2006), ou *D. melanogaster*, com mais de 500 inversões descritas e *D. simulans*, com apenas 14 (Aulard et al., 2004). Contudo existem casos em que as espécies de um grupo apresentam o mesmo elemento como o mais polimórfico. Em espécies do grupo *tripunctata* (*D. mediopunctata*, *D. unipunctata* e *D. roehrae*), investigadas por Brianti et al., 2012, o elemento E, apresentou-se como o mais polimórfico em todas elas.

Até o momento, não há evidências concretas de que inversões cromossômicas sejam mais propícias a ocorrerem em maior quantidade em um elemento do que em outro. Tampouco as características físicas do genoma de *Drosophila* são consistentes o suficiente para justificar as quebras cromossômicas, não apresentando grandes quantidades de DNA repetitivo ou duplicações (Ranz et al., 2007, Bhutkar et al., 2008). O fato de alguns elementos se mostrarem mais conservados, como os elementos B e D, pode estar relacionado com a presença de genes com regulação altamente restrita onde a presença de inversões poderia interferir de forma negativa na expressão destes genes, contudo, não existem evidências a favor desta hipótese. Nos elementos mais polimórficos, como os elementos D e E, os genes rearranjados provavelmente possuem maior plasticidade na sua regulação, permitindo que os arranjos se mantenham. Portanto, o fato de alguns elementos apresentarem poucas inversões não significa que elas não ocorram nestes elementos, apenas sugere que elas não são capazes de se manter por não serem neutras ou vantajosas.

Assim, supõe-se que as inversões surgem na mesma taxa em todos os elementos, mas que a intensidade da seleção purificadora é responsável pela atuação seletiva entre os elementos (Papaceit et al., 2006).

O estudo do polimorfismo cromossômico no grupo *cardini* é relativamente recente. Assim, é possível que futuros estudos descrevam um padrão diferente na distribuição de inversões paracêntricas, conforme avanço nas pesquisas envolvendo este grupo.

Heed e Russel (1971) trabalharam com polimorfismo cromossômico no grupo *cardini* e encontraram inversões apenas nos braços cromossômicos 2L e X, sendo este último braço (elemento A), o mais polimórfico. De Toni e colaboradores, 2001 em um estudo envolvendo populações de regiões continentais e insulares de Santa Catarina, determinaram o braço cromossômico 2R (elemento E) como o mais polimórfico e a inversão 2RA, descrita por Rohde e Valente, 1996, como a mais frequente em ambas regiões continentais e insulares. De

acordo com resultados deste trabalho, o braço 2R (elemento E) também foi o mais polimórfico nas populações analisadas.

As regiões de coleta deste trabalho são Unidades de conservação administradas pela FATMA que apresentam categorias diferentes: Parque da Serra do Tabuleiro (TB) e Reserva Biológica no caso Aguaf (AG) e Canela Preta (CP). Parques via de regra apresentam maior flexibilidade quanto ao uso e acesso da área pelo público. Nas Reservas Biológicas o manejo ambiental é bastante restrito e o acesso é permitido apenas para pesquisadores. Apesar de protegidas por serem Unidades de Conservação, estas regiões continuam pressionadas pelo desmatamento ilegal, queimadas e campos de caça. Dentre os locais onde foram realizadas coletas, CP representa o local com maior grau de preservação, seguido de AG, e com o menor grau de conservação, TB (Machado et al. dados ainda não publicados). Quanto ao polimorfismo de inversão cromossômica, observa-se que apesar de CP ter sido coletado uma amostra menor, em geral a frequência de cada inversão encontrada, com exceção da 2RA, foi maior quando comparada aos outros locais. O ambiente quanto mais conservado, maior é o número de nichos distintos esperados e, desta forma, os diferentes polimorfismos de inversão garantem uma heterogeneidade da população (Da Cunha et al. 1950, 1959; Da Cunha e Dobzhansky, 1954. Estudos sobre o polimorfismo de inversão com mais amostras e estudos taxonômicos estão sendo desenvolvidos nestas áreas, os quais irão corroborar com a definição do grau de conservação das regiões.

A inversão 2RA, a qual aparece em maior frequência nas populações do TB e AG deste trabalho, foi pela primeira vez descrita por Rhode e Valente, 1996, como sendo o único arranjo encontrado em estudo realizado com populações de Porto Alegre/RS. A grande frequência deste arranjo nas populações e nas linhagens analisadas no presente trabalho, sugere que a inversão 2RA está fixada nestas populações. O mesmo se aplica para a inversão 2RD na população de CP, a qual igualmente se encontra bastante frequente. Ainda, os pontos de quebra destas inversões foram reavaliados e redefinidos neste trabalho. A inversão 2RA passou a compreender as secções 48b-52b e 2RD as secções 45b-47a.

A inversão 2RD, foi pela primeira vez descrita por De Toni et al., 2001. Naquele trabalho os autores relataram uma frequência bem menor desta inversão em populações de Santa Catarina em relação a 2RA. O arranjo 2RA+D (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo), também aparece consideravelmente nas linhagens analisadas.

A altíssima frequência destes arranjos ou sugere ação purificadora da Seleção Natural, ou efeito de fundador associado à deriva genética nesta população. Estas hipóteses estão sendo testadas por Machado e colaboradores (dados ainda não publicados) que realizam um estudo de filogeografia nesta região. No entanto, na maioria dos casos de estudos sobre polimorfismo de inversão cromossômica em *Drosophila*, suportam a hipótese da manutenção destes arranjos por seleção natural (Dobzhansky, 1948, 1970; Kirkpatrick e Barton, 2006; Ruiz et al., 2012). O fato é que genes dentro de um segmento invertido sofrem bem menos alterações do que genes fora dos mesmos, possibilitando assim a manutenção de combinações favoráveis (Corbett-Detig e Hartl, 2012). Estudos mostraram que as inversões cromossômicas em *Drosophila* podem estar associadas com características fenotípicas importantes como: tamanho do corpo, tamanho da asa, resistência ao calor, ao frio e à fome, longevidade, fertilidade, viabilidade, tempo de desenvolvimento e habilidade competitiva (Hoffmann, 2004; Hoffmann e Rieseberg, 2008). Estes fatores são importantes na determinação da sobrevivência e do sucesso reprodutivo dos indivíduos e assim são selecionados positivamente. Quanto ao desenvolvimento dos indivíduos, ainda não foi realizado nenhum estudo que associe a presença de inversões a desvios no desenvolvimento larval.

É importante ressaltar que as inversões não compreendem apenas um simples ponto de mutação, mas uma mudança estrutural complexa que envolve muitos *loci* que podem sofrer mutações ao longo de sua trajetória evolutiva. Assim, as explicações para a adaptabilidade e o aumento da frequência das inversões podem não ser mutualmente exclusivas, pois diferentes inversões podem ser bem sucedidas devido a diferentes razões enfrentadas ao longo de sua trajetória (Ruiz et al., 2012)

Ao unir as informações provenientes dos resultados da determinação dos elementos de Müller por homologia e do polimorfismo de inversão cromossômica em populações de *D. polymorpha*, torna-se possível a comparação do padrão de *puffs* induzidos (temperatura, anoxia, privação alimentar) e avaliar possíveis genes envolvidos nestes *puffs* ou genes próximos as alças de inversões.

Em geral, os genes envolvidos na resposta de algum tipo de estresse são os *Heat Shock Genes* – *hsps*, os quais têm sua expressão aumentada com o intuito de proporcionar proteção a célula contra possíveis danos. Algumas proteínas *Hsps* são altamente conservadas ao longo do processo evolutivo animal devido ao sucesso de sua função nos

organismos. Nos cromossomos politênicos, regiões com alta expressão destes genes podem ser visualizadas pela formação de *puffs*.

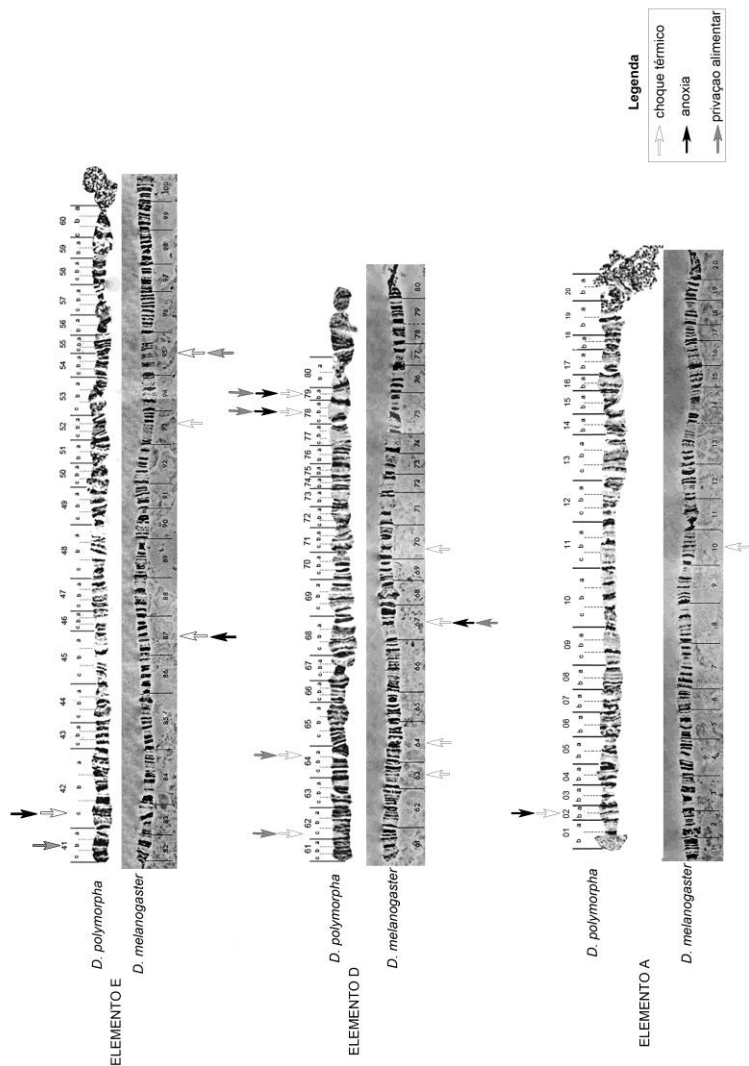
Assim, a análise comparativa do padrão de *puffs* induzidos em *D. melanogaster* (gênero *Sophophora*) e *D. polymorpha* (gênero *Drosophila*) revela extensiva reorganização dentro dos elementos e resposta diferencial da expressão de genes quando submetidos à estresses. De acordo com resultados, observa-se que houve indução de *puffs* nos mesmos elementos, no entanto em regiões diferentes (figura 25).

Ao submeter larvas de *D. polymorpha* a choque térmico foram observadas seis regiões onde houve formação de *puffs* (02, 42c, 62c, 64a, 78 e 79). Para a mesma condição de estresse em *D. melanogaster* foram relatadas nove regiões (33b, 63c, 64f, 67a, 70a, 87a, 87c, 93d e 95d; Ashburner, 1967). Para anoxia, *D. polymorpha* apresentou quatro *puffs* (02, 42c, 78 e 79) e *D. melanogaster*, dois (67B e 87a; Pierre et al., 2014). Para privação alimentar, *D. polymorpha* apresentou cinco *puffs* (41b, 62c, 64a, 78 e 79) e em *D. melanogaster* dois (67b, 95d; Pierre et al., 2014; figura 26).

Visto que o elemento E de *D. polymorpha* apresenta as inversões mais frequentes nas populações aqui estudadas, este elemento foi cuidadosamente analisado quanto ao padrão de *puffs* induzidos em relação a possíveis genes envolvidos nestes *puffs* e nas proximidades das alças de inversões. Houve a formação de *puffs* na região proximal do cromossomo de *D. polymorpha*: secção 41b para privação alimentar e 42c para choque térmico e anoxia. Enquanto para *D. melanogaster*, encontram-se na região central, 87A2 e 87C para choque térmico e anoxia e região proximal, 95D11, para choque térmico e privação alimentar (Pierre et al., 2014).

Testes de indução (estresse) realizados com linhagens sem e com inversões não apresentaram diferença no padrão de pufação.

Figura 26. Comparação do padrão de *puffs* entre os elementos de Müller de *D. polymorpha* e *D. melanogaster* quando induzidos por choque térmico, anoxia e privação alimentar. Dados e imagem para *D. melanogaster* de acordo com Ashburner, 1967; Pierre et al., 2014. Imagem cromossomos *D. polymorpha*: Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

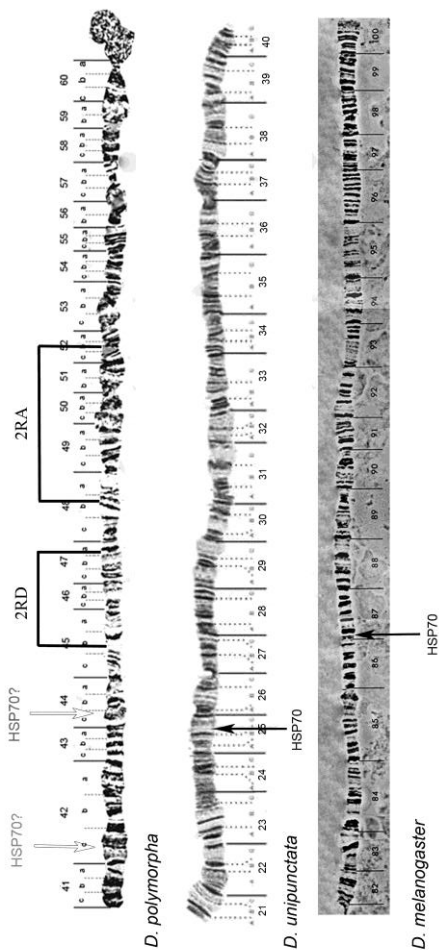


Na região 87a2 do elemento E de *D. melanogaster*, localiza-se o gene *hsp70* (Pierre et al., 2014). Em *D. unipunctata*, este gene está localizado na secção 25b do mesmo elemento (Brianti et al., 2012). A partir da comparação dos elementos E de *D. polymorpha*, *D. unipunctata* (gênero *Drosophila*) e *D. melanogaster* (gênero *Sophophora*) é possível prever a localização desta *hsp* em *D. polymorpha*. Embora este elemento seja bastante polimórfico, o que poderia dificultar a comparação de bandas, foi possível encontrar regiões homólogas entre os cromossomos e assim propor que o gene *hsp70* possivelmente está localizado na secção 44c em *D. polymorpha*, com certa proximidade às alças de inversões dos arranjos mais frequentes encontrados nesta espécie (2RA, 2RD, 2RA+D; figura 27). Esta distância entre este gene e a alça de inversão é questionável quanto a possibilidade de este gene apresentar alteração na sua expressão devido ao arranjo cromossômico.

Ainda, a região onde se localiza o gene *hsp70* em *D. melanogaster* ocorre a formação de *puffs* induzidos por choque térmico e anoxia, como esperado visto a função deste gene. Em *D. polymorpha*, a região 42c tem a formação nítida de *puff* quando induzida pelos mesmos agentes estressores. Este fato sugere que *hsp70* também se encontra nesta secção do cromossomo, possivelmente uma cópia duplicada deste gene.

A duplicação gênica de *hsps* é conhecida em *Drosophila*. Os loci 87A e 87C de *D. melanogaster* apresentam de 10-12 genes praticamente idênticos de *hsp70* (Ish-Horowicz et al., 1979). Este número extra de cópias aumenta a eficiência de termo-tolerância em muitas etapas do desenvolvimento (Feder et al., 1996). Além disso, o número de cópias de *hsp70* varia naturalmente entre populações, e essa variação persiste mesmo depois de um longo tempo e cultura de laboratório (Mirault et al., 1979).

Figura 27. Localização de genes *hsp70* nos elementos de Müller E em três espécies: *D. polymorpha* (Imagem Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo) *D. unipunctata* (Imagem Brianti et al., 2012) (gênero *Drosophila*) e *Drosophila melanogaster* (Imagem: Pierre et al., 2014) (gênero *Sophophora*).



ELEMENTO E

Se as inversões encontrados em *D. polymorpha* estão sendo mantidas por seleção natural, uma probabilidade muito plausível, a vantagem conferida não parece se dever a expressão de genes de resposta aos estresses testados. Porém, a localização do gene *hsp70* ainda deixa dúvida sobre uma possível participação no processo, uma vez que é um gene de expressão forte, o que torna difícil mensurar variações em sua expressão somente através dos *puffs* formados. O sequenciamento dos pontos de quebra e do conteúdo gênico das inversões aplicando técnicas de sequenciamento de nova geração poderá esclarecer o papel que estes arranjos podem estar representando. Um dos exemplos bem sucedidos foi realizado com *D. mojavensis*, uma espécie adaptada a regiões quentes e desertas (Guillén e Ruiz, 2012).

A interferência na expressão gênica causada pelas inversões foi claramente relatada por Ruiz et al., 2012, onde foram observadas alterações na estrutura e expressão de genes associadas com cinco pontos de quebra em *D. mojavensis*. O ponto de quebra distal da inversão 2r nesta espécie separa dois genes *hsp68* similares conectados. Com a inversão, um dos genes, *hsp68a*, permaneceu em sua posição original, no entanto sofreu mudança radical na sua estrutura e sequência, o que provavelmente lhe conferiu nova função e padrão de expressão. O outro gene, *hsp68b*, aparentemente manteve seu elemento regulatório (HSE), mas foi realocado a uma região de eucromatina totalmente diferente, próxima a um bloco de ~90kb composto por genes de Histona e Elementos Transponíveis (TEs). Algumas populações africanas de *D. melanogaster* mostraram baixa na expressão de *hsp70* causada por inserção de TEs próximos a região promotora do gene *hsp70Ba*, devido a possibilidade de TEs influenciarem na organização da cromatina (Lerman e Feder, 2005, Zhang e Pugh, 2011). Com isso, acredita-se fortemente que as alterações na expressão de *hsp68* em *D. mojavensis* contribuíram na termo-tolerância desta espécie cactófila, endêmica de desertos do sudoeste dos EUA e nordeste do México (Ruiz et al., 2012).

A análise comparativa da localização do gene *hsp70* ao longo do elemento E ainda nas três espécies no presente trabalho revela a movimentação do gene ao longo do processo evolutivo. O mesmo acontece para as *hsp83* e *hsp27*, no elemento D (figura 27). Este elemento em *D. polymorpha* e *D. unipunctata* apresenta padrão de bandas muito similar, principalmente devido ao baixo polimorfismo que apresenta. Assim, a previsão da localização destas *hsps* por homologia de bandas tem grande confiabilidade. Já a comparação deste elemento com *D. melanogaster*, a qual pertence a outro subgênero, mostra que estas *hsps* encontram-se em regiões totalmente diferentes (figura 28).

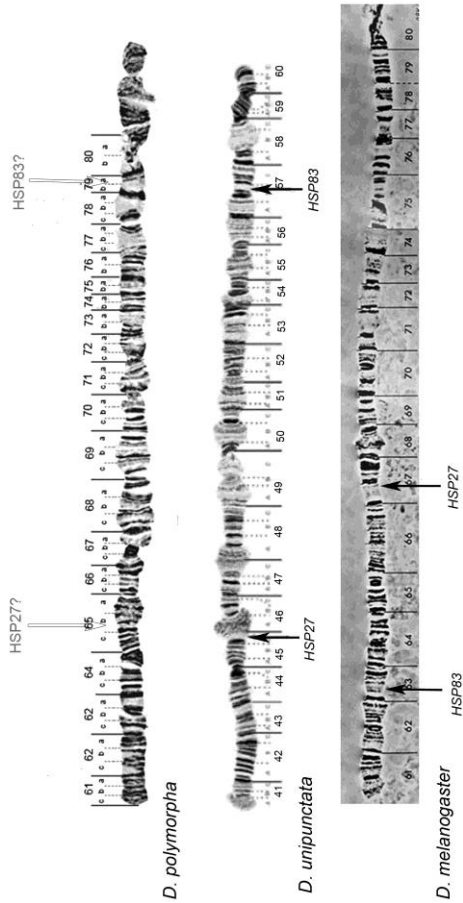


Esta reorganização e reposicionamento foi ocasionada por inversões paracêntricas, extremamente comuns em *Drosophila* e responsáveis em grande parte por este rearranjo gênico ao longo dos elementos (Bhutkar et al., 2008; Schaeffer et al., 2008).

O grande acúmulo de inversões em alguns elementos pode tornar a comparação da organização molecular interespecífica pouco eficiente. Por isso, a maneira mais eficaz para a determinação dos elementos e localização de genes implica na utilização de técnicas moleculares como a hibridização fluorescente *in situ*. Assim, está em andamento trabalho com a utilização desta técnica em espécies do grupo *cardini*, em colaboração com o grupo de pesquisadores do Instituto de Biologia da UNICAMP, liderado pelo professor Dr. Louis Bernard Klaczko.

Estudos envolvendo o grupo *cardini* ainda são muito recentes. Os resultados deste trabalho indicam que este grupo apresenta aspectos genéticos, evolutivos e ecológicos interessantes a serem explorados. Pesquisas utilizando espécies do grupo *cardini* como material de estudo estão sendo realizadas e planejadas, as quais juntamente com os resultados apresentados neste trabalho contribuirão para uma análise mais eficiente e sólida dos diversos aspectos deste grupo, o qual apresenta grande representividade nas regiões neotropicais.

Figura 28. Localização de genes *hsp27* e *hsp83* nos elementos de Müller D em três espécies: *D. polymorpha*, *D. polymorpha* (Imagem Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo) *D. unipunctata* (Imagem Brianti et al., 2012) (gênero *Drosophila*) e *Drosophila melanogaster* (Imagem: Pierre et al., 2014) (gênero *Sophophora*).



ELEMENTO D

## 6. CONCLUSÕES

A fim de elucidar e compreender melhor aspectos particulares do objeto de estudo, iniciou-se este trabalho desvendando características do ciclo de vida de *D. polymorpha*. Foi determinada a duração de cada etapa do seu desenvolvimento partindo do ovo ao adulto, além da idade da maturidade sexual dos machos e fêmeas. A média registrada para o ciclo de vida desta espécie foi de 14 dias. A maturidade sexual dos machos acontece no quinto dia após eclosão e das fêmeas a partir do sexto dia.

A fim de possibilitar a comparação dos braços cromossômicos entre diferentes espécies, foi realizada a determinação dos elementos de Müller para a espécie *D. polymorpha* por meio de homologia de bandas com a espécie *D. unipunctata*, a qual pertence ao mesmo subgênero e apresenta grande similaridade cariotípica. Os resultados indicam que os braços cromossômicos X, 2L, 2R, 3L, 3R de *D. polymorpha* correspondem aos elementos A, B, E, D, C respectivamente.

A identificação dos elementos de Müller da espécie *Drosophila polymorpha* (grupo *cardini*), objeto deste estudo, ainda que por homologia de bandas, permitiu prever a localização de genes, a sugerir e questionar a provável relação destes com o polimorfismo de inversão. Além disso, permitiu evidenciar a reorganização do genoma ao longo do processo evolutivo em espécies de *Drosophila*.

O estudo do polimorfismo de inversão cromossômico revelou que as três áreas estudadas apresentam relativamente o mesmo grau de polimorfismo, com os arranjos 2RA e 2RD possivelmente fixados nas populações de AG e CP respectivamente. Estes arranjos estariam possivelmente sendo mantidos pela ação da seleção natural, a qual manteve a nova configuração gênica por contribuir de forma favorável às condições ambientais em que estas populações se encontram.

Durante o estudo do polimorfismo cromossômico, os pontos de quebra das inversões 2RA e 2RD foram reavaliados. O ponto de quebra proximal da inversão 2RA foi alterado para a secção 52b, mantendo-se o ponto de quebra distal primeiramente descrito. Para a inversão 2RD, foi alterado o ponto de quebra distal, o qual agora está compreendido na secção 45b, mantendo-se o ponto de quebra proximal. Além disso, uma nova inversão foi descrita para a espécie *Drosophila neocardini* (grupo *cardini*). Esta nova inversão encontra-se no cromossomo X (elemento de Müller A), compreendendo as secções 13b proximal e 9b distal.

Quanto à expressão de *puffs* nos cromossomos politênicos de larvas de *D. polymorpha*, uma análise comparativa da localização dos

*puffs* e de genes *hsps* induzidos em diferentes espécies, revelou grande reorganização desses genes ao longo dos elementos. Esta reorganização deve-se em grande parte ao acúmulo inversões paracêntrica ao longo da existência destas espécies, as quais reposicionaram estes genes nos elementos.

A análise comparativa dos elementos por homologia de bandas não verificou a ocorrência de *puffs* em resposta aos estresses testados (choque térmico, anoxia e privação alimentar) muito próximos ou dentro das regiões de inversão e nem diferenças marcantes entre a expressão dos mesmos quando comparados com indivíduos com os arranjos estudados. Foi prevista a localização de *hsps*, e verificou-se que existe certa proximidade da *hsp70* aos arranjos mais frequentes estudados. No entanto esta proximidade é questionável quanto a possibilidade da alteração da expressão devido ao arranjo. Se as inversões encontrados em *D. polymorpha* estão sendo mantidas por seleção natural, o que estudos com outras espécies tem sugerido, a vantagem conferida não parece se dever a expressão de genes de resposta as condições de estresses testadas

Assim, este trabalho explorou aspectos importantes que envolvem a ecologia, evolução e genética do grupo *cardini*, com foco na espécie *D. polymorpha*. As conclusões aqui apresentadas contribuirão na continuidade de estudos futuros envolvendo esse grupo.

## 7. PERSPECTIVAS

O estudo do polimorfismo de inversão cromossômica está sendo ampliado com a análise dos cromossomos politênicos de isolinhagens provenientes dos mesmos locais aqui estudados. Um estudo de filogeografia está em desenvolvimento nestas regiões de Mata Atlântica de Santa Catarina e irá analisar o polimorfismo genético em três diferentes espécies de diferentes grupos e subgêneros, utilizando sequências de DNA que apresentam alto nível de polimorfismo (sequências de DNA microssatélite, sequência de introns e genes nucleares). Os marcadores nucleares que serão utilizados permitirão avaliar a estrutura genética intraespecífica das populações e verificar a existência de fluxo gênico, tentando assim confirmar a hipótese da seleção natural atuando sobre os arranjos encontrados.

Seria necessário sequenciar as regiões invertidas e seus pontos de quebra, para definir os genes envolvidos nesta região e então realizar uma análise quantitativa da expressão gênica (RT-PCR) de genes candidato (com possibilidade de estar envolvido em mecanismos adaptativos) em linhagens com e sem arranjo cromossômico.

Ainda, a determinação dos elementos de Müller por *FISH* poderá confirmar a relação estabelecida neste trabalho, além da possibilidade de uma análise comparativa interespecífica mais eficiente e detalhada. Esta técnica molecular com espécies do grupo *cardini* esta em andamento e conta com a colaboração de pesquisadores do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, grupo liderado pelo professor Dr. Louis Bernard Klaczko.



## REFERÊNCIAS

- Anderson A. R., Hoffmann A. A., McKechnie S.W., Umina P. A., Weeks, A. R. 2005. The latitudinal cline in the In(3R)Payne inversion polymorphism has shifted in the last 20 years in Australian *Drosophila melanogaster* populations. **Molecular Ecology**, 14: 851–858.
- Ashburner M. 1967. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, 27: 47-63.
- Ashburner M. 1970. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. **Chromosoma**, 31(3):356-376.
- Ashburner M. Berendes H. D. 1978. Puffing of polytene chromosomes. In **The Genetics and Biology of *Drosophila***, (Ed. M.Ashburner and T. R. F.Wright), Academic Press, New York, 2b: 315–395.
- Ashburner M., 1989. *Drosophila* : A laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Aulard S., Monti L., Chaminade N., Lemeunier F. 2004. Mitotic and polytene chromosomes: comparisons between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica**, 120: 137-150.
- Balbani E. G. 1881. Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les lames de Chironomus. **Zoologische Anzeiger**, 4: 637-64.
- Bächli G. 2014. Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em: <<http://www.taxodros.uzh.ch/>>. Acesso em: Jun. 2013.
- Balanyà J., Solé E., Oller J. M., Sperlich D., Serra L. 2004. Long-Term Changes in the Chromosomal Inversion Polymorphism of *Drosophila subobscura*. II. European Populations. **Journal of Zoological Systems of Evolutionary Research**, 42: 191-201.

Bartolomé C., Charlesworth B. 2006. Rates and patterns of chromosomal evolution in *Drosophila pseudoobscura* and *D. miranda*. **Genetics**, 173:779-791.

Beermann W. 1956. Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. **Quantitative Biology**, 21: 217–232.

Berendes H. D. 1965. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. **Chromosoma**, 17 (1): 35-77.

Bettencourt B. R., Hogan C. C., Nimalli M., Drohan B. W. 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of *Hsp70* copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in *Hsp70* null flies. **BMC Biology**, 6:5.

Bhutkar A., Russo S. M., Smith T. F., Gelbart W. M. 2007. Genome scale analysis of positionally relocated genes. **Genome Research**, 17: 1880–1887.

Bhutkar A., Schaeffer S. W., Russo S. M., Xu M., Smith T. F., et al. 2008. Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. **Genetics**, 179: 1657–1680.

Bizzo, L., Gottschalk, M. S., De Toni, D. C., Hofmann, P. R. P. 2010. Seasonal dynamics of a Drosophilid assemblage and its potential as bioindicators in open environments. **Iheringia. Série Zoologia**, 100: 185-191.

Bizzo L., Vanderlinde T., Wildemann B., De Toni D., 2012. Technical adaptations of instant medium for *Drosophila*. **Drosophila Information Service**, 95: 121-122.

Brianti T. M., Ananina G., Klaczko L. B. 2012. Differential accuracy of chromosome inversion polymorphisms among Müller's elements in three species of the *tripunctata* group of *Drosophila*, including a species with fast chromosomal evolution. **Genome**, 53:17-26.

Brooker R. J. 2012 *Concepts of Genetics*. McGraw-Hill.

Brisson J.A., De Toni D.C., Duncan I., Templeton A.R. 2005.



Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*: geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. **Evolution**, 59: 1046–1059.

Brisson J. A., Wilder J., Hollocher H. 2006. Phylogenetic analysis of the *cardini* group of *Drosophila* with respect to changes in pigmentation. **Evolution**, 60: 1228-1241.

Clayton, F. E., Gest W. C. 1986. Overview of chromosomal evolution in the Family Drosophilidae, In **The Genetics and Biology of *Drosophila***, edited by M. Ashburner, H.L. Carson and J.N. Thomson. Academic Press, New York, 3e: 1-38.

Celniker S. 2003. The *Drosophila melanogaster* Genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 4:89-117.

Charlesworth B. 2009. Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Reviews Genetics**, 10: 195-205.

Comins H. N., Noble I. R. 1985. Dispersal, variability, and transient niches: species coexistence in a uniformly variable environment. **American Naturalist**, 126(5): 706-723.

Corbett-Detig R. B., Hartl D. L. 2012. Population Genomics of Inversion Polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. **Public Library of Science Genetics**, 8(12).

Cordeiro J., De Toni., Valente V. L. S. 2014. Chromosomal evolution in the *Drosophila cardini* group (Diptera: Drosophilidae): photomaps and inversion analysis. **Genetica**. No prelo.

Da Cunha A. B., 1949 – Genetic analysis of the polymorphism of colour pattern in *Drosophila polymorpha*. **Evolution**, 3: 239-251.

Da Cunha A. B. 1950. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. **Evolution**, 4: 212-235.

Da Cunha A. B., Brncic D., Salzano F. M. 1953. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. **Heredity**, 7: 193-202.

Da Cunha A. B., Dobzhansky T. 1954. A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. **Evolution**, 2(8): 119-134.

Da Cunha A. B., Dobzhansky T., Pavlovsky O., Spassky B. 1959. Genetics of natural populations. Supplementary data on the chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. **Evolution**, 13:389-404.

De Frutos R., Latorre A., Pascual L. 1987. Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. IV. Position effect at the boundaries of the E~2 inversion. **Genetica**, 75: 11-22.

De Toni, D. C., Hofmann, P. R. P. 1994. Preliminary taxonomic survey of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) at Morro da Lagoa da Conceição, Santa Catarina Island, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, 3(55): 347-350.

De Toni D.C., Herédia F.O., Valente V.L.S. 2001. Chromosomal variability of *Drosophila polymorpha* populations from Atlantic Forest remnants of continental and insular environments in the State of Santa Catarina, Brazil. **Caryologia**, 54 (4): 329–337.

De Toni D. C., Brisson J. A., Hofmann P. R. P. 2005. First record of *Drosophila parthenogenetica* and *D. neomorpha*, *cardini* group, Heed, 1962 (*Drosophila*, Drosophilidae), in Brazil. **Drosophila Information Service**, 88: 33-38.

De Toni D. C., Gottschalk M. S., Cordeiro J., Hofmann P. R. P., Valente V. L. S. 2007. Study of de *Drosophilidae* (Diptera) communities on Atlantic Forest islands of Santa Catarina State, Brazil. **Neotropical entomology**, 36(3): 356-375.

Dilorio P. J., Holsinger K., Schults R. J., Hightower L. E. 1996. Quantitative evidence that both Hsc70 and Hsp70 contribute to thermal adaptation in hybrids of the livebearing fishes *Poeciliopsis*. **Cell Stress Chaperones**, 1: 139-147.

Dobzhansky T. 1948. Genetics of natural populations. XVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection in

natural populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. **Genetics**, 33: 158-176.

Dobzhansky T. 1970. Genetics of the evolutionary process. **Columbia University Press, New York**, 505 pp.

Feder M.E., Cartano N. V., Milos L., Krebs R.A., Lindquist S.L. 1996. Effect of engineering *hsp70* copy number on *hsp70* expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Experimental Biology**, 199(8): 1837–1844.

Feder M. E., Hofmann G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, 61: 243-282.

Freire-Maia N., Pavan, C. 1949. Introdução ao estudo da *Drosophila*. **Cultus**, 5:1-71.

González J., Casals F., Ruiz A. 2006. Testing chromosomal phylogenies and inversion breakpoint reuse in *Drosophila*. **Genetics**, 175: 167–177.

Gottschalk M. S., De Toni D. C., Valente V. L. S., Hofmann P. R. 2007. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical entomology**, 36(6): 848-862.

Guillén Y., Ruiz A. 2012 Gene alterations at *Drosophila* inversion breakpoints provide prima facie evidence for natural selection as an explanation for rapid chromosomal evolution. **BMC Genomics**, 13: 53.

Hatadani L. M., McInerney J. O., de Medeiros H. F., Martins Junqueira A. C., de Azeredo-Espin A. M., Klaczko, L. B. 2009. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 51: 595–600.

Harbison S. T., Chang S., Kamdar K. P., Mackay T. F. C. 2005. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*. **Genome Biology**, 6: R36

Heed W.B., Blake P. 1963. A new colour allele at the E locus of *Drosophila polymorpha* from Northern South America. **Genetics**, 48: 217-234.

Heed W. B., Russell J. S. 1971. Phylogeny and population structure in island and continental species of the *cardini* group of *Drosophila* studied by inversion analysis. **University of Texas Publications**, 7103: 91-130.

Hoekstra L. A., Montooth, K. L., 2013. Inducing extra copies of the *Hsp70* gene in *Drosophila melanogaster* increases energetic demand. **BMC Evolutionary Biology**, 13: 68.

Hoffmann A. A., Sgro' C. M. Weeks A. R. 2004. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. **Trends in Ecology e Evolution**, 19: 482-488.

Hoffmann A. A., Rieseberg L. H. 2008. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, 39: 21-42.

Hottiger, T., De Virgilio C., Bell W., Boller R., Wiemken A. 1992. The 70-kilodalton heat-shock induced accumulation of trehalose and promote recovery from thermal stress in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, 210: 125-132.

Ish-Horowicz D., Pinchin S. M., Schedl P., Artavanis T. S., Mirault, M. E. 1979. Genetic and molecular analysis of the 87A7 and 87C1 heat-inducible loci of *D. melanogaster*. **Cell**, 18: 1351-1358.

Jennings B. H. 2011. *Drosophila* – A versatile model in biology and medicine – Review article. **Materials Today**, 14(5): 190-195.

Kirkpatrick M., Barton N., 2006 Chromosome inversions, local adaptation and speciation. **Genetics**, 173: 419-434.

Kirkpatrick M., 2010. How and why chromosome inversions evolve. **Public Library of Science Biology**, 8:e1000501.

Krimbas C. B., Loukas M. 1984. Evolution of the obscura group *Drosophila* species. I. Salivary chromosomes and quantitative characters

in *D. subobscura* and two closely related species. **Heredity**, 53: 469-482.

Krimbas C. B.; Powell, J. R. 1992. *Drosophila* inversion polymorphism. **C.R.C. Boca Raton, Florida**, 2-52.

Lande R. 1984. The Expected Fixation Rate of Chromosomal Inversions. **Evolution**, 38:743-752.

Lee J. H., Hubel A., Schöffl F. 1995. Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, 8: 603-612.

Lerman D. N., Feder M. E. 2005. Naturally corruring transposable elements disrupt *hsp70* promoter function in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, 22: 776-783.

Li G. C., Yang S. H., Kim D., Nussenzweig A., Ouyang H., Wei J., Burgman P., Li L. 1995. Suppression of heat-induced *hsp70* expression by the 70kDa subunit of the human Ku-autoantigen. **Proceedings of National Academy of Science**, 90: 3078-3082.

Machado M. X., De Toni D. C., Hofmann P. R. P. 2001. Abdominal pigmentation polymorphism of *Drosophila polymorpha* (Dobzhansky and Pavan, 1943) collected on Ilha de Santa Catarina and neighboring islands. **Biotemas**, 14 (1): 87-107.

Mason P. J., Hall L. M. C., Gausz J. 1984. The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster* (heat shock/abundant transcripts/developmental regulation). **Molecular Genetics and Genomics**, 194:73-78.

Markow T. A. 1996. Evolution of *Drosophila* mating systems. **Evolutionary Biology**, 29: 73-106.

Markow T. A., O'Grady P. M. 2006. *Drosophila*: A guide of species and use. Academic Press, London.

Martinez M. N., Cordeiro A. R. 1970. Modifiers of colour pattern genes in *Drosophila polymorpha*. **Genetics**, 64: 573-587.

Mirault M. E., Goldschmidt-Clermont M., Artavanis-Tsakona S., Schedl P. 1979. Organization of the multiple genes for the 70000-dalton heat-shock protein in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of National Academy of Sciences**, 79: 5254-5258.

Montooth K.L., Siebenthal K.T., Clark A.G., 2006. Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. **J. Experimental Biololy**, 209, 3837–3850.

Müller J. H. 1940. Bearings of the *Drosophila* work on systematic, In **New Systematics**, ed Huxley. Clarendon Press, Oxford, 185-284.

Navarro A., Barbadilla A., Ruiz, A. 2005. Effect of inversion polymorphism on the neutral nucleotide variability of linked chromosomal regions in *Drosophila*. **Genetics**. 155: 685-698.

O’Grady P.M., Baker R. H., Durando C. M., Etges W. J., DeSalle R. 2001. Polytene chromosomes as indicator of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. **BMC Evolutionary Biolgy**, 1:6.

Painter T. S. 1933. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. **Science**, 78: 585-586.

Papaceit M., Agudé M., Segarra C. 2006. Chromosomal evolution of elements B and C in the *Sophophora* subgenus of *Drosophila*: evolutionary rate and polymorphism. **Evolution**, 60(4): 768–781.

Patterson J., Stone W. 1952. Evolution in the Genus *Drosophila*. New York: Macmillan Co.

Pierre S.E., Ponting L., Stefancsik R., McQuilton P., The FlyBase Consortium . 2014. **FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase**. [Http://flybase.com](http://flybase.com). Acesso junho, 2014.

Powell J. R. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology, In **The *Drosophila* model**. Oxford University Press, New York.

Prasad N. G. e Joshi A. 2003. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? **Journal of Genetics**, 82: 45–76.

Paaby A. B. 2009. The evolutionary genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. Publicly accessible **Penn Dissertations**. Paper 35.

Prevosti A., Ribo G., Serra L., Aguade M., Balaña J. et al., 1988 Colonization of America by *Drosophila subobscura*: experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, 85: 5597-5600.

Ranz J. M., Segarra C., Ruiz A. 1997. Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. **Genetics**, 145(2): 281-295.

Ranz J. M., González J., Casals F., Ruiz A. 2003. Low occurrence of gene transpositions events during the evolution of the genus *Drosophila*. **Evolution**, 57(6): 1325–1335.

Ranz J.M., Maurin D., Chan Y. S., Grotthuss M.V., Hillier L. W., et al. 2007. Principles of genome evolution in the *Drosophila melanogaster* species group. **Public Library of Science Biology**, 5: 1366–1381.

Remsen J., O'Grady, P.M. 2002. Phylogeny of drosophilidae (diptera), with comments on combined analysis and character support. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 24(2): 248–263.

Richards S., Liu Y., Bettencourt Br., Hradecky P., Letovsky S., Nielsen R., et al. 2005. Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: Chromosomal, gene, and *cis*-element evolution. **Genome Research**, 15(1): 1-18.

Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, 18: 517-573.

Robe, L.J., Valente, V.L., Budnik, M., 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. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 623–640.

Rohde C., Valente V. L. S. 1996. Cytological maps and chromosomal polymorphism of *Drosophila polymorpha* e *Drosophila cardinoides*. **Brazilian Journal of Genetics**, 19: 27-32.

Roque F., Oliveira, S. C. F., Tidon R. 2011. Technical adaptations of retention traps used to catch drosophilids. **Drosophila information service**, 94: 140-141.

Schaeffer S. W. 2008. Selection in heterogeneous environments maintains the gene arrangement polymorphism of *D. pseudoobscura*. **Evolution**, 62: 3082-3099.

Sene F. M., Val F. C., Vilela C. R., Pereira M. A. Q. R.. 1980. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Papéis avulsos Zoologia**, 33(22): 315-326.

Sharakhov I.V., Serazin A.C., Grushko O. G., Dana A., Lobo N., Hillenmeyer M. E., et al. 2002. Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. **Science**, 298:182–185.

Solé E., Balanyá G. J., Sperlich D., Serra L. 2002. Long-term changes in the chromosomal inversion of *Drosophila sobobscura*. I. Mediterranean populations from southwestern Europe. **Evolution**, 56: 830-835.

Sonoda E., Hohegger H., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S. 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. **DNA Repair**, 5: 1021-1029.

Sorensen J. G., Kristensen T. N., Niklos G. L. G. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. **Ecology letter**, 6: 1025-1037.

Stalker H. D. 1972. Intergroup phylogenies in *Drosophila* as determined by comparisons of salivary banding patterns. **Genetics**, 70: 457-474.



Sturtevant A. H., 1931 Known and probable inverted sections of the autosomes of *Drosophila melanogaster*. **Publication Carnegie Institution**, 421: 1-27.

Sturtevant A. H., Novitski E. 1941. The homologies of chromosome elements in the genus *Drosophila*. **Genetics**, 26: 517-541.

Sturtevant A. H. 1942. The classification of the genus *Drosophila*, with description of nine new species. **University of Texas Publications**, 4213: 5-51.

Throckmorton, L. H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In **Handbook of Genetics** (R. C. King, Ed.). Plenum, New York, 421-459.

Throckmorton L. 1982 The *virilis* species group, In **The Genetics and Biology of *Drosophila***, edited by M. Ashburner and E. Novitsky. Academic Press, New York, 3: 227-296.

Vlassova I. E., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 1983. Induction of giant heat-shock *puffs* in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* by 20-OH-ecdysone and ethanol. **Drosophila information service**, 59: 134-136.

Vieira J., Vieira C. P., Hartl D. L., Lozovskaya E. R. 1997. Discordant rates of chromosome evolution in the *Drosophila virilis* species group. **Genetics**, 147:223-230.

Welte M. A., Tetrault J. M., Dellavalle R. P., Lindquist S. L. 1993. A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. **Current Biology**, 3: 842-853.

Wheeler M. R., Kambyzellis M. P. 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. **University of Texas Publications**, 6615: 533-56.

Wheeler M. R. 1981. The Drosophilidae: A taxonomic overview. In **The Genetics and Biology of *Drosophila*** (M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N. Thompson, Jr., Eds.) Academic Press, New York, 3:1-97.

Whiting J. H. J. R., Pliley M. D., Farmer J. L., Jeffery D. E. 1989. *In situ* hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. **Genetics**, 122 (1): 99-109.

Wildemann B., De Toni D. C., 2011 Analysis of inversion polymorphism and new inversion recorded in *Drosophila polymorpha* in the South of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Drosophila Information Service**, 94: 95-98.

Yoon J. S., Resch K., Wheeler Mr. 1972. Intergeneric chromosomal homology in the family Drosophilidae. **Genetics**, 71: 447-480.

Zhang Z, Pugh B. F. 2011. Genomic organization of H2Av containing nucleosomes in *Drosophila* heterochromatin. **Public library of Science One**, 6:e20511.

## APÊNDICE

### 3. Ciclo de vida de *Drosophila polymorpha*

Artigo submetido e publicado no periódico *Drosophila information service*, v.96 p.147-150, 2013

#### ***Drosophila polymorpha* life cycle**

Vanderlinde, T.<sup>1</sup>; Wildemann, B.<sup>1,2</sup>; Bizzo L.<sup>1</sup>; De Toni, D.C.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Laboratório de Drosofilídeos, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – Universidade Federal de Santa Catarina, <sup>2</sup> Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, UFSC, Florianópolis, Brasil; e-mail: [thyago.vanderlinde@gmail.com](mailto:thyago.vanderlinde@gmail.com), [detoni@ccb.ufsc.br](mailto:detoni@ccb.ufsc.br)

Keywords: *cardini* subgroup, biodiversity, reproduction, life history, speciation, sexual maturity

#### **Introduction**

Many studies on the subject of the *Drosophila* life history have revealed that much of the observed interspecific variability can be explained by genetic interaction and ecological traits (Markow and O’Grady, 2006; Prasad and Joshi, 2003). The life cycle is one of the most important factors that determine the *Drosophila* life history.

There is considerable interspecific variation in each of the *Drosophila*’s life cycle stages, making this type of fly a quite versatile model for life history studies (Jennings, 2011). Thorough knowledge of each developmental stage of *Drosophila* could clarify some evolutionary questions, such as the mechanisms underlying morphological differentiation, and also the ecological results during the speciation process. Our study expands upon the *Drosophila polymorpha* life cycle, from egg to adult.

Furthermore, a comparison is made with other species of *Drosophila*, an important factor that leads to a better understanding of evolution within the genus.

Increasing numbers of studies on sexual isolation of *Drosophila* have ensured that there are many inter-specific differences in the reproductive biology for this group that contribute to the speciation process (Coyne et al., 1994).

The elucidating life cycle of *Drosophila polymorpha*, from egg to adult, and its age of sexual maturity in particular, are important aspects to be explored, once it can be shown that they have valuable roles involving specific ecological traits. The investigation of these topics also incites good maintenance of the flies stock for its studies.

*D. polymorpha* belongs to the cardini group, and, as for most of Neotropical species, there are not many studies regarding their reproductive biology and life cycle. Therefore, so far, these topics remain poorly understood.

### **Material and Methods**

Seven different samples of *D. polymorpha* were obtained from two conserved areas in the central and southern regions of Rainforest in the state of Santa Catarina, Brazil: the Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (27°48'20"S; 48°33'50"O), and the Reserva Biológica Estadual do Aguaí (27°16'49.55"S; 49°8'31.7"O).

In order to guarantee that all flies were raised under identical conditions, the vials containing a potato flake medium (Bizzo et al., 2012) were maintained at 22°C in a 12-hr light/12-hr dark photoperiodic cycle. With the purpose of facilitating observation of both eggs and larvae, the medium was colored with blue food dye. These conditions were maintained throughout the experiment.

The life cycle was tested using 15 females and 5 males, all of the test objects with a lifespan of one week. They were isolated in a vial, containing medium for one hour with the aim of achieving copulation and oviposition. Subsequently the adults were removed, thus ensuring that all eggs were laid at a similar time. During the 12 h of light, the vials were inspected under a stereoscopic microscope every three hours, in order to check the larval development. The experiment was repeated four times, and the oviposition action was considered as the starting point of the cycle.

In the second experiment, 20 couples of flies were collected on the day of hatching and individualized in vials containing a culture medium. During the daylight period, the couples were observed every hour for 15 minutes. Male sexual maturity was considered to be reached once 80% of male flies showed courtship behavior or copulation. The evidence of sexual maturity for females was based on either at least 80% of females allowing copulation or the presence of eggs (Markow and O'Grady, 2006).

## Results

During the life cycle experiment of *D. polymorpha*, on the first and second day of the experiment, no larval instars were detected; only eggs were observed. On the third day, the first instar larvae were found in all vials. On the fifth day, second instar larvae were observed, and on the sixth day, third instar larvae. On the seventh day the pupal stage took place, and finally, on the 14th day, adult flies hatched. Thus, the *D. polymorpha* developmental time, from egg to adult, is achieved in 14 days. The whole life cycle is represented in Figure 1.

In the second test, only 6 vials containing the fly couples remained alive until the end of the experiment. We observed two males displaying courtship on the fourth day, three on the fifth day, and six on the sixth day. Regarding the females, one showed receptivity on the fifth day and another on the sixth day. Interesting data showed intraspecific variation: At 8:40 am on the fourth day of experiment, the first male demonstrated courtship behavior, and the first copulation was recorded only on the next day at the same time. Although these are preliminary results, the age of male sexual maturity is clearly reached on the fifth day after hatching, for females on the sixth day.

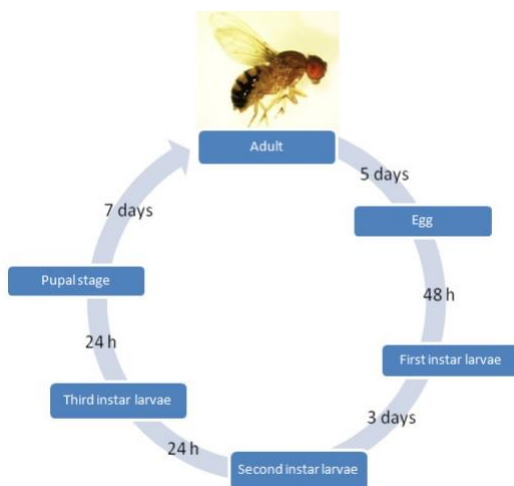


Figure 1. *Drosophila polymorpha* life cycle

## Discussion

The average life cycle of *Drosophila polymorpha* reported on here was 14 days in duration, close to the 15 days of lines at the Tucson *Drosophila* Stock Center under similar temperature conditions (Markow and O'Grady, 2006). It is very difficult to explain variations; however, a number of factors could provide some important insight. The first is culture medium variation, since we use a different recipe compared to Tucson. Bizzo et al. (2012) also reported that *D. polymorpha* presented an average 30 days life cycle in corn medium. A second factor is intraspecific genetic variation, since the lines of the Stock Center are from Central America, while ours are from southern South America. A third influential factor is endogamy: Stock Center lines have been maintained for decades in artificial laboratory conditions. The fly lines that were used during this investigation were established in March 2013, which might suggest that the results presented here are in closer resemblance of natural conditions.

In any case, the differences were small and were within the expected length for the *cardini* group, as shown in Table 1. The fact that in this experiment the flies were kept at higher temperatures may be the reason for acceleration of the cycle. Also, the San Diego *Drosophila* Stock Center maintains its flies of the *cardini* group at temperatures between 18-25°C, and reports life cycles between 12-16 days, depending on the species and the temperature used. Still, this study enriches the literature, recounting the life cycle in more detail.

**Table 1.** Egg to adult development time of the *cardini* group at the Tucson *Drosophila* Stock Center

| Species                        | Days | Temperature (°C) |
|--------------------------------|------|------------------|
| <b>subgroup <i>dunni</i></b>   |      |                  |
| <i>D. dunni</i>                | 15   | 18               |
| <i>D. nigrodunni</i>           | 15,5 | 18               |
| <b>subgroup <i>cardini</i></b> |      |                  |
| <i>D. cardinoides</i>          | 15   | 18               |
| <i>D. neocardini</i>           | 15   | 18               |
| <i>D. parthenogenetica</i>     | 15   | 18               |
| <i>D. polymorpha</i>           | 15   | 18               |
| <i>D. procardinoides</i>       | 15   | 18               |

Table adapted from Markow e O'Grady, 2006

For the majority of species, freshly hatched adults are not sexually mature (Markow, 1996), and *D. polymorpha* keep this pattern. In fact, sexual maturity may require up to several weeks, depending on the species (Markow and O'Grady, 2006). While males of some species mature earlier than females, most males mature later than females (Markow and O'Grady, 2008). The results of our work indicate that this species belongs to the first case, similar to *D. melanogaster* that requires 4 days for females to mature and 2 days for males. Equally they are unlike *D. mojavensis* that requires 3 days for females to mature and 7 for males. Furthermore, it can be seen that there is much variation in time between the three species mentioned, a fact that can be justified by the phylogenetic distance between them.

Aiming to map the start of sexual maturity for South Brazilian non-inbreeding lines, more experiments will need to be performed using this species, especially owing to the high mortality rate. Also, the flies' courtship behavior should not necessarily be considered a fully decisive indication of sexual maturity. This is demonstrated by the fact that immature males can achieve copulation without releasing sperm, and

females can become sexually receptive before they in fact present mature eggs (Markow, 1996). Furthermore, because metabolic waste from males, present in the culture medium, can change the age at which sexual maturity is reached (Joshi et al., 1998), new isolines have been collected in order to reinforce the data obtained from this study.

References: Bizzo, L., T. Vanderlinde, B. Wildemann, and D. De Toni 2012, *Dros. Inf. Serv.* 95: 121-122; Coyne, J.A., A.P. Crittenden, and K. Mah 1994, *Genet. Research* 57: 113-122; Jennings, B.H., 2011, *Materials Today* 14(5): 190-195; Joshi, A., W.A. Oshiro, J. Shiotsugu, and L.D. Mueller 1998, *Journal of Biosciences* 23(3): 279-283; Markow, T.A., 1996, *Evolutionary Biology* 29: 73-106; Markow, T.A., and P.M. O'Grady 2006, *Drosophila: A Guide of Species and Use*. Academic Press, London; Markow, T.A., and P.M. O'Grady 2008, *Functional Ecology* 22: 747-759; Prasad, N.G., and A. Joshi 2003, *Journal of Genetics* 82: 45-76.



#### 4. Registro de uma nova inversão e reanotação de pontos de quebras de inversões em espécies do grupo *cardini*

\* Artigo redatado de acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Biology – GMB*, ao qual será submetido para publicação como *Short communication* (Versão em Português).

Bruna Wildemann<sup>1</sup>, Angelica Francesca Maris<sup>2</sup>, Daniela Cristina De Toni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Drosofilídeos, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Neurogenética do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Palavras-chave: citogenética  
, polimorfismo cromossômico, cromossomos politênicos

Resumo: Este artigo relata a presença de uma nova inversão paracêntrica na região mediana do braço cromossômico X em *Drosophila neocardini*. A nova inversão, nomeada como XA, compreende as seções 13b proximal e 9b distal. Uma análise cuidadosa dos pontos de quebra descritos anteriormente para *Drosophila polymorpha* foram reavaliados. Análise comparativa de fotos das inversões e o uso de fotomapa de referência com melhor definição permitiram apresentar mudanças nos pontos de quebra das inversões 2RA (52b proximal) e 2RD (45b distal). Todos os indivíduos analisados foram coletados em locais preservados de Santa Catarina/Brasil.

#### Introdução

Inversões cromossômicas foram pela primeira vez descritas por Sturtevant em 1917 como recombinações modificadas em *Drosophila melanogaster*, que ocorrem quando o cromossomo quebra simultaneamente em dois pontos e o seguimento resultante é reinserido na posição invertida. As inversões são classificadas em dois tipos: inversões pericêntricas, as quais envolvem a região centromérica e inversões paracêntricas que excluem a região centromérica, sendo estas as mais comuns (Kribas e Powell, 1992).

Polimorfismo de inversão cromossômica entre espécies de *Drosophila* é um dos sistemas mais estudados em genética de

populações e apresentam papel importante na adaptação, especiação e evolução dos cromossomos sexuais (Kirkpatrick, 2010). A variação do polimorfismo de inversão em uma população permite estimar a diversidade genética das espécies enquanto a comparação entre populações fornece informações do fluxo gênico e da fragmentação do habitat onde estas populações residem (Feder et al., 2011).

O grupo *cardini* pertence ao subgênero *Drosophila* e foi estabelecido por Stutervant (1942). Este grupo apresenta 16 espécies com distribuição geográfica envolvendo grande parte da América Neotropical (Heed e Russell, 1971). Este grupo se divide em dois subgrupos: *dunni* (*D. antillea*, *D. arawakana*, *D. belladunni*, *D. caribiana*, *D. dunni*, *D. nigrodunni*, *D. similis*) e *cardini* (*D. bedichecki*, *D. acutilabella*, *D. cardinoides*, *D. neocardini*, *D. neomorpha*, *D. parthenogenetica*, *D. polymorpha*, *D. procardinoides*).

*Drosophila neocardini*, descrita por Streinsinger, 1946 e *Drosophila polymorpha*, Dobzhansky e Pavan, 1943, espécies do grupo *cardini*, são extremamente similares morfológicamente e em seus aspectos ecológicos (Rohde e Valente, 1996). Ambas as espécies são moscas de áreas de floresta e são diferenciadas a partir da análise da genitália interna do macho e pelo padrão de pigmentação abdominal.

Estudos envolvendo inversões cromossômicas no grupo *cardini* mostram que *D. neocardini* não possui muitos arranjos descritos até o momento, enquanto *D. polymorpha* é a espécie mais polimórfica do grupo (Rohde e Valente, 1996; De Toni et al., 2001). Ainda, em estudos envolvendo populações provenientes de regiões insulares e continentais de *D. polymorpha* determinou que as populações insulares são mais polimórficas que as continentais. Isto se deve provavelmente devido grande heterogeneidade ambiental encontrada nas regiões insulares, o que promove um número maior de nichos colonizados pelas moscas e assim suportando de forma mais adequada uma comunidade (De Toni et al., 2001). Até o momento, 18 arranjos cromossômicos foram descritos em *D. polymorpha* e três arranjos em *D. neocardini* (tabela 1).

Os dados apresentados neste trabalho resultaram de um projeto maior sobre o estudo do polimorfismo de inversão cromossômica em espécies do grupo *cardini* provenientes de regiões conservadas do estado de Santa Catarina. No decorrer do estudo uma nova inversão paracêntrica em *D. neocardini* foi encontrada e os pontos de quebra de inversões previamente descritas para *D. polymorpha* foram reanotados.

## Métodos

Amostras de *Drosophila* foram obtidas com o uso de armadilhas contendo iscas de banana fermentada (Roque et al., 2011) provenientes de três unidades de conservação de Santa Catarina: Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (S 27°48' 20"; 48°33'50 W), Reserva Biológica Estadual do Aguai (27°16'49.55" S; 49°8'31.17" W) e Reserva Biológica Estadual da Canela Preta (27°16'49.55"S; 49°8'31.17"W).

Isolinhagens foram estabelecidas e os polimorfismos de inversões de cada amostra foram analisados a partir da observação do padrão de bandas dos cromossomos politênicos. Lâminas para a observação dos cromossomos foram preparadas de acordo com Ashburner, 1967 e as imagens dos melhores núcleos foram capturadas usando câmera digital acoplada ao microscópio. As imagens foram montadas e melhoradas usando o programa Adobe® Photoshop® (Adobe® Photoshop® CS5 extended, v 12.0 x32).

O registro da nova inversão e a correção dos pontos de quebra foram estabelecidos usando o fotomapa de referência proposto por Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., (no prelo).

## Resultados

Uma nova inversão no braço cromossômico X foi encontrada em uma isolinhagem de *D. neocardini* proveniente da Reserva Biológica Estadual do Aguai, nomeada com XA. Os pontos de quebra envolvem as secções 13b proximal e 9b distal (figura 1). Este é o primeiro arranjo cromossômico descrito no cromossomo X para esta espécie.

Rohde e Valente (1996) descreveram pela primeira vez a inversão 2RA em *D. polymorpha*, compreendendo as secções 53a proximal e 48b distal. Esta é a inversão mais comum nesta espécie (Rohde e Valente, 1996; De Toni et al., 2001). Wildemann e De Toni (2001) descreveram uma nova inversão no cromossomo 2R na mesma espécie, e denominaram 2RE (secções 50a proximal e 48c distal).

O registro frequente de uma inversão próxima os pontos de quebra das inversões 2RA e 2RE, nos levou a reavaliar os pontos de quebra descritos para estas inversões em estudos anteriores. A comparação de imagens entre os arranjos 2RA, 2RE e a inversão presente no cromossomo 2R encontrada neste estudo (figura 2) nos levou a confirmação de que na realidade, 2RA, 2RE são as mesmas inversões, que foram descritas com pontos de quebra diferentes.

Portanto, sugerimos aqui um novo ponto de quebra para a inversão 2RA/2RE, o qual compreende as secções 52b proximal (ao invés de 53a ou 50a), mantendo o ponto de quebra distal na secção 48b.

Este fato nos levou a avaliar o ponto de quebra de outra inversão bastante frequentes nas populações de *D. polymorpha* deste trabalho. Constatou-se pela comparação de imagens, que a inversão 2RD nesta espécie, descrita por De Toni et al., (2001) apresenta erro na determinação do ponto de quebra distal, sendo este agora reanotado na secção 45b ( ao invés de 44a), mantendo-se o ponto de quebra proximal (47a).

## Discussão

Detectar as inversões e determinar seus pontos de quebra permite direcionar estudos relacionados à importância destes arranjos, visto que as inversões persistem nas populações naturais como recombinações protegidas, formando complexo de genes coadaptados (Dobzhansky, 1951). Se duas inversões subsequentes com pontos de quebra similares ou idênticos são negligenciadas, pode resultar em uma falha nos estudos das relações filogenéticas. Quando duas inversões diferentes são avaliadas com a mesma, cria um link filogenético falso entre espécies que não são relacionadas (Rohde e Valente, 2012).

A interpretação errônea confirmada aqui dos pontos de quebra da inversão 2RA sugeriu que a inversão encontrada no cromossomo 2R neste estudo, fosse uma nova inversão. No entanto, foi confirmado a partir da comparação de imagens e análise cuidadosa do fotomapa de *D. polymorpha* que não se tratava de um novo registro mas, que havia a necessidade de reanotar os ponto de quebra da inversão 2RA. Esta correção apenas foi possível devido ao desenvolvimento de fotomapa de alta definição desta espécie (Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo).

Os resultados e as observações aqui apresentadas mostram que o polimorfismo de inversão cromossômica merece atenção e estudos mais detalhados. A descrição detalhada das inversões, análise molecular isolada e o sequenciamento dos pontos de quebra podem fornecer informações mais precisas do conteúdo gênico nas regiões das inversões. Além disso, análise molecular pode detectar se a formação do novo arranjo ocasiona alteração na expressão gênica de genes próximos ou entre a alça invertidas (Wesley e Eanes, 1994).

**Agradecimentos:** Este trabalho teve o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC e Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina – FATMA. Os autores agradecem o auxílio prestado pelo Dr. Gordon Craggs na revisão da versão em Inglês deste trabalho.



## TABLES

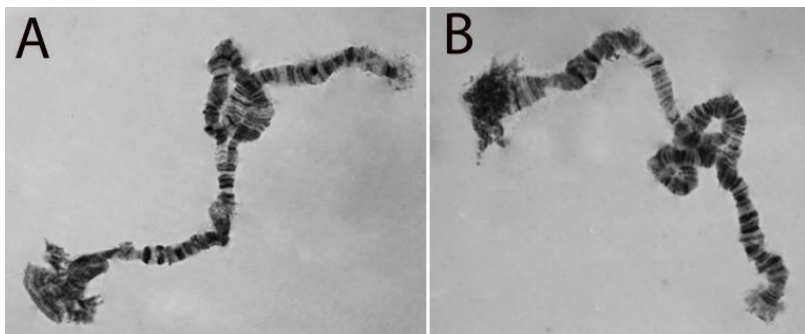
**Tabela 1.** Arranjos descritos para *Drosophila polymorpha* and *Drosophila neocardini*. X, 2, 3 representam a nomenclatura para os braços cromossômicos, R (*Right*) e L (*Left*) braços direito e esquerdo respectivamente, A, B, C, D nomenclatura dos arranjos.

| Espécie                      | Arranjo heterozigoto  | Primeira descrição                                   |
|------------------------------|---|--|
| <i>Drosophila polymorpha</i> | IIRA  | Rohde & Valente, 1996                                |
|                              | XA, XB, IILA, IILB, IIRB, IIRC,<br>IIRD, IIIRA  | De Toni <i>et al.</i> , 2001                         |
|                              | XC, IILA, IILB, IIILA, IILB, IIILC,<br>IIILC, IIIRB, IIIRC, IIIRD, IIIRE,<br>IIRA+C, IIRA+D | Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo |
| <i>Drosophila neocardini</i> | 3LA   | De Toni <i>et al.</i> , 2001                         |
|                              | 3LB, 3LC  | Cordeiro J., De Toni D.C. e Valente V.L.S., no prelo |

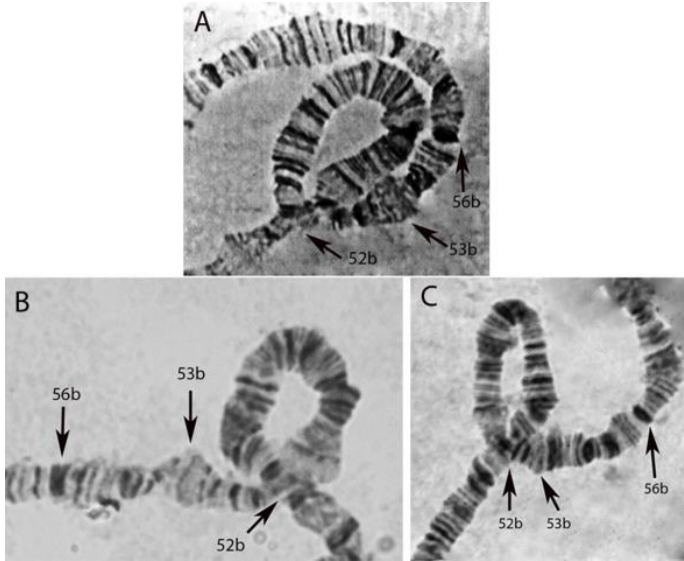




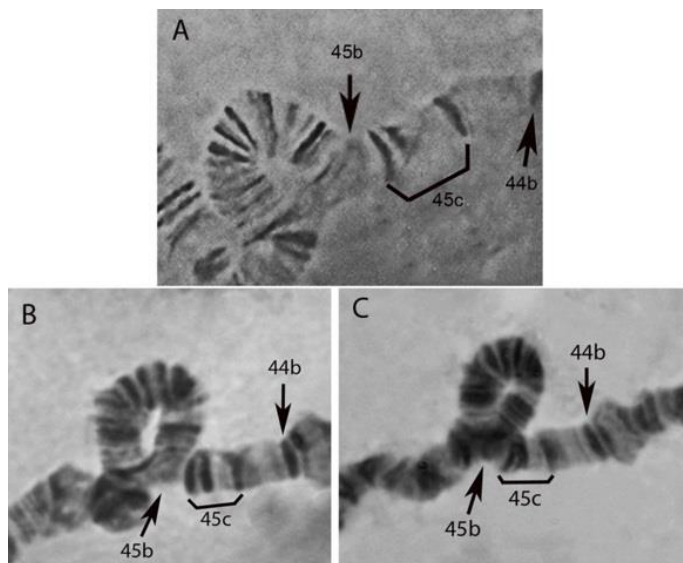
## FIGURES



**Figure 1.** A, B) Cromossomo politênicos X de *Drosophila neocardini* e a nova inversão, XA, em heterozigoto. Fonte: Presente trabalho.



**Figure 2.** Comparação da inversão 2RA em *Drosophila polymorpha*. A) Inversão 2RA (Imagem: Rohde e Valente, 1996). B) Inversão 2RE (Imagem: Wildemann e De Toni, 2011). C) Inversão 2RA/2RE encontrada neste estudo na Reserva do Aguai (Imagem: presente trabalho). Setas indicam seções características que facilitam a identificação das regiões do cromossomo.



**Figure 3.** Comparação da inversão 2RD de *Drosophila polymorpha*. A) Inversão 2RD (Imagem: De Toni et al., 2001). B) Inversão 2RD proveniente de linhagem da Serra do Tabuleiro (Imagem: presente trabalho). C) Inversão 2RD proveniente de linhagens do Reserva do Aguai (Imagem: presente trabalho). Setas indicam seções características que facilitam a identificação das regiões do cromossomo.



## References

Ashburner M (1967) Patterns of *puffing* activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 27: 47-63.

Cordeiro J., De Toni., Valente V. L. S. 2014. Chromosomal evolution in the *Drosophila cardini* group (Diptera: Drosophilidae): photomaps and inversion analysis. **Genetica**. No prelo.

De Toni D, Herédia F and Valente V (2001) Chromosomal variability of *Drosophila polymorpha* populations from Atlantic Forest remnants of continental and insular environments in the State of Santa Catarina, Brazil. *Caryologia* 54 (4): 329–337.

Dobzhansky T and Pavan C (1943) Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*. 36 (Biologia Geral 4): 7-72.

Dobzhansky, T (1951) *Genetics and the origin of species*. Columbia Univ. Press, New York.

Feder J, Gejji R, Powell T and Nosil P (2011) Adaptive chromosomal divergence driven by mixed geographic mode of evolution. *Evolution* 65-8: 2157–2170.

Kirkpatrick M (2010) How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biology* 8:e1000501.

Krimbas C and Powell J (1992). *Drosophila* inversion polymorphism. C.R.C. Boca Raton, Florida 2-52.

Rohde C and Valente V (1996). Cytological maps and chromosomal polymorphism of *Drosophila polymorpha* e *Drosophila cardinoides*. *Brazilian Journal of Genetics* 19: 27-32.

Rohde C and Valente VLS (2012). Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifty different rearrangements. **Genetic Molecular Biology** 4:966-976.

Roque F, Oliveira S and Tidon R. (2011) Technical adaptations of retention traps used to catch drosophilids. *Drosophila* Information Service 94:140-141.

Sturtevant A (1917). Genetic factors affecting the strength of linkage in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 3(9):555–558.

Wesley C and Eanes W (1994) Isolation and analysis of the breakpoint sequences of chromosome inversion In(3L)Payne in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Evolution 91: 3132-3136.

Wildemann B and De Toni D (2011) Analysis of inversion polymorphism and a new inversion recorded in *Drosophila polymorpha* in the South of Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. *Drosophila* Information Service 94:95-98.