
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



PRIANDA RIOS LABORDA

**“Marcadores moleculares microssatélites na investigação
do genoma de *Drosophila mediopunctata*:
desenvolvimento e
construção de mapa genético de ligação”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

PRIANDA RIOS LABORDA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Animal e Evolução .

Orientadora: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Campinas

Maio de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L113m Laborda, Prianda Rios
Marcadores moleculares microssatélites na investigação do genoma de *Drosophila mediopunctata*: desenvolvimento e construção de mapa genético de ligação / Prianda Rios Laborda. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Anete Pereira de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Drosophila*. 2. Microssatélites (Genética). 3. Mapeamento cromossômico. I. Souza, Anete Pereira de, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Microsatellites markers in the investigation of *Drosophila mediopunctata* genome: development and genetic linkage map construction.

Palavras-chave em inglês: *Drosophila*; Microsatellites (Genetics); Chromosome mapping.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Anete Pereira de Souza, Evandro Marsola de Moraes, Sérgio Russo Matioli, Maria Imaculada Zucchi, Sérgio Furtado dos Reis.

Data da defesa: 25/05/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 25 de maio de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis



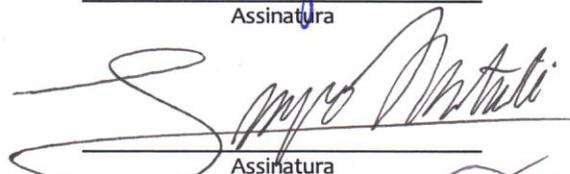
Assinatura

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi



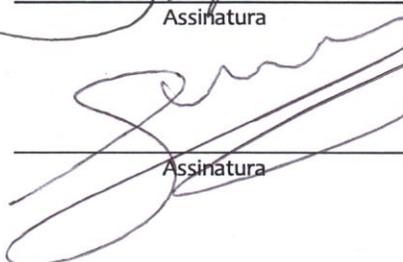
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Russo Matioli



Assinatura

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes



Assinatura

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

Assinatura

Dra. Maria Marta Pastina

Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas

Assinatura

Para os meus pais, **Jorge e Paraguassu**,
e meu irmão, **Igor**,
que continuamente me ensinam o que são **exemplo e presença**.



Drosophila mediopunctata

Dobzhansky & Pavan 1943

Foto por Gustavo M. Mori (2009)

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Aristóteles

“Não tenha medo da perfeição. Você nunca vai atingi-la.”

Salvador Dali

SUMÁRIO

	AGRADECIMENTOS	ix
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiii
	PREFÁCIO	xiv
	INTRODUÇÃO	1
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
	<i>Drosophila mediopunctata</i> – espécie modelo	5
Marcadores microssatélites – ferramentas moleculares no estudo de <i>Drosophila</i>		8
	<i>Drosophila</i> , microssatélites e mapeamento genético	12
	<i>Drosophila melanogaster</i> – seqüenciamento do genoma referência	17
	OBJETIVOS	21
	CAPÍTULO I	23
“ <i>Drosophila mediopunctata</i> microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies”		
	CAPÍTULO II	41
“ <i>Drosophila mediopunctata</i> microsatellites II: cross-species amplification in the <i>tripunctata</i> group and other <i>Drosophila</i> species”		
	CAPÍTULO III	59
“A molecular linkage map for <i>Drosophila mediopunctata</i> confirms synteny with <i>D. melanogaster</i> and suggests a region that controls the variation in the number of abdominal spots”		
	DISCUSSÃO GERAL	78
	CONCLUSÕES	87
	PERSPECTIVAS	89

LITERATURA CITADA	91
APÊNDICE I	103
APÊNDICE II	108
ANEXO	115

AGRADECIMENTOS

Aos professores membros de Exame de Qualificação, Banca Prévia e Banca de Defesa de Tese,
André Freitas, Evandro Moraes, Luciana Machado, Maria Imaculada Zucchi, Maria Lúcia Vieira, Maria Marta Pastina, Sérgio Matioli, Sérgio Reis,
pela disponibilidade e pelas revisões e contribuições. A importância de opiniões externas é inestimável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPG-GBM) e ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), que por suas excelências sempre proporcionaram ótimo ambiente científico.

À Sandra Lima e Tânia Zambon,
pela valiosa ajuda com a parte administrativa. Impressionam pela competência.

Aos meus queridos colegas do LAGM, Laboratório de Análise Genética e Molecular. São colegas de hoje e de ontem. Muitos, ainda bem. Ensinam-me constantemente a conviver com a diversidade e são o motivo principal do meu grande apego a este laboratório. Muito obrigada pela companhia, pela amizade, pela ajuda, pela paciência, pelo apoio técnico e por serem fonte de grande inspiração para mim. Estendo estes agradecimentos aos colegas que tive o prazer de conhecer durante os Cursos de SSRs. Corrirei o risco de esquecer alguém, mas não posso deixar de mencionar estes nomes: Adna Sousa, Adriano Azzoni, Alexandre Garcia, Alexandre Pelloso, Aline Crucello, Aline Farias, Ana Paula Fortuna, Antônio Saraiva, Benício da Silva, Bianca Vigna, Camila Mantello, Carla Silva, Carlos Cerqueira-Silva, Cleide Ferreira, Clelton dos Santos, Cristina Baldauf, Danilo Sforça, Deise Lima, Diana Balque, Dilaine Schneider, Elisa Santos, Estela Costa, Fábio Alves, Felipe Romanini, Fernanda Cidade, Fernando Suzuki, Guilherme Alleoni, Guilherme de Toledo e Silva, Gustavo Mori, Ilmarina Menezes, Janete Motta, José Sérgio Soares, Júlia Ottoni, Jussara de Paiva, Juverlande Lugli, Karine Oliveira, Karine Santos, Letícia Jungmann, Lilian Beloti, Livia Souza, Luciana Rossini, Marcelo Szymanski, Marcos Silva, Maria Beatriz Cortez, Maria Zilda da Silva, Marianna Favaro, Maurício Durigan, Melina Mancini, Melissa Garcia, Milena Lima, Mônica Conte, Patrícia Francisco, Patrícia Zambon, Paulo Cesar, Rafaela Trad, Roberta Miranda, Rodrigo Sasaki, Rute Carvalho, Susely Tada, Tallis Vaz, Tatiana Campos, Tatiana Torres, Thiago Balsalobre, Thiago Marconi, Valéria Scorsato, Vinícius Brito, Zildene Correa.

Aos colegas do Laboratório de Genética Estatística, ESALQ/USP, principalmente a Gabriel Margarido, Marcelo Mollinari, Maria Marta Pastina e Rodrigo Gazaffi.

São excelentes dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Genética Evolutiva e Ecologia de *Drosophila*, principalmente a Galina Ananina e Marcos Batista, pelo incentivo e por me ensinarem a trabalhar com *Drosophila*, e Claudete Couto, Iuri Ventura, Luciane Hatadani, Maria Salete Couto e Roberto Vieira, pela ajuda e agradável convivência nos primeiros anos do doutorado.

Aos colegas de representação discente Cláudia Moura, Luís Peroni, Mariana Lyra e Patrícia Jotta, pela convivência nas reuniões do PPG-GBM e por dividirem as preocupações com as questões menos românticas da pós-graduação.

Ao colega Juverlande Lugli, pelo incentivo constante, por desejar o melhor e por destinar a mim uma porção de seu instinto paternal.

Ao colega Gustavo Mori, com quem tive o prazer de dividir a bancada e os microssatélites de *Drosophila mediopunctata*. Mais gratificante ainda foi compartilhar a filosofia científica, as impressões sobre a vida acadêmica, a autoria de um trabalho e as horas extras fotografando drosófilas.

Ao colega Rodrigo Gazaffi, pelo enorme auxílio na condução das análises estatísticas, pela paciência e pela disponibilidade constante.

Ao professor Louis Bernard Klaczko, por ter me atraído para a pesquisa com *Drosophila* e por ter aberto o seu laboratório para a condução dos experimentos iniciais.

Ao professor A. Augusto Franco Garcia. Continua me inspirando com sua inteligência, seu equilíbrio e seu bom humor científico.

Ao professor Sérgio Furtado dos Reis, pela convivência nos últimos anos, pelas agradáveis tardes de estudo e por ser um exemplo de preocupação com o método, de disciplina e de humildade.

À professora Anete Pereira de Souza,
que em 1999 me aceitou como aluna de Iniciação Científica e até hoje me acolhe em seu laboratório. Obrigada pela paciência, pela compreensão, por me defender, por acreditar no meu trabalho. Sou testemunha da sua garra e admiro muitíssimo sua energia e seu entusiasmo com a vida acadêmica.

Aos amigos e familiares,
pela torcida constante, pela companhia e por se divertirem comigo nas conversas sobre moscas...

Ao meu irmão Igor Rios Laborda,
por ser meu parâmetro de habilidade social, por torcer à distância, por se preocupar e por me ajudar a interpretar o mundo de uma forma mais madura.

Aos meus pais, Paraguassu Rios Laborda e Jorge Roberto Laborda.
Não conseguirei fazer jus ao que sinto...
Obrigada por estarem sempre presentes, por endossarem as minhas escolhas. Agradeço por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse concluir o doutorado com tranqüilidade. Vocês, além de serem promotores dos meus sonhos, são meus exemplos de crença, perseverança, força e honestidade. Espero que se orgulhem deste trabalho na mesma proporção que me orgulho de vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP,
pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto de auxílio. É um privilégio contar com a FAPESP e sua filosofia de apoio à ciência.

À Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
São mais de 14 anos desde a minha chegada a esta instituição e hoje ainda sinto o mesmo orgulho de quando cheguei. É um prazer estudar aqui. Espero que a minha contribuição pessoal e científica seja digna desta casa.

RESUMO

Drosophila mediopunctata, mosca não cosmopolita de distribuição neotropical e pertencente ao grupo *tripunctata* do subgênero *Drosophila*, é uma espécie utilizada por alguns grupos no Brasil como modelo em estudos com enfoque evolutivo. Abordagens que exploram a biologia da espécie, tais como a detecção de variação genética natural e a influência de inversões cromossômicas na dinâmica populacional são costumeiramente usadas. Todavia, essa espécie não possui disponíveis marcadores moleculares que facilitem a investigação das bases genéticas que norteiam os eventos explorados até agora.

Os microssatélites são marcadores moleculares consagrados e a ferramenta de escolha no estudo de diversos organismos pela simplicidade de uso e de análise. Entretanto, para espécies que ainda não têm grande parte de seu genoma seqüenciado, a obtenção de marcadores desse tipo passa pela necessidade de desenvolvimento via bibliotecas genômicas.

Esse trabalho objetivou desenvolver, caracterizar e mapear microssatélites em *D. mediopunctata* para que estudos de variação morfológica, de identificação de regiões genômicas associadas a fenótipos de interesse, de genética de populações entre outros possam ser realizados com o respaldo de dados moleculares.

Uma biblioteca enriquecida em motivos repetitivos foi construída e, após o seqüenciamento de aproximadamente 2000 clones, 600 microssatélites foram identificados e 134 locos desenvolvidos. Os marcadores mostraram tamanho reduzido com relação ao número de repetições e preponderância de motivos AC/GT.

A aplicação dos microssatélites de *D. mediopunctata* para amplificações heterólogas em outras trinta espécies foi feita com aproximadamente 50% de sucesso. Em adição, o uso de dados de presença/ausência nas espécies do grupo *tripunctata* recuperou algumas relações filogenéticas previamente conhecidas.

Um mapa de ligação foi construído com 49 marcadores e revelou 450 cM de extensão. Os cinco principais cromossomos da espécie foram identificados por meio de comparações com o genoma de *D. melanogaster* e com os elementos de Müller. Essas comparações também confirmaram a grande sintenia prevista dentro do gênero *Drosophila*. Não houve concordância na ordem dos locos microssatélites nas duas espécies. No cromossomo II de *D. mediopunctata* foi mapeada uma região associada à característica “número de pintas abdominais”.

ABSTRACT

Drosophila mediopunctata, a non-cosmopolitan fly of Neotropical distribution that belongs to the *tripunctata* group of the *Drosophila* subgenus, was chosen by some Brazilian researchers as a model in evolutionary studies. Several approaches, such as the analysis of natural variation and the influence of chromosome inversions in population dynamics, are traditionally used. Nevertheless, molecular markers, which would enhance the investigation of the genetic bases of the already known phenomena, are still not available for the species.

Microsatellites are celebrated molecular markers and the chosen tool for the exploration of various organisms due to their ease of use. Nonetheless, their application in species whose genomes have not yet been sequenced requires a prior development phase.

This study intended to develop, characterize and map microsatellites for the species *D. mediopunctata* so that initiatives concerning morphological variation, identification of genomic regions linked to interesting phenotypes, population genetics, etc can be carried out in the light of molecular data.

A repetitive DNA-enriched library was constructed and approximately 2000 clones were sequenced. Six hundred microsatellites were identified and 134 loci were developed. The loci are small in length, with reduced number of motif repetitions, and are mainly composed of AC/GT dinucleotides.

The use of *D. mediopunctata* microsatellites for heterologous amplification in other thirty *Drosophila* species was done with a 50% success ratio. In addition, a clustering analysis carried out with binary data obtained from the *tripunctata* species recovered already known phylogenetic relationships.

A linkage map was constructed with recombination data of 49 markers and is 450 cM in length. The five major species chromosomes were identified on the basis of comparisons with the *D. melanogaster* genome and the Müller elements. This strategy also confirmed the great synteny predicted for the genus *Drosophila*. It was not observed agreement in loci order between both species. A genomic region associated to the number of abdominal spots was mapped to the chromosome II of *D. mediopunctata*.

PREFÁCIO

A estrutura deste trabalho reflete a nossa preocupação com a etapa final de um projeto de pesquisa científica: a publicação. Dada a liberdade que temos para efeitos de redação da tese, optamos por organizá-la em artigos, representativos de diferentes fases do projeto.

Será inicialmente apresentada uma revisão bibliográfica, que pretende simultaneamente mostrar o andamento da pesquisa com *Drosophila mediopunctata* e justificar a escolha dos marcadores microssatélites como instrumental molecular para estudos genéticos.

Posteriormente, dois artigos já publicados serão reproduzidos. Eles narram a fase de desenvolvimento dos microssatélites (Capítulo I) e a extensão destes marcadores a outras espécies de *Drosophila*, com ênfase no grupo *tripunctata* (Capítulo II). O Capítulo III, ainda não publicado mas também preparado em formato de artigo científico, apresenta a etapa final do projeto, com a construção do mapa genético pra *D. mediopunctata* e o que pudemos entender na comparação com *D. melanogaster* e outras espécies do gênero.

Aos capítulos, segue uma discussão geral, onde serão ressaltados alguns resultados, descritas dificuldades intrínsecas ao projeto e discutidos pontos que não foram abordados nos artigos. A intenção dessa seção é mostrar de forma unificada o trabalho e revelar alguns detalhes da rotina laboratorial que normalmente não são oportunos em publicações científicas.

No Apêndice I, estão apresentados os resultados de uma breve análise de duas populações naturais de *D. mediopunctata* avaliadas com alguns dos locos desenvolvidos.

O Apêndice II, onde estão incluídas imagens de algumas etapas do doutorado, tem como objetivo ilustrar a qualidade dos experimentos além de, é claro, transparecer um pouco do dia-a-dia de aprendizado e geração de dados.

É nossa expectativa que a estrutura deste trabalho proporcione ao leitor uma visão cronológica das motivações de cada etapa do projeto. Ao mesmo tempo, desejamos que o leitor seja provocado a imaginar os próximos passos na investigação de *D. mediopunctata* e também como esta espécie pode continuar auxiliando no estudo da Genética.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os avanços que têm sido feitos em estudos genéticos são, em grande parte, devidos à possibilidade de análise de praticamente todos os organismos por meio de técnicas da biologia molecular. Todavia, o uso de modelos experimentais para estudos de genética e evolução ainda hoje é uma opção muito utilizada no entendimento mais sistematizado de padrões biológicos. As moscas do gênero *Drosophila* figuram no cenário dos estudos de genética, de evolução e do desenvolvimento há várias décadas e, desde então, contribuem de maneira decisiva para o progresso dessas áreas.

Drosophila mediopunctata é uma espécie de distribuição neotropical que possui ampla distribuição ao longo do território brasileiro. A identificação dessa espécie é relativamente fácil se comparada a outras de seu grupo, e algumas de suas características biológicas tornam-na um interessante modelo para estudos genético-evolutivos. No Brasil, encontram-se grupos de pesquisa que se dedicam a diferentes aspectos da história natural de *D. mediopunctata*. No entanto, a maioria dos estudos realizados utilizou apenas avaliações morfológicas e citológicas, uma vez que uma ferramenta molecular que possa auxiliar na relação entre dados fenotípicos e suas bases moleculares ainda não estava disponível.

Atualmente, o uso de marcadores moleculares é uma estratégia interessante pois permite o rastreamento indireto de regiões genômicas que possam, por exemplo, controlar diferentes fenótipos ou que sejam indicativas da dinâmica populacional. Os microssatélites são utilizados em larga escala para estudos em diversas espécies de *Drosophila*. Entretanto, para aquelas que ainda não possuem genoma seqüenciado, o uso de microssatélites passa pela necessidade de desenvolvimento: o isolamento e a caracterização de locos marcadores.

Em adição ao uso livre dos marcadores, o conhecimento de suas posições relativas no genoma amplia o seu alcance como ferramenta molecular e representa a etapa seguinte ao desenvolvimento. Esse tipo de informação é obtido por meio da construção de mapas genéticos, método consagrado de investigar o genoma de forma direcionada. Conseqüentemente, a obtenção de mapas de recombinação entre marcadores moleculares

gera um cenário onde é possível usar tais marcadores como referenciais para reconhecer regiões de interesse.

O desenvolvimento de microssatélites e a construção de um mapa genético para *D. mediopunctata* possibilitará o aprofundamento das análises em vigor, proporcionará a integração de dados moleculares aos já existentes e permitirá a utilização de novas abordagens usando essa espécie como modelo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Drosophila mediopunctata – espécie modelo

Buscar na natureza organismos que revelam padrões comportamentais, fisiológicos, fenotípicos, genéticos, etc é característico da Biologia. É uma estratégia para inferir a unidade entre as mais diversas espécies e estudar as peculiaridades que a evolução conferiu a cada uma delas. Alguns organismos, pela facilidade de manipulação ou pela capacidade de exibirem um fenômeno biológico com mais nitidez, revelaram-se excelentes modelos para estudos nos diferentes campos da Biologia.

As moscas do gênero *Drosophila*, principalmente *Drosophila melanogaster*, desde o início do século XX, são utilizadas em trabalhos de genética de eucariotos. Participaram da segunda revolução dessa área com o estabelecimento dos estudos de herança ligada ao sexo e ligação gênica (p. ex. Morgan 1910; Morgan e Lynch 1912; Sturtevant 1913) e com trabalhos que endossaram a então recém apresentada teoria cromossômica da herança (principalmente Bridges 1916). A percepção de que vários genes de *Drosophila* possuíam homólogos em mamíferos com funções parecidas nos dois sistemas potencializou o uso dessa mosca como modelo para estudos genéticos. O gênero *Drosophila* é utilizado em trabalhos de diversas ordens e outras espécies além de *D. melanogaster* também se tornaram alvos de pesquisa. Atualmente, estima-se que existam cerca de 1100 espécies no gênero *Drosophila* (Bächli 2007) e trabalhos com várias dessas espécies contribuem continuamente para o conhecimento da evolução desse táxon.

Uma espécie de expressão no Brasil é *D. mediopunctata* (Dobzhansky e Pavan 1943). Tem como perfil biológico (1) o fato de ser uma espécie exclusiva de mata, (2) o padrão de coloração abdominal com possibilidade de pintas centrais nos três últimos tergitos, (3) o ciclo de vida - aproximadamente 25 dias, dependendo da temperatura – e a maturação mais estendidos, (4) a fecundidade mais baixa - estas três últimas características colocadas em comparação a *D. melanogaster* - e (5) o fato de estar adaptada a temperaturas mais baixas (Klaczko 1995). Possui distribuição neotropical e foi encontrada em matas nas Américas do Sul e Central (Sene et al. 1980; Val et al. 1981). Pertence ao grupo *tripunctata* (Frota-Pessoa

1954), que compreende mais de setenta espécies (Bächli 2007), é o mais numeroso do gênero no Brasil (Gottschalk *et al.* 2008) e a partir do qual se acredita que tenham divergido outros grupos (Trockmorton 1975). Em algumas localidades, principalmente no Sul e durante o inverno, *D. mediopunctata* pode ser a mais comum entre as espécies coletadas (Saavedra *et al.* 1995); no entanto, é muito rara nas regiões mais quentes e secas (Tidon-Sklorz *et al.* 1994; Tidon-Sklorz e Sene 1995). A espécie tem $2n=12$ cromossomos, com cinco pares de acrocêntricos e um par de pontuais (Kastritsis 1966).

Alguns laboratórios nacionais estão desenvolvendo trabalhos com *D. mediopunctata*. São interesses principais a busca por evidências de seleção natural, por meio de análise da variação morfológica natural, e a investigação da influência de inversões cromossômicas no processo evolutivo.

A morfometria da asa, usada como medida indireta de tamanho e forma, foi utilizada em alguns estudos. Bitner-Mathé *et al.* (1995) identificaram variação no tamanho e na forma da asa e a correlacionaram com coletas feitas em diferentes épocas. Em adição, foram observados cline altitudinal associado à variação na forma e influência do cariótipo de inversões nas duas medidas. Posteriormente, a herdabilidade desses caracteres foi estimada e mostrou alto valor apenas para forma, o que indicou que os processos genéticos responsáveis pela forma da asa podem ser diferentes daqueles que controlam o seu tamanho (Bitner-Mathé e Klaczko 1999a; Bitner-Mathé e Klaczko 1999b). A importância da temperatura (e sua associação com determinadas inversões) no padrão de variação natural também foi detectada e a interação genótipo-ambiente para forma e tamanho da asa passou a ser considerada (Hatadani e Klaczko 2008). A plasticidade fenotípica do edeago (genitália masculina) também foi usada como modo de estimar a variação natural. Andrade *et al.* (2005) detectaram correlação entre temperatura e tamanho do edeago e variação comparável àquela vista para outros caracteres de *Drosophila*. Posteriormente, mostrou-se correlação positiva entre tamanho da asa e do edeago (Andrade *et al.* 2009), informações que corroboram as hipóteses da pleiotropia e da seleção sexual para evolução da genitália masculina.

Outra característica interessante de *D. mediopunctata* é a presença de polimorfismo de cor no abdômen. Nessa espécie, podem existir manchas escuras nos tergitos 4, 5 e 6,

sendo que há moscas sem manchas e moscas com uma, duas ou três manchas. As manchas podem ainda variar em tamanho, intensidade e forma, o que indica variação quantitativa para esse caráter. Rocha *et al.* (2008) observou a variação no número de pintas em resposta a diferentes temperaturas e mostrou que a norma de reação para esse caráter é dependente do valor fenotípico médio, ao contrário do que é normalmente postulado. Em outra abordagem, com análise genética no nível cromossômico, foi demonstrada a importância das inversões cromossômicas no fenótipo número de pintas (Hatadani *et al.* 2004). Os autossomos II e V afetam significativamente o caráter, porém o cromossomo II, onde estão concentradas as inversões, tem influência preponderante, o que sugere que nele se localize um gene principal ou vários genes que podem estar co-segregando devido às inversões. A existência de um mapa de ligação com marcadores moleculares ampliaria as possibilidades de estudo desse caráter. Seria possível investigar de forma mais minuciosa as regiões que podem conter genes associados ao caráter bem como testar se a influência do segundo cromossomo é devida a um gene principal ou a um número maior de genes que estariam agindo de forma conjunta.

Com relação às inversões cromossômicas, o polimorfismo previamente detectado por Kastritsis (1966) foi mais bem explorado em um novo mapa de politênicos para *D. mediopunctata* (Ananina *et al.* 2002). Os cromossomos II, IV e o sexual exibem inversões. O cromossomo II é o mais polimórfico: na região distal ocorrem principalmente oito inversões e na região proximal, nove. Essas duas regiões não se sobrepõem e, em princípio, qualquer combinação entre inversões distais e proximais - haplótipos - pode ocorrer. Porém, há um forte desequilíbrio de ligação entre os dois grupos de inversões: em uma grande amostragem feita por Peixoto e Klaczko (1991), das 81 combinações possíveis, só 31 foram encontradas. Também foi detectada a existência de cline altitudinal e oscilação temporal cíclica nas frequências de inversões, condições compatíveis com uma resposta adaptativa às alterações de temperatura no campo (Ananina *et al.* 2004). Entretanto, um estudo mais recente não confirmou o cline altitudinal visto no trabalho anterior, com frequências de inversões diferentes das esperadas (Batista 2010). O autor argumenta sobre a possibilidade de mudanças climáticas estarem remodelando a estrutura genética da espécie. Este trabalho mostra também a associação entre a frequência das inversões e regiões

geomorfológicas na região de Campinas, dados mais uma vez indicativos de possível adaptação local.

Investigação sobre elementos transponíveis também foi conduzida em *D. mediopunctata*. Uma sequência homóloga ao elemento *P* foi originalmente descrita na espécie (Loreto *et al.* 1998) e, posteriormente, verificou-se que essa sequência era o elemento *P* canônico de *D. melanogaster* (Loreto *et al.* 2001). Os autores acreditam que este seja um exemplo de transferência horizontal, dada a distância filogenética entre as duas espécies.

Importante em estudos de abordagem comparativa, o conhecimento da homologia entre os cromossomos das diferentes espécies, em *Drosophila*, é feito a partir da identificação dos elementos de Müller. Brianti (2009) identificou estes elementos em *D. mediopunctata* por meio da hibridização *in situ* de genes de *D. melanogaster* em cópia única.

A ampla distribuição de *D. mediopunctata* pelo Brasil e os inúmeros trabalhos que disponibilizam dados e revelam diferentes características dessa espécie tornam-na uma candidata potencial a modelo dentro do grupo *tripunctata*. Aliado aos resultados disponíveis, o uso de marcadores moleculares ampliaria o número de abordagens que podem ser utilizadas na investigação da espécie e contribuiria de maneira decisiva para o estabelecimento de *D. mediopunctata* como modelo genético.

Marcadores microssatélites – ferramentas moleculares no estudo de *Drosophila*

Os marcadores moleculares são sequências de DNA dispersas no genoma e que podem atuar como sinalizadores na busca por regiões genômicas de interesse. São variantes alélicas que permitem a identificação de indivíduos no nível molecular e assim representam uma forma indireta de avaliar e comparar genótipos. Os microssatélites (Litt e Luty 1989; Tautz 1989; Weber e May 1989) são marcadores conhecidos desde o final da década de 1980 e mostram diversas vantagens. Também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*), são seqüências de 2 a 6 pares de bases, repetidas em *tandem* no genoma, flanqueadas por regiões conservadas e que revelam polimorfismo a partir da variação no número de repetições de seus motivos. Apresentam como características

principais (1) a herança mendeliana do tipo codominante, (2) a alta reprodutibilidade via reações em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), (3) a abundância e (4) o multialelismo. Apesar da necessidade de conhecimento prévio de seqüências genômicas, após o desenvolvimento de *primers*, o uso desse tipo de marcador genético é o mais simples entre todos conhecidos. Com base apenas em reações de PCR e eletroforese dos produtos de amplificação, é possível realizar genotipagem em larga escala de forma rápida e fácil.

O uso de microssatélites com os objetivos de avaliar a diversidade, inferir taxas de mutação, estudar estruturas de populações ou identificar regiões associadas a características de interesse é uma constante para vários organismos e, no que concerne ao gênero *Drosophila*, constata-se que esse também tem sido um dos marcadores de escolha. Na literatura, encontram-se vários trabalhos que visaram o desenvolvimento de microssatélites e a compreensão de suas propriedades como ferramenta para investigar a Genética de *Drosophila*. Devido ao grande sucesso como modelo biológico e à disponibilidade do genoma completamente seqüenciado, *D. melanogaster* lidera o número de estudos apresentados, com diversos marcadores disponíveis e grande avanço no conhecimento da dinâmica desses locos. Todavia, microssatélites também têm sido obtidos para outras espécies do gênero, permitem comparações entre elas e continuamente confirmam a capacidade desse marcador de revelar características do genoma e da biologia dessas espécies.

a. Desenvolvimento

A disponibilidade de enorme número de seqüências de DNA de *D. melanogaster* criou um cenário favorável para que essa mosca fosse uma das primeiras a usar marcadores moleculares como auxiliares na interpretação da variação biológica. A segunda metade da década de 1990 inaugurou uma fase de grande produção científica na área com os trabalhos de Goldstein e Clark (1995), England *et al.* (1996), Michalakis e Veuille (1996), Schlötterer *et al.* (1997), Schlötterer *et al.* (1998), Schug *et al.* (1997), Schug *et al.* (1998a) Schug *et al.* (1998b). Estes autores desenvolveram os primeiros locos microssatélites para

D. melanogaster e iniciaram o estudo das características destes fragmentos do genoma. Na identificação dos microssatélites, foram usadas as estratégias de bibliotecas genômicas e de busca nos bancos de dados de sequências.

Além de *D. melanogaster*, foi relatado o uso de microssatélites em 21 outras espécies do gênero: *D. antonietae* (Machado *et al.* 2003), *D. birchii* (Magiafoglou *et al.* 2002), *D. buzzatii* (Frydenberg *et al.* 2002), *D. dunni* (Wilder *et al.* 2002), *D. gouveai* (Moraes e Sene 2007), *D. hydei* (Peters *et al.* 2009), *D. innubila* (Unckless *et al.* 2008), *D. lummei* (Schlötterer e Harr 2000), *D. mauritiana* (Moehring *et al.* 2004), *D. mojavensis* (Staten *et al.* 2004), *D. montana* (Orsini e Schlötterer 2004), *D. neotestacea* (Dyer 2007), *D. nigrodunni* (Wilder *et al.* 2002), *D. pseudoobscura* / *D. persimilis* (Noor *et al.* 2000), *D. sechellia* (Colson *et al.* 1999), *D. serrata* (Magiafoglou *et al.* 2002), *D. simulans* (Hutter *et al.* 1998; Colson *et al.* 1999), *D. subobscura* (Pascual *et al.* 2000), *D. teissieri* (Cobb *et al.* 2000) e *D. virilis* (Schlötterer e Harr 2000; Huttunen e Schlötterer 2002). A maioria teve marcadores desenvolvidos de forma específica, via bibliotecas genômicas ou consulta a banco de dados de sequências da própria espécie. Entretanto, algumas usaram de forma heteróloga marcadores previamente identificados e/ou estabelecidos para outra espécie. As espécies que não foram alvo principal dos trabalhos de desenvolvimento, tendo sido usadas apenas para efeitos de amplificação heteróloga, não foram aqui mencionadas. Ross *et al.* (2003) identificou vários microssatélites em cinco espécies (*D. arizonae*, *D. mojavensis*, *D. neotestacea* e *D. pachea* e *D. recens*), porém não desenvolveu *primers* para tais marcadores.

b. Propriedades

A identificação destes locos marcadores possibilitou um novo ângulo de estudo da evolução do genoma. Taxas de mutação, estimativas da variabilidade alélica, correlações entre tamanho da região repetitiva e polimorfismo revelaram novas informações sobre a sua dinâmica. Na investigação dessas regiões, foi possível também acumular dados que mostraram peculiaridades em *Drosophila*. Para exemplificar isto, a seguir estão trabalhos que contribuíram para o entendimento do genoma de *Drosophila* por meio do conhecimento das propriedades e da evolução dos locos microssatélites. Devido ao grande

número de trabalhos existentes, apenas aqueles que usaram *D. melanogaster* como modelo serão apresentados.

Schug *et al.* (1998a) foram os primeiros a apresentarem um estudo amplo sobre a composição dos microssatélites em *D. melanogaster*. Dinucleotídeos são mais freqüentes que tri- e tetranucleotídeos (66%, 30% e 4%, respectivamente) e o motivo AC/GT é o mais comum (49%), seguido por AT/TA (33%) e AG/CT (16%). Em adição, compreensão sobre a evolução dos microssatélites tornou-se uma preocupação central à medida que esse marcador foi eleito um importante instrumento na investigação molecular de populações experimentais e naturais. O cálculo da taxa de mutação desses locos foi então estimado ($\sim 10^{-6}$) e revelou-se duas ordens de magnitude menor do que as taxas estimadas para outras espécies (Schug *et al.* 1997; Schlötterer *et al.* 1998; Schug *et al.* 1998b; Schug *et al.* 1998c). Foi detectada diferença entre as taxas de mutação para diferentes motivos: a taxa para os dinucleotídeos é 6,4 vezes maior que a dos trinucleotídeos e 8,4 vezes maior que a dos tetranucleotídeos (Schug *et al.* 1998c). Mutação diferencial entre os dinucleotídeos também foi reportada. Repetições do tipo AC/GT são mais mutáveis que as do tipo AG/CT e AT/AT (Bachtrog *et al.* 2000). A distribuição dos microssatélites, ao contrário do que se acreditava, não é randômica e existe grande heterogeneidade na densidade desses marcadores ao longo do genoma. Foi detectada maior densidade de dinucleotídeos no cromossomo sexual, porém associações com taxa de recombinação, número de exons, ou composição de bases de diferentes regiões genômicas não foram encontradas (Bachtrog *et al.* 1999). Com relação às regiões flanqueadoras, observou-se a existência de mutações, que podem se confundir àquela gerada pela região repetitiva propriamente dita. Esta condição impõe cuidado no uso da variabilidade exposta por microssatélites uma vez que eles não estão evoluindo unicamente via mutação passo-a-passo (*stepwise mutation*) (Colson e Goldstein 1999; Bachmann *et al.* 2004). O tamanho dos microssatélites em *Drosophila* é comprovadamente menor que os vistos para muitas espécies, possivelmente pela já mencionada baixa taxa de mutação (Schug *et al.* 1998a; Kruglyak *et al.* 1998). Enquanto raramente são encontrados dinucleotídeos maiores que 25 repetições em *Drosophila*, essa pode ser a média em alguns outros animais (Schug *et al.* 1998a). A análise de microssatélites de grande extensão revelou um viés de mutação, que controlaria o

aumento no número de repetições nesses locos e proporcionaria uma pequena duração de microsatélites longos na população (Schlötterer et al. 1998; Harr e Schlötterer 2000). Em contraponto a essa pressão para diminuição do número de repetições, foi reportada ação purificadora sobre microsatélites imperfeitos (Harr et al. 2000). Interrupções em locos com fragmentos repetitivos seriam eliminados via *slippage*, o que atuaria em favor do aumento dos arranjos. Em adição, existe controvérsia sobre os fatores determinantes da variabilidade nos locos microsatélites. Goldstein e Clark (1995), Harr e Schlötterer (2000) e Bachmann et al. (2004) reportaram correlação positiva entre tamanho do microsatélite e sua variação. Entretanto, os resultados de Harr et al. (1998a) não encontraram correlação significativa. Este último trabalho argumenta sobre a existência de efeitos loco-específicos, um cenário onde diferentes microsatélites podem apresentar diferentes taxas de mutação e variabilidade; o tamanho não seria um fator principal na dinâmica evolutiva desses locos. De fato, a evolução do microsatélites é complexa também devido às características extrínsecas a essas regiões. Schlötterer et al. (1997), por exemplo, demonstrou que a redução na variabilidade de microsatélites pode ser ocasionada pelo “efeito carona” (*hitchhiking effect*) com regiões portadoras de genes sobre grande pressão de seleção. Em avaliações interespecíficas, como uso heterólogo de marcadores, é observada redução nas taxas de variabilidade, com redução na heterozigosidade, no número de alelos e no número de repetições na espécie para qual o microsatélite não foi desenvolvido. Hutter et al. (1998) sugeriram que este padrão não tem perfil biológico e é causado por um viés de amostragem (*ascertainment bias*), geralmente imposto pela seleção de microsatélites mais longos nas bibliotecas genômicas. Todavia, mais tarde, foi demonstrado que, pelo menos no caso de *D. melanogaster* e *D. simulans*, as incongruências observadas com o uso de microsatélites heterólogos podem também estar associadas à evolução direcional e representarem diferenças reais entre as espécies (Amos et al. 2003).

***Drosophila*, microsatélites e mapeamento genético**

A distribuição e a manutenção da variação genética nas espécies e as formas pelas quais a seleção natural atua moldando essa variabilidade sempre foram questões centrais

dentro da Biologia. A enorme variação morfológica vista entre os indivíduos é fruto da mistura de diversas características que possuem distribuição contínua nas populações e que são a matéria prima para a seleção natural. Por isso, há muito se tornou interessante o estudo da genética quantitativa. Pesquisadores utilizam inúmeras características complexas na tentativa de detectar os mecanismos evolutivos que modelam a distribuição da variação genética e a divergência entre as espécies.

As moscas do gênero *Drosophila* são um modelo experimental não só no que concerne à biologia do desenvolvimento e à evolução. A utilização desse organismo na área da genética quantitativa também é marcante na literatura e diversos caracteres complexos são alvo de interesse. Um dos mais relevantes é o número de cerdas abdominais em *Drosophila melanogaster* (revisão em Mackay 1995, Dilda e Mackay 2002), um modelo experimental nessa área. O estudo desse caráter corroborou, por exemplo, informações de que a variação contínua nos seres pode ser fruto do efeito de poucos genes, ao contrário do que Fisher (1918) havia proposto: a existência de vários locos com pequena influência sobre o fenótipo.

O início do uso de marcadores moleculares acelerou a busca por regiões genômicas de interesse por meio da construção de mapas genético-moleculares e posterior mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ou pelo mapeamento por “efeito carona”. A seguir estão apresentados estudos que utilizaram microssatélites como ferramenta para alcançar esses objetivos no gênero *Drosophila*. Os trabalhos estão dispostos por espécie e por ordem cronológica.

D. melanogaster

A estratégia de mapeamento de mutações adaptativas por “efeito carona” foi empregada por Harr *et al.* (2002). Após a detecção de baixa na variabilidade genética em alguns locos microssatélites em populações não-africanas de *D. melanogaster* (em contraponto às coletadas na África, local de origem da espécie), iniciou-se inspeção das regiões flangeadoras por mutações que estivessem associadas à expansão de habitat. Foram identificadas três regiões e, em um delas, por meio de análise de sequência, encontrou-se uma mutação de efeito benéfico.

Gockel *et al.* (2002) trabalharam com o caráter tamanho corporal em função do tamanho da asa em *D. melanogaster*. Informações anteriores ao estudo mostravam a existência de clines latitudinais em diversos continentes para essa espécie, o que sugeria a ação de seleção sobre as populações (Gockel *et al.* 2001). Assim, os pesquisadores objetivaram descobrir quais regiões genômicas estariam associadas a esse caráter e que poderiam ser fonte de variação adaptativa. Com base em um mapa constituído com quarenta microssatélites, foi possível identificar dois QTLs em dois cromossomos diferentes e verificar associação entre locos que, em um estudo anterior, haviam mostrado distribuição ao longo do cline. Apesar de cuidadosos com as generalizações, os autores sugeriram que essa seria uma boa maneira de mapear QTLs: a identificação de locos marcadores que estivessem respeitando a variação clinal indicaria regiões afetando o caráter tamanho corporal devido ao desequilíbrio de ligação.

O caráter longevidade foi estudado por Forbes *et al.* (2004) e apresentou uma análise diferenciada. Os autores almejavam não somente localizar regiões de interesse como também ter indícios sobre os mecanismos que moldam a variação genética. Para isso, foram usadas três populações de mapeamento diferentes, originadas por pares de linhagens formadas a partir de indivíduos de populações abertas. A identificação de poucos QTLs indicaria a existência de algum tipo de seleção balanceadora e os mesmos locos seriam encontrados nas três populações. A outra possibilidade seria a identificação de vários QTLs, que não seriam consistentes entre os cruzamentos e sugeririam que a fonte de variação seria o acúmulo de mutações. Os resultados mostraram que os dez QTLs identificados suportavam ambas as hipóteses, haja vista que alguns foram detectados em mais de uma população e outros em apenas uma. Em adição, foi visto que nove dos dez QTLs apresentavam efeito de dominância em direção de tempo de vida mais longo.

A influência da alta temperatura nas atividades de *D. melanogaster* foi investigada com o objetivo de localizar regiões que estejam comandando a adaptação da espécie (Norry *et al.* 2004). Com apenas dezoito microssatélites autossômicos, localizaram-se quatro QTLs. No cromossomo 2, foi detectada a ação aditiva de genes e no cromossomo 3, onde sabidamente estão genes HSP (*Heat Shock Proteins*), foram localizados três QTLs de grande importância, com ação de dominância. Posteriormente, Norry *et al.* (2007)

mapearam o cromossomo sexual com nove marcadores e encontraram mais um QTL de grande efeito. Os resultados confirmaram a existência de regiões que afetam a capacidade de adaptação à temperatura em todos os três maiores cromossomos da espécie.

QTLs associados à letalidade condicional também em resposta à temperatura foram estudados com a intenção de explorar regiões ligadas à depressão por endogamia em *D. melanogaster* (Vermeulen *et al.* 2008a; Vermeulen *et al.* 2008b). A partir de linhagens endocruzadas e com denotada sensibilidade à temperatura, foram obtidos resultados diferentes de acordo com a condição ambiental imposta (frio ou calor), testadas cada uma em um trabalho. O primeiro identificou dois QTLs associados à mortalidade dos machos e apenas um deles mostrou interferência na mortalidade das fêmeas. No segundo, apenas uma região no cromossomo 2 associada à mortalidade nos machos foi detectada.

D. montana

Os sons emitidos durante o processo de corte foram mapeados em *D. montana* (Schäfer *et al.* 2010). Após a construção de um mapa genético para a espécie, foram detectadas taxas de recombinação diferenciais ao longo dos cromossomos. Foram detectados dois QTLs de maior importância, um no cromossomo sexual e outro no cromossomo 2, cuja região se localiza em uma inversão cromossômica. Os resultados corroboram expectativas sobre as características associadas à especiação estarem posicionadas em regiões de baixa recombinação.

D. pseudoobscura, *D. persimilis*

Williams *et al.* (2001) também explorou o som de corte, agora em híbridos de *D. pseudoobscura* e *D. persimilis*. Características do som estão ligadas ao reconhecimento de indivíduos da mesma espécie e, portanto, se aproximam do limiar da separação entre duas ou mais espécies. Um mapa de recombinação com apenas quatorze microssatélites revelou padrão oligogênico para a variação do som, com três QTLs detectados nos autossomos.

D. simulans, *D. sechellia*, *D. mauritiana*

A grande proximidade filogenética entre *D. sechellia* e *D. simulans* proporciona um cenário biológico onde podem ser estudadas características associadas à especiação via barreiras reprodutivas. Macdonald e Goldstein (1999) investigaram a morfologia sexual dos machos e identificaram vários QTLs. As regiões revelaram indícios de seleção direcional

apenas para algumas partes da morfologia sexual, o que indicou que nem todas as estruturas associadas ao comportamento sexual estão envolvidas no processo de especiação.

O processo de corte, o qual pode representar um mecanismo pré-zigótico de isolamento reprodutivo, foi avaliado por Moehring *et al.* (2004) em três grandes populações de retrocruzamento entre as espécies *D. simulans* e *D. mauritiana*. Sete QTLs de efeito moderado a grande foram identificados após a construção de um mapa interespecífico com 53 microssatélites. Observou-se que existe significativa diferença entre os QTLs de machos e fêmeas e a preponderância do cromossomo sexual não é tão alta como esperado, pois locos de efeito maior foram detectados nos autossomos. A diferença observada entre machos e fêmeas revela um interessante aspecto: a base genética da escolha dos machos pelas fêmeas provavelmente não é a mesma que guia as características do macho que são usadas para a discriminação.

Gleason e Ritchie (2004), também com um cruzamento interespecífico entre *D. sechellia* e *D. simulans*, procuraram QTLs ligados ao som de corte. O interesse central era saber se as regiões que regulam essa característica nos híbridos correspondiam àquelas previamente reportadas para cruzamentos interespecíficos. Foram encontrados seis QTLs nos autossomos, nenhum de grande efeito, o que sugeriu a atuação de alguns locos de menor impacto na característica. Não foi observada ação direcional de seleção. Em adição, as regiões identificadas não correspondem às relatadas pra *D. melanogaster* e, assim, evidenciou-se a possibilidade de os locos que determinam as propriedades do som da corte dentro da espécie serem diferentes daqueles que controlam essa característica em híbridos.

A variação no número de ovariolos foi mapeada em uma população interespecífica de *D. sechellia* e *D. simulans* como forma de investigar características relacionadas ao *fitness* em *Drosophila* (Orgogozo *et al.* 2006). Dois QTLs, um com grande efeito no cromossomo 3 e um de menor efeito no cromossomo 2, foram identificados. Para refinar a localização do QTL de maior importância, os autores utilizaram a fenotipagem seletiva, onde apenas dados de recombinantes na região do QTL são incorporados à análise. Esta estratégia

aumentou a resolução do mapeamento e o QTL originalmente detectado foi separado em outros dois, que exibiram perfil epistático.

D. virilis

Huttunen *et al.* (2004) também avaliaram o som de corte em machos, porém em *D. virilis*. Após a construção de um mapa de ligação com 26 microssatélites, identificaram-se doze QTLs, nove deles localizados no cromossomo 3, com predominância dos efeitos de aditividade. Como visto em outros estudos, os autores argumentam sobre a existência de herança poligênica para as características que compõem o som de corte e sobre a discordância entre os locos que controlam o som de maneira intraespecífica e aqueles que regem as diferenças entre as espécies.

Apesar de muitos trabalhos que buscam interpretar a modulação da variação fenotípica em *Drosophila* disporem de outras ferramentas, nota-se que os marcadores microssatélites podem ser empregados de maneira eficaz nos estudos de mapeamento de características complexas. A literatura mostra o recente aumento da adoção dessa técnica e evidencia a importância de sua aplicação no refinamento dos conhecimentos sobre a genética quantitativa de *Drosophila*.

***Drosophila melanogaster* – seqüenciamento do genoma referência**

Esse tópico tem dupla intenção. A primeira é relatar de forma resumida a idéia e a execução de um projeto que, mesmo de forma indireta, proporcionou e ampliou as conclusões que essa tese pretende abordar. A segunda é prestar uma homenagem a um organismo com que a autora deste manuscrito se divertiu trabalhando no decorrer dos últimos anos.

Há quase cem anos atrás, quando Thomas H. Morgan descobria o mutante *white* de *D. melanogaster* e dava início a uma nova era dentro da Genética, certamente não se vislumbrava o quantidade de recursos metodológicos que fariam dessa espécie uma das mais estudadas no mundo. Desde então, a evolução das estratégias experimentais vem acontecendo e proporcionam para as mais diversas espécies novas possibilidades de

estudo e compreensão de suas biológicas. Entretanto, para *Drosophila*, isso parece ter ido muito além.

Em menos de um século de pesquisa, o gênero *Drosophila* passou do anonimato científico a doze genomas de diferentes espécies completamente seqüenciados. *D. melanogaster* consolidou-se como um organismo modelo diferenciado e sua visibilidade trouxe privilégios. Quando se questionava qual seria a melhor forma pra seqüenciar o genoma humano, optou-se por *D. melanogaster* para fazer um projeto piloto. Precisava-se saber se seria possível seqüenciar um genoma eucarioto de maior dimensão e, entre o grande número de espécies disponíveis com essa característica, o de *D. melanogaster* foi escolhido. E é interessante ver como uma espécie pode se beneficiar indiretamente do fato de ser um modelo para estudos em humanos.

Com a cooperação entre financiamento público e privado, foi concluído em apenas um ano o seqüenciamento do genoma eucromático de *D. melanogaster*. Estiveram envolvidos laboratórios americanos, canadenses e europeus, além do Grupo Celera Genomics.

A princípio, foi construída uma biblioteca de BACs (*Bacteria Artificial Chromosomes*) a partir da qual foi feito um mapa físico da espécie (Hoskins *et al.* 2000). Por se tratar de um organismo alvo dentro da Biologia, diversas opções metodológicas e uma quantidade considerável de informações estavam disponíveis e não foram negligenciadas. Por exemplo, mapas físicos então disponíveis, porém com baixa cobertura do genoma, foram usados para guiar a ordenação dos BACs. O mapa obtido com o conhecido elemento P1 (Kimmerly *et al.* 1996) foi usado como ponto de partida, de onde marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) foram gerados para hibridizar a biblioteca de BACs. Hibridizações *in situ* em cromossomos politênicos também auxiliaram a organização dos clones. Segundo os autores, a confecção de um mapa físico baseado em BACs teve três grandes papéis: gerar uma evidência independente sobre o tamanho do genoma, disponibilizar seqüências com cobertura de 1x, e possibilitar o fechamento de *gaps* na fase final do seqüenciamento por meio da determinação do *tiling path* (conjunto de BACs que contém toda a extensão do cromossomo com a menor quantidade de sobreposição).

Com relação ao seqüenciamento propriamente dito, a estratégia principal foi a *whole-genome shotgun* (Venter *et al.* 1998), em que o todo genoma é partido em fragmentos pequenos e clonado em vetores comuns. A aprovação dessa metodologia para uso no genoma humano era o objetivo central da empreitada. Dos 180 Mb que constituem o genoma de *D. melanogaster*, 120 Mb foram seqüenciados, com cobertura de pelo menos 6,5x e 13.600 genes foram identificados (Adams *et al.* 2000). A porção de euromatina é composta por dois autossomos principais, um autossomo de proporções reduzidas e o cromossomo sexual. A porção heterocromática corresponde à cromatina centromérica. Esta não é clonada de forma estável e portanto não foi bem representada nas bibliotecas genômicas. Três tipos de bibliotecas genômicas foram construídas: com 2, 10 e 130 kb, para poder incluir regiões de seqüências repetitivas. As duas extremidades de cada clone foram seqüenciadas para possibilitar a montagem correta de todas as seqüências. A anotação dos genes incluiu o uso de softwares de predição, dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) e anotação manual. Os 13.600 genes identificados codificam mais de 14.000 transcritos o que indica, portanto, *splicing* alternativo em alguns genes. A densidade gênica observada é de um gene a cada 9 kb, com variação de zero a trinta genes por cada 50 kb. Mais de 56.000 exons foram preditos, com média de quatro por gene. Na classificação funcional feita pelo *Gene Ontology*, cerca de 7.000 transcritos foram classificados em quarenta categorias funcionais e cerca de 4.000 em 47 processos principais. Foram identificadas proteínas com tamanhos variando de 21 a 5.000 aminoácidos.

A parte heterocromática, pouco explorada na primeira versão, foi mais bem avaliada com o anúncio da versão 3 (Celniker *et al.* 2002). Essa versão incluiu os mesmos dados gerados pela estratégia inicial, porém apresentou um novo alinhamento de seqüências. Essa nova montagem exibiu cerca de 20 Mb de heterocromatina que ainda não havia sido anotada (Hoskins *et al.* 2002). Cerca de trezentos genes codificadores, dos quais 10% já eram conhecidos, e seis genes não-codificadores foram preditos. Em adição, hibridizações *in situ* de cromossomos politênicos foram usadas para confirmar a localização dessas seqüências e mostraram que não existe divisão clara entre euromatina e heterocromatina nas imediações do centrômero.

Durante o ano em que a enorme quantidade de informação de seqüência de DNA foi produzida, também foram delineadas as estratégias de alinhamento e montagem que seriam necessárias para compilar toda a informação que estava sendo gerada. Na busca por recursos computacionais imprescindíveis para essa tarefa, promoveu-se uma gincana entre bioinformatas de todo o mundo com base em um pequeno trecho de DNA disponível na época (Abbott 1999). Algumas idéias interessantes surgiram e um primeiro esforço conjunto foi realizado. Para a avaliação de todo o conjunto de seqüências, o grupo da Celera Genomics desenvolveu um algoritmo de alinhamento específico, baseado no tipo de informações que seriam obtidas (Myers *et al.* 2000). E para validá-lo, foram usados três conjuntos independentes de dados para verificar se a mesma montagem era atingida. Apesar de mais de mil *gaps* terem permanecido, o algoritmo foi bem-sucedido no alinhamento de um genoma complexo e de dimensões consideráveis.

O seqüenciamento de *D. melanogaster*, desde a sua primeira versão, vem evoluindo tanto do ponto de vista de lapidação de arestas quanto com relação às novas oportunidades de estudos que promoveu. A imensa quantidade de informação gerada mais se assemelha a uma folha em branco se comparada às possibilidades experimentais que o seqüenciamento completo do genoma proporcionou. Há genes com homologia a genes humanos associados a doenças que possuem um grande apelo científico. E há outros milhares, cujas funções ainda não são conhecidas e que certamente ocuparão uma parcela da comunidade científica por um bom tempo. Para os drosofilistas, é duplamente agradável ver o sequenciamento do genoma de seu organismo predileto: a exposição da intimidade de um modelo irretocável para experimentação científica, que jamais poderá ser conduzida em humanos, e uma quantidade interminável de matéria-prima para a continuidade da pesquisa sobre um animal que revolucionou os conceitos que temos sobre a Biologia.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

GERAL

Estudar *Drosophila mediopunctata* com uma perspectiva genético-molecular e disponibilizar ferramentas moleculares que contribuam para a investigação da biologia da espécie e que permitam a ampliação do seu uso como organismo modelo

ESPECÍFICOS

Isolar e caracterizar marcadores moleculares microsatélites

Avaliar o alcance desses microsatélites como marcadores heterólogos

Construir um mapa de ligação que possa servir como referência inicial na exploração do genoma de *D. mediopunctata*

Mapear a característica “número de pintas abdominais”

CAPÍTULO I

**“*Drosophila mediopunctata* microsatellites I:
more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies”**

Prianda R. Laborda
Gustavo M. Mori
Anete P. de Souza

Conservation Genetics Resources (2009) 1: 297-307

Technical note

***Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies**

Prianda R. Laborda¹, Gustavo M. Mori¹ and Anete P. de Souza^{1,2*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) and Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, CEP 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

E-mail anete@unicamp.br

Phone 55-19-35211132

FAX 55-19-35211089

ABSTRACT

We describe the first 134 polymorphic microsatellites loci developed for the fly *Drosophila mediopunctata*. A genomic DNA library double-enriched for dinucleotides was constructed and approximately 600 unambiguous microsatellites were identified. The DNA library consisted of 60% positive clones, short-sized dinucleotides (mean = 8.7 repeats) and 73% of AC/GT combinations. A total of 177 primer pairs were designed and thirteen strains were used to achieve optimal PCR amplification conditions and allelic variability of the isolated loci. The average number of alleles per locus was 4.6 and means of observed and expected heterozygosities were 0.23 and 0.62, respectively. The discriminating power average was 0.72. These new developed markers will be applied in the study of natural population dynamics and for the construction of a molecular linkage map for the species.

KEYWORDS

Drosophila, molecular markers, enriched genomic library, microsatellites

Drosophila mediopunctata (Dobzhansky and Pavan 1943) is a Neotropical forest dwelling species that belongs to the *tripunctata* group, the second largest group of the genus *Drosophila* (Vilela 1992). It is widely distributed in South America and can be easily captured during the winter. Several approaches have been taken towards understanding the biology of *D. mediopunctata*. Morphological traits were used to characterize variation in natural populations (Bitner-Mathé et al. 1995; Andrade et al. 2009). The influence of temperature in phenotypic plasticity was also investigated (Andrade et al. 2005; Rocha et al. 2008; Hatadani and Klaczko 2008). The occurrence of sex-ratio was described (Carvalho et al. 1989) and the causes of its suppression were analyzed (e.g. Carvalho and Klaczko 1993). Polytene chromosome inversions were used to make the first genetic map for *D. mediopunctata* (Ananina et al. 2002) and to study temporal and geographical variation in natural populations (Ananina et al. 2004). These studies have shown successful investigations in diverse aspects of *D. mediopunctata*, but still no work has been reported on the development of molecular (microsatellite) markers. The development of such markers shall increase alternatives for exploring the genome of this species, providing novel tools for genetic studies.

In order to identify and characterize microsatellites for *D. mediopunctata*, an enriched genomic library was constructed as described in Billotte et al. (1999). Genomic DNA was isolated from 160 flies of the strain ITC229ET according to Azeredo-Espin et al. (1991). DNA samples (6 µg) were digested with *Rsa*I and ligated to the adapters 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and 5'-pTAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. DNA fragments containing putative markers were selected by (1) hybridization with (GT)₈ and (CT)₈ biotin-linked probes and (2) recovery with streptavidin-linked particles (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles). Selected fragments were then ligated to vectors that enable selection of recombinant colonies by the blue/white method (pGEM-T® Vector System) and transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue competent cells.

Sequencing reactions were carried out with the Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 and T7 and SP6 promoter primers. Electrophoreses were performed in an ABI PRISM® 377 Automated Sequencer. The Simple Sequence Repeat Identification Tool – SSRIT (Temnykh et al. 2001) was used to identify perfect microsatellites in the raw

sequences. Dinucleotides with seven or more repeats were considered, likewise trinucleotides with five or more repeats, tetranucleotides with four or more repeats and pentanucleotides with three or more repeats. Sequences containing markers were aligned, edited and removed, if redundant, in SeqMan (DNASTAR). The MICROSAT software (personal communication by A. M. Risterucci) was used to remove restriction sites of the sequences. Primer pairs were designed using PrimerSelect (DNASTAR) and Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000).

From the 1913 clones obtained in the *D. mediopunctata* microsatellite-enriched library, 797 were double-sequenced. More than 600 non-redundant microsatellites were identified in 480 clones. Since only dinucleotide probes were used for the enrichment, they accounted for 75% of the markers. Other motifs were also identified and consisted of 14% tri-, 4% tetra- and 7% pentanucleotides. The AC/GT combinations were the most frequent, representing 73% of all dinucleotides, as previously observed in *Drosophila melanogaster* (Katti et al. 2001) and other arthropoda genomes (Tóth et al. 2000). The number of dinucleotide repeats varied from 7 to 22, with average of 8.7, thus revealing short microsatellites for *D. mediopunctata*. If markers with less than seven repeats were considered, the mean would have been even lower. This result is in agreement with Shug et al. (1998), who reported that the AC/GT markers in insects are shorter than those found in other animals (e. g. mean_{rainbow trout} = 24 repeats, mean_{mouse} = 20 repeats, mean_{cow} = 16 repeats, and mean_{human} = 13 repeats).

After the characterization of the library, 177 primer pairs were developed, and the loci themselves started to be characterized. Thirteen *D. mediopunctata* strains were used for this analysis. Genomic DNA of 30 flies from each strain was isolated in bulk, also using a phenol-chloroform method. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in 25- μ L reactions with 2.5 ng of genomic DNA, 1x PCR buffer, 1.5 mM magnesium chloride, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1 U *Taq* DNA polymerase. All primer pairs were first evaluated in *touchdown PCR*. Thermocycler parameters were 94°C for 2 min; 2x [10 cycles of 94°C for 1 min, 65°C (-1°C/cycle) for 1 min and 72°C for 2 min]; 18 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min; and 72°C for 5 min. If needed, PCRs were performed in a gradient temperature from 45°C to 60°C in order to settle the exact annealing

temperature of the primer pair. In this situation, PCRs were carried out as follows: 94°C for 2 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, T_a for 1 min and 72°C for 2 min; and 72°C for 5 min. PCR products were all visualized in TBE 0.5x 3% agarose gels stained with bromide ethidium prior to vertical electrophoresis in TBE 1x 6% polyacrylamide gels. Staining procedures followed the method described by Creste et al. (2001). Statistical analyses were performed in R (Ihaka and Gentleman 1996), TFGA (Miller 1997) and GENEPOP on the Web (Raymond and Rousset 1995).

Out of the 177 primer pairs, we successfully genotyped 134 polymorphic microsatellites (Table 1). Another four loci were monomorphic. The mean number of alleles found among the thirteen strains was 4.6 (2 to 9). The lack of DNA amplification product for some of the strains in several loci (in Table 1, $n < 13$) indicates null alleles, since negative results were triple-checked (except for loci Dmed^{UNICAMP}_ssr046 and Dmed^{UNICAMP}_ssr074, which have one missing value each). Correlations between number of alleles and microsatellite size (i.e. number of repeats) were low but significant: $r_{\text{all microsatellites}} = 0.31$ ($P = 0.0002$) and $r_{\text{dinucleotides}} = 0.30$ ($P = 0.003$). In order to evaluate the genotypic status and the discriminating capability of each isolated loci, H_o , H_E (Nei 1978) and D (Tessier et al. 1999) were calculated, and mean values were 0.23 (0.00 to 0.85), 0.62 (0.17 to 0.90) and 0.72 (0.18 to 0.99), respectively. Genotypic distributions for 59 loci did not agree with the Hardy-Weinberg equilibrium proportions, probably due to many generations of inbreeding. Significant linkage disequilibrium was found among 37 pairs of loci after Bonferroni correction.

The microsatellite markers developed herein were suitable to produce a dendrogram of genetic distances (data not shown) that guided us in the selection of two strains to derive a F_2 population to be used in the construction of a genetic map. Moreover, these markers are being assayed in 30 other species of the genus *Drosophila*, and it will soon be possible to use them in species with no available microsatellite markers. Two natural populations are being studied both by means of chromosome inversions and microsatellites. This study may enable comparisons between these two types of markers and should provide interesting discussion, for example, on how natural selection may be guiding the evolution of *D. mediopunctata*. Disregarding the species with complete genome

sequence, *D. mediopunctata* now owns one of the largest sets of reported microsatellites in the *Drosophila* genus.

The availability of these markers provides new tools for the studying of this species. The construction of a molecular map is now “ready to go”, and will further the knowledge of the genome of the species and provide initial data for the localization of genes of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support by means of a graduate fellowship received by PRL (2004/03385-1), an undergraduate fellowship received by GMM (2006/61184-8) and a research grant awarded to APS (2004/03203-0). The authors also thank Louis Bernard Klaczko for providing the laboratory strains used in the characterization of the markers.

Table 1 The 134 isolated and characterized *Drosophila mediopunctata* microsatellites (AC – annealing conditions, TD₆₅₋₅₅ – touchdown PCR with temperatures ranging from 65°C to 55°C; n – number of genotyped samples; N_a – number of alleles; H_O – observed heterozygosity; H_E – Nei’s unbiased expected heterozygosity (Nei 1978); D – discriminating power, as described by Tessier et al. (1999); (*) indicates significant departure from the HWE expectations after Bonferroni correction (P < 0.00037)

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5´-3´)	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H _O	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr001	GQ344836	TTGCTTGTGGTATTTTCTGTC AATGGTGAGGTTTGTGTTTG	(TG) ₈	240	51°C	13	5	0.6154	0.8000	0.9359	0.0977
Dmed ^{UNICAMP} _ssr002	GQ344837	GCCTACGACTGAGCGACTTT GTGTTTTAGCCAGCCTTTG	(CT) ₁₁	175	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.2308	0.7477	0.8718	0.0003*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr003	GQ344838	CAAGGCATTGAGCAAAATCA TTCGGGGCTCTGTTCTCTTA	(AC) ₇	134	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.3077	0.6000	0.7949	0.0427
Dmed ^{UNICAMP} _ssr004	GQ344839	GGCTAGGCATTTTGCTTC TTTTAACCCTTTGTGTCA	(TTG) ₅ ...(TG) ₇	248	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.6154	0.6410	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr005	GQ344840	CACAAAGAAAGAGAACGAGACA GCAGGTTAGCAAGGTGAAAA	(AG) ₈	160	TD ₆₅₋₅₅	13	2	0.1538	0.4431	0.5897	0.0348
Dmed ^{UNICAMP} _ssr006	GQ344841	GTGTGTGGCCTGTCTCTGA CACTTTCGCAGTCTGTCTGG	(TAACG) ₃	189	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.1538	0.5200	0.6410	0.0005
Dmed ^{UNICAMP} _ssr007	GQ344842	CTATTGGGATATTGAGATTGAG CATAAAACATGGCATTAGG	(CA) ₉	151	TD ₆₅₋₅₅	13	9	0.3077	0.8400	0.9103	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr008	GQ344843	ATTCGGCCAGTGTATGAGTGA AGTCTTGCTTCCCTTTTG	(TC) ₁₂	175	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0769	0.6677	0.7051	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr009	GQ344844	CTTGCGTGCGTATGTATC ATGTGTAGTTGTTGGACCT	(TG) ₁₀	212	51°C	13	3	0.3077	0.3846	0.6026	0.5090
Dmed ^{UNICAMP} _ssr010	GQ344845	AAAGAAACAAGCAGAGACACAG CACGGGTAGAGATAGAAGACAA	(AG) ₈	173	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.2308	0.7969	0.8846	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr011	GQ344846	ACGGAGAAGTTAAATGAGAAAA CAACATCAACCAACAACA	(TC) ₉	199	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.2308	0.6769	0.7949	0.0005
Dmed ^{UNICAMP} _ssr012	GQ344847	TACATTATCTAGGAGCATTTTC TTCTGTCAAGTGAGTAGGTGT	(TTGAG) ₃	264	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.3938	0.4103	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr013	GQ344848	TCGGAAAAATGGAAAAGTGGTG GGCGTTACAGTCAAGGGAATA	(GT) ₈	254	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.1538	0.7508	0.8205	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr014	GQ344849	TGAGAAGGGGATAGCCGAGAG GCATTTGCAGTTTGAGAGTTG	(GA) ₁₂	109	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.0000	0.5046	0.5256	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr015	GQ344850	GCAACACAAGGGCTAAAAGC	(GT) ₇	241	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.5385	0.7662	0.8333	0.0004

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H _o	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr016	GQ344851	GGGCTCAGACGGAAAACT TGTTGCTTTCCCTCCACTT CTGACCATCCCCAATAATCC	(ATGT) ₅	182	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.2308	0.6831	0.7949	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr017	GQ344852	TGGGCACTGTAACCTCTGTGG AATTTAGTGTGGCGGCATA CCTAGACCGTCTGTCCACATC AAAAGCTCAACAGGCGAAAA	(CA) ₁₁	146	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.2308	0.5200	0.6410	0.0036
Dmed ^{UNICAMP} _ssr018	GQ344853	GAGCTTTTCATTCCATACA ATTGACCTTCTGCCATTAC CGCGTGCGTATAAAAGTA TCAGCCAGAGAAATCCACATC	(CT) ₈	100	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.1538	0.6000	0.7308	0.0012
Dmed ^{UNICAMP} _ssr019	GQ344853	GAGCTTTTCATTCCATACA ATTGACCTTCTGCCATTAC CGCGTGCGTATAAAAGTA TCAGCCAGAGAAATCCACATC	(AC) ₇	191	TD ₆₅₋₅₅	13	7	0.3077	0.8462	0.9231	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr020	GQ344854	CGCGTGCGTATAAAAGTA TCAGCCAGAGAAATCCACATC TGTGGTTGGCTTCATTAG TCTCTTCTCCCTTCCTG	(CA) ₁₀	270	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.7569	0.8974	0.0015
Dmed ^{UNICAMP} _ssr021	GQ344855	TGTGGTTGGCTTCATTAG TCTCTTCTCCCTTCCTG GACAGCATCTCAAGTGGTTT CTTGAGTGTGAGGAGTGAATAA	(GA) ₁₇	316	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.6154	0.8431	0.7949	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr022	GQ344856	GACAGCATCTCAAGTGGTTT CTTGAGTGTGAGGAGTGAATAA ACGGGAAGGGACAAGTAAAG ACGCACATAAAAAGCCAAC	(TG) ₈	212	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.4615	0.6431	0.8590	0.2065
Dmed ^{UNICAMP} _ssr023	GQ344857	ACGGGAAGGGACAAGTAAAG ACGCACATAAAAAGCCAAC CAGTGTGTCAAAGCCACAIT CAACAGCAAATTTTGTACCC	(TG) ₇	229	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3846	0.5323	0.7308	0.1180
Dmed ^{UNICAMP} _ssr024	GQ344858	CAGTGTGTCAAAGCCACAIT CAACAGCAAATTTTGTACCC CAATGGACGGATGAAAATG TGGCAACAACAATCTAATGG	(CA) ₁₀ (TA) ₆	80	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0000	0.6031	0.6282	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr025	GQ344859	CAATGGACGGATGAAAATG TGGCAACAACAATCTAATGG CCGACTTCGAGCAACTCTTT GCCGTGATGTGTGTCTT	(GACA) ₄	203	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3077	0.4431	0.6282	0.1760
Dmed ^{UNICAMP} _ssr026	GQ344860	CCGACTTCGAGCAACTCTTT GCCGTGATGTGTGTCTT GAGCGAAAAGAGGGCAAGAG AATGAGCAAGGCAAACAACA	(AC) ₁₁	201	TD ₆₅₋₅₅	9	4	0.0000	0.7582	0.8056	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr027	GQ344861	GAGCGAAAAGAGGGCAAGAG AATGAGCAAGGCAAACAACA AGACAAAAGCCAGGAAGGA CCACATGGCCGCAAGAT	(AG) ₁₅	141	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.7415	0.8846	0.0006
Dmed ^{UNICAMP} _ssr028	GQ344862	AGACAAAAGCCAGGAAGGA CCACATGGCCGCAAGAT GCCCAACAAGCAACACAACA CGGCTTTTCGCTTCATAATCTT	(AC) ₉	197	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.8462	0.7046	0.8077	0.7447
Dmed ^{UNICAMP} _ssr029	GQ344863	GCCCAACAAGCAACACAACA CGGCTTTTCGCTTCATAATCTT TGAGCTGAGCTTGATTATTGAG TTGACTGAAGCTTTGTTTTTG	(CAA) ₆	289	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3077	0.5815	0.7564	0.0303
Dmed ^{UNICAMP} _ssr030	GQ344864	TGAGCTGAGCTTGATTATTGAG TTGACTGAAGCTTTGTTTTTG ACAGGAGGAGAACAGGAGCA GAAAAATAACCCCGCAAAT	(CA) ₇	172	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.8123	0.9359	0.0004
Dmed ^{UNICAMP} _ssr031	GQ344864	ACAGGAGGAGAACAGGAGCA GAAAAATAACCCCGCAAAT TCGCTCGCTCTCGTTCTTA AGCGACAGCACCAGTCAGT	(TC) ₉	241	TD ₆₅₋₅₅	13	8	0.3846	0.8862	0.9615	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr032	GQ344865	TCGCTCGCTCTCGTTCTTA AGCGACAGCACCAGTCAGT	(TC) ₉ ...(CT) ₉	159	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.1538	0.5600	0.6410	0.0000*

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H _o	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr033	GQ344866	ATCCGTTGCATTATTGG CATCCTTTTGTATCCTGTGA	(TG) ₇	245	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.1538	0.4800	0.6154	0.0049
Dmed ^{UNICAMP} _ssr034	GQ344867	TGGACTACACATCTGGACAAG AAATATTTATGAGGAGCACGAG	(GT) ₁₀ ...(TG) ₈	115	TD ₆₅₋₅₅	13	9	0.3846	0.9046	0.9615	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr035	GQ344868	CGGACAGGTGAAAATACACAC AGCGGAGAGGAAACACAAGA	(CA) ₇	170	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0769	0.5569	0.6026	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr036	GQ344869	AGTGAAAACATGGGGGAAA TGGGACTTACACAAAGCGATA	(AC) ₇	145	TD ₆₅₋₅₅	11	3	0.0000	0.4502	0.4727	0.0003*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr037	GQ344870	ATGGGAACTGCTGTGTGG TGGCCCCGTAAAAGAGATA	(TC) ₉	263	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.1538	0.3846	0.5256	0.0267
Dmed ^{UNICAMP} _ssr038	GQ344871	TGCTTTGCCCTCCTTTTG GTTGCCCTCCTCCTCCTC	(CAA) ₆	252	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.2308	0.2185	0.4103	1.0000
Dmed ^{UNICAMP} _ssr039	GQ344872	GAGAAAGAGCAAACCTGAAC CAAGAGGGAAGGAGATAGA	(CT) ₈	182	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.2308	0.7354	0.8333	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr040	GQ344872	GTCTATCTCCTCCCTCTTG AGTCTTTGCCCTGTCCAG	(GT) ₇	135	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.0000	0.7385	0.7692	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr041	GQ344873	CCCCCTTCTGACATCTCTACA TCGCATTTCCCCAGCATA	(TTG) ₅ ...(GT) ₁₀	286	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.5938	0.7179	0.0054
Dmed ^{UNICAMP} _ssr042	GQ344874	ATACTAACAACAACAACAATGG GACGAAAACTGGAGGAA	(TG) ₉	235	TD ₆₅₋₅₅	12	6	0.1667	0.7536	0.8182	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr043	GQ344875	TTAATCAATGGCGGAGTC CAAAGTTGAAACGGGAAGTG	(CT) ₁₂	223	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.3077	0.7877	0.8846	0.0004
Dmed ^{UNICAMP} _ssr044	GQ344875	GTCCGGTCAATGGCAAAC TTCTCCGGCAAAGACAAAAG	(CA) ₇	176	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.2308	0.7108	0.8077	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr045	GQ344876	CTCTGAGTAAGCCAATCTG TTAAAATCACAATCACA AAAAC	(TG) ₇	120	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.2308	0.7169	0.8333	0.0005
Dmed ^{UNICAMP} _ssr046	GQ344877	GGCGGAGAGGTATAACATTCA TCACACAGCGGAAGCAAC	(TC) ₈	152	TD ₆₅₋₅₅	12	3	0.5000	0.6522	0.8333	0.2299
Dmed ^{UNICAMP} _ssr047	GQ344878	CGATCCATTCAATTTACAAG ACAACAGTAACAGCAGCAACAA	(AC) ₇	220	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.0000	0.6154	0.6410	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr048	GQ344878	CTGTTGTTGTTGCTGCTGTTAC GGATACCGTGTGGAGTGT	(CA) ₇	274	TD ₆₅₋₅₅	11	4	0.1818	0.5714	0.7091	0.0021
Dmed ^{UNICAMP} _ssr049	GQ344879	TCGCTTGTGAATTTGGTCTCT GCAGTTGCAAGTGTGGGTAGTC	(TG) ₈	143	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.4800	0.5000	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr050	GQ344880	AGGCAAGAAGAAGACAAAAG	(TTG) ₅	152	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.3077	0.7569	0.8718	0.0026

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H _o	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr051	GQ344881	TCCAGCAACAGAGAACCGTATT TCTTAGCCTGGCCAAAACCTTAG CACCTCTTATTGATCGGAAACC	(TG) ₈	177	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.2308	0.6246	0.7821	0.0017
Dmed ^{UNICAMP} _ssr052	GQ344882	AAAACGAATGAGGAGTGAGAAT ACGTCGACCGGAGATGAT	(TG) ₈	256	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.2308	0.6000	0.7564	0.0077
Dmed ^{UNICAMP} _ssr053	GQ344883	CTGCAGTCGAGTTGATAAG ACTGGAAATGTTGTAGATAAGA	(CA) ₉	122	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.0769	0.5508	0.6282	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr054	GQ344884	TGGTAATGCAAACGACACTT CGCCAATTACGAGAGGAA	(CA) ₉	214	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.2308	0.7938	0.8718	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr055	GQ344885	TGGCACAAGTGATAAAGGAA AGAAAAGGTCAATGGCAACTG	(CAA) ₅	230	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.0769	0.4031	0.4231	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr056	GQ344886	TGGCAGCTTATTAGCAAGTCC CAGCAGCAAGAACACGAG	(TG) ₁₁	142	TD ₆₅₋₅₅	12	7	0.3333	0.8514	0.9545	0.0003*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr057	GQ344886	TGTGCTGACGAATGATGACTAT TGCTGTTTTATGCTGTTTTAT	(TGT) ₅	137	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.4615	0.8092	0.9359	0.0087
Dmed ^{UNICAMP} _ssr058	GQ344886	TGCTGCGTCGGCTCATT GCCGCGTTTTGCTACAGTC	(ACA) ₇	111	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.3077	0.6492	0.8333	0.0373
Dmed ^{UNICAMP} _ssr059	GQ344887	ACACAGCTCGACAAAATG GGAAACCAATCAAACAATC	(AC) ₇	184	TD ₆₅₋₅₅	13	2	0.0000	0.4923	0.5128	0.0002*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr060	GQ344888	CGAGCAACGAACCCAAACA AAATCGCAGCTGACCCACAC	(AC) ₇ ...(ACTCA) ₃	310	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.3846	0.7877	0.9103	0.0027
Dmed ^{UNICAMP} _ssr061	GQ344889	CGGAACCGATCCATCATA ATCATTGTCCTACCCCTGT	(TG) ₁₆	116	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.5385	0.7354	0.8718	0.0385
Dmed ^{UNICAMP} _ssr062	GQ344890	GCCCTAGATGTGCTTGATTG ACCACCGCAGTATCTTCAGTAT	(GTT) ₅	148	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.3938	0.4103	0.0004
Dmed ^{UNICAMP} _ssr063	GQ344890	AACAGCGAAATGGGTCAATCAC GCCAAATAAAAACGAGCACA	(CA) ₈	189	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.2308	0.5877	0.7179	0.0035
Dmed ^{UNICAMP} _ssr064	GQ344891	CTCTGCAATGCCCACTGAC CGCTCCGCTGATGTTTATGTT	(AG) ₁₀	188	TD ₆₅₋₅₅	11	8	0.2727	0.8874	0.9455	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr065	GQ344892	GCAGGGAAAGAGGCACAAAT AAACGACAGGCAAACCATAAAA	(TG) ₇	198	TD ₆₅₋₅₅	13	8	0.1538	0.8277	0.8846	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr066	GQ344893	GTGCCAAGGCCCAACAAA TTACCGCTATCTCCGCTTACAC	(TG) ₇	89	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.2308	0.6738	0.7949	0.0006
Dmed ^{UNICAMP} _ssr067	GQ344894	GACTCACAATGCGTCCATA TCTCGCTCACACTTGCTAACT	(TGAG) ₄	129	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.5077	0.6282	0.0072

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H _o	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr068	GQ344895	ATGAGAATTATCGTTTTAG AGTGTACTTTGCTCTGTTG	(CA) ₉	213	54°C	13	6	0.3077	0.7200	0.8077	0.0004
Dmed ^{UNICAMP} _ssr069	GQ344895	TGGAAAGCTCTGCTCTGTGT TTTGGACAGCTTGCCTTCTT	(CA) ₈	137	TD ₆₅₋₅₅	11	3	0.1818	0.3247	0.4909	0.2718
Dmed ^{UNICAMP} _ssr070	GQ344896	CATTACACACTCCACCAATC CGAAATTATGTGAGCAAGAG	(CT) ₉	108	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.1538	0.6646	0.7564	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr071	GQ344897	GGTCTCATCGCTTCCTCTCTA GCATTGACTTGTGGGTTTGT	(TGTTTC) ₃	130	TD ₆₅₋₅₅	13	2	0.3077	0.4431	0.6410	0.5084
Dmed ^{UNICAMP} _ssr072	GQ344898	TGGCAATTTAGGTTTACTTTCA ACCCATTATGCTCAITTCCTT	(AG) ₉	135	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3846	0.6431	0.8077	0.0225
Dmed ^{UNICAMP} _ssr073	GQ344899	AACTCGTTTGGTGGGCTTCC TGCTTGCTCAATGGTGGTTTTT	(TC) ₈ ...(CT) ₇	266	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.3077	0.6677	0.7949	0.0040
Dmed ^{UNICAMP} _ssr074	GQ344900	ACGATGATAATAATGATGATG ATGACAGACAGATAGACAGACT	(GT) ₈	166	TD ₆₅₋₅₅	12	8	0.3333	0.8406	0.9394	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr075	GQ344901	AACCTTGCAACTTGAGAAACC GACTGAACAAATGATGGAAAAA	(AC) ₈	264	TD ₆₅₋₅₅	13	7	0.4615	0.8308	0.9487	0.0041
Dmed ^{UNICAMP} _ssr076	GQ344901	TTTCCGTTAGTTCGGATTGAGT GTGTGCTTGGCCAGTGCTAC	(GTT) ₆	189	TD ₆₅₋₅₅	13	7	0.4615	0.8000	0.9487	0.0238
Dmed ^{UNICAMP} _ssr077	GQ344902	CGAAAGGAGCCGAGACAACA ACCAATACCGATAGCGATACCA	(GT) ₇	212	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.4615	0.6185	0.8077	0.1018
Dmed ^{UNICAMP} _ssr078	GQ344903	TCAGCCATCTCCGACCAT ACAGGCCAAAAAGAGCACAAA	(CT) ₁₂	265	TD ₆₅₋₅₅	11	6	0.0909	0.8442	0.9091	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr079	GQ344904	AACCCAGGTGAAATGATGACGAT GCCAAGTGCGAGCAAAGAGA	(TCTG) ₄ ...(CT) ₁₈	143	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0769	0.6431	0.7179	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr080	GQ344905	CTGACAGCGTTTCCACAA AAGTTCAGCCACATGCGTCTAT	(CA) ₇	84	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.1538	0.3938	0.5256	0.0153
Dmed ^{UNICAMP} _ssr081	GQ344906	GTGCCCTCCTCTCCTCTTC ACTTGGGTGTGCGAGTGT	(CA) ₁₁	259	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.2308	0.6831	0.7949	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr082	GQ344907	TCAAGGTGTTCGCGCTT AGTTGCAAAAACACACAGATG	(TATG) ₄ ...(AC) ₉	123	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.0000	0.6523	0.6795	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr083	GQ344908	ACCCGGAGTTACCCATTTC GTTTCGCGACTACATCATTTT	(TG) ₇	175	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.2308	0.3446	0.5385	0.3859
Dmed ^{UNICAMP} _ssr084	GQ344909	TAAAAATTAGAGTCCCGTCCAC TGTTTTACCCGTCTCCTG	(TG) ₇	135	46°C	11	2	0.0000	0.1732	0.1818	0.0470
Dmed ^{UNICAMP} _ssr085	GQ344910	GGATAACTTACCGAGGAC	(GA) ₁₄	177	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.6154	0.8062	0.9231	0.0933

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H ₀	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr086	GQ344911	GCTTATCTTAGTGTATTGTTGT TCGCAACTCCACAGAATGTC CAATTAACGACGCAAGCAAA	(TG) ₁₄	181	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3077	0.6554	0.8077	0.0053
Dmed ^{UNICAMP} _ssr087	GQ344912	TTGGCGGCATAATAAAGTG AGCATAACGAAGCAAAGTCATA	(GCA) ₁₃	128	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.4615	0.6677	0.7949	0.0067
Dmed ^{UNICAMP} _ssr088	GQ344912	GCCCTGCTATGACTTTGCTT ATTGGCGATTGTCCTTTAT	(AG) ₁₀	142	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.5138	0.7179	0.0609
Dmed ^{UNICAMP} _ssr089	GQ344913	GCACAACAACAACAGCAAATGA GACAAGGGGGACTAAGGAGACA	(TG) ₇	250	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.4923	0.5128	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr090	GQ344913	TGTCGAAGTGTCTCCTTAGTCC GAGAGAGAAGGCGAAAAAGA	(CT) ₈	100	TD ₆₅₋₅₅	12	3	0.0833	0.6703	0.7576	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr091	GQ344914	ACCATCAGAGCCACATACACA TATTGGTGGGTTTTCTCAA	(AC) ₇	121	TD ₆₅₋₅₅	13	2	0.0000	0.3692	0.3846	0.0015
Dmed ^{UNICAMP} _ssr092	GQ344915	TCCTTAGCACACTCAGCAGTC GGCAAAGTCAAAGCACACA	(TC) ₈	219	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0769	0.5138	0.5385	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr093	GQ344916	AGTGCCITAGCTCAITTTCTTA CCGCTGAGTTAGTTGTTTTAT	(CA) ₇	239	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3077	0.5754	0.7308	0.0012
Dmed ^{UNICAMP} _ssr094	GQ344917	TGTGTGTGGCTTCTTCTCT GCCGCTGTCGTGATAATAA	(TGC) ₅	103	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.1538	0.3969	0.5385	0.0472
Dmed ^{UNICAMP} _ssr095	GQ344918	TGAGCAGTAGCAACACTTAT TCTCTTCTTGCTACCTCTTACTC	(CT) ₉	147	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.2308	0.7508	0.8333	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr096	GQ344919	TGCATTTAATGGTTGAAGTGT TGATAATGAGCATGAAGACGAG	(AC) ₁₂	152	TD ₆₅₋₅₅	13	9	0.7692	0.8923	0.9872	0.2728
Dmed ^{UNICAMP} _ssr097	GQ344920	CATCAACCAACCAGCCAACAAC TAGGTGCATGACAGCCCAAAGT	(GT) ₇	156	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.2308	0.6000	0.7308	0.0042
Dmed ^{UNICAMP} _ssr098	GQ344921	GACTACAACCAGCCCCCTACT TGTGCGACCAACTGAAATGAG	(TTG) ₈	162	TD ₆₅₋₅₅	13	6	0.3077	0.8523	0.9487	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr099	GQ344922	GTCGAGCCTTTTTAACAGTGAG GGAAGACAAGAGGAAGAAGTG	(TG) ₈	299	TD ₆₅₋₅₅	11	3	0.0000	0.5887	0.6182	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr100	GQ344923	ACTCCTTTGTCTGTCTGTAGCA TGTGCGCCTTTTCATTTGTT	(TG) ₈	116	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.3077	0.7385	0.8846	0.0024
Dmed ^{UNICAMP} _ssr101	GQ344924	AAAAACCGACAGGAAAAGT TTGATGCTGCTCTAAAGTG	(CA) ₇	226	TD ₆₅₋₅₅	13	2	0.0000	0.2708	0.2821	0.0047
Dmed ^{UNICAMP} _ssr102	GQ344925	GATTAATATGTTGTGTCTCTG TGTGTAGGCATCGTTTAG	(CT) ₁₀	197	TD ₆₅₋₅₅	13	8	0.2308	0.8185	0.8718	0.0000*

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H ₀	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr103	GQ344926	GAAATAGCGGTAAACGGGACGAG GTGGGGCATGCCACAATCTT	(CA) ₇	223	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.5385	0.6769	0.8462	0.1256
Dmed ^{UNICAMP} _ssr104	GQ344927	GCTAATTGTTGCCGTTGAG TTGGAATGGAAAGAGTATC	(AC) ₇ ...(ACA) ₆	290	49°C	13	3	0.2308	0.2185	0.4103	1.0000
Dmed ^{UNICAMP} _ssr105	GQ344928	TTGTCATTGGCATTTCGGTCAC CTGGCGCTTGCTCACTCACTCT	(GCCA) ₄	249	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.2308	0.4400	0.5256	0.0099
Dmed ^{UNICAMP} _ssr106	GQ344929	CCGTGAATTCGGTTTTATT GCGTCCGTCAGATTCGTTA	(CA) ₉	172	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.2831	0.2949	0.0012
Dmed ^{UNICAMP} _ssr107	GQ344930	ATTACAATTACAGCCGCACAC AGAAGCAGTCAAACGCAACAGA	(CT) ₁₂	179	TD ₆₅₋₅₅	13	8	0.6154	0.8615	0.8718	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr108	GQ344931	CCGCGGGATTAGAAGAGAG GCTGCTATCGGTAGTTGCTTTT	(AG) ₁₂	212	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.2308	0.6308	0.7821	0.0043
Dmed ^{UNICAMP} _ssr109	GQ344932	GCAGCAGGAGAGTGAAAGAG GCTGCAACAACAAAACAATAC	(ACAGC) ₃	164	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0769	0.5938	0.6795	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr110	GQ344933	TCGCGGTCAAGTTGAATAAC CACAGCAGATGGGTAGCAGT	(GT) ₇	231	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.1538	0.7262	0.8077	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr111	GQ344934	AAACAAGTTGAGAAGAA AGTATGTAAGTAAGTATGTATG	(GT) ₁₀	221	46°C	13	4	0.3846	0.6738	0.8077	0.0043
Dmed ^{UNICAMP} _ssr112	GQ344935	ATGTGATGCCTCCTGAAAG CGCTGAAATATAAATGTTGTGT	(AG) ₁₂	175	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.8246	0.9231	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr113	GQ344936	GCCACAACGTCAACAATA GGTGGAAGTCTACACACTC	(GT) ₈ ...(TG) ₁₀	210	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.5538	0.7308	0.0548
Dmed ^{UNICAMP} _ssr114	GQ344937	AATCTGCTGTTTGTGTTGAC GTTTAATGGTCTTTCTTTCTC	(AC) ₇	297	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.2308	0.7508	0.8846	0.0003*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr115	GQ344938	CGCGCACAGACATACAGTTT TTTACGCTCTCACGCTCTTTAC	(GT) ₇	207	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0769	0.7662	0.8333	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr116	GQ344939	CTCCACACTCGTTGCGTTTA ATGCTGCTGCTGCTGTTG	(CCT) ₅	189	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.2308	0.4400	0.6026	0.0238
Dmed ^{UNICAMP} _ssr117	GQ344940	CCCCCTTTTACTTTACAAT TTTTCAAGTTAACGTCAGCAGA	(TG) ₇	184	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.6769	0.7051	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr118	GQ344941	GACAGTCGATCCGGTTTTCA TGGACATAGTTGGCGACATCTT	(AGA) ₆	136	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.7446	0.8718	0.0014
Dmed ^{UNICAMP} _ssr119	GQ344942	ATCTATGAGTTTCGTTATCT CATGTTCCGTTGTTTTCT	(CA) ₇ (A)(AC) ₈	178	45°C	13	6	0.1538	0.6554	0.7308	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr120	GQ344942	ACGCCGAAGACAAGTAAT	(AG) ₈	108	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0769	0.4462	0.5256	0.0006

Locus	Genbank Accession	Primer sequence (5' - 3')	Motif	Size (bp)	AC	n	N _a	H _o	H _E	D	HWE p-value (*)
Dmed ^{UNICAMP} _ssr121	GQ344943	TGATAAGCAAACCAACA CGCATCTCAACGCATACT AACGCCTACCAAACGAGAGA	(GT) ₁₀	144	TD ₆₅₋₅₅	13	8	0.1538	0.8615	0.9231	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr122	GQ344944	GCATTTGTCATTGCAGAT GCCAAGTGTTAGCAAGATTA GCACATGCGTTCTCATTTTT	(TTCA) ₅ ...(TTTTG)	212	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.3077	0.7077	0.8462	0.0023
Dmed ^{UNICAMP} _ssr123	GQ344945	CCCGCTCTCCATTCACTACT TGCGAGCGAGAGAGAGAGT GTGCCAAAACAATCACA	(TG) ₉	190	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0000	0.5169	0.5385	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr124	GQ344946	GGGACCAAGTGAAGAGAAAT CACACTCACAAACGAGGAAT GCAATGAGCAGGCAACAATA	(AAAAG) ₃	156	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0769	0.5877	0.6795	0.0001*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr125	GQ344946	ACTGCGAACTGGCAATGATA TATATGGCATGTCTGTGTTT ATCATAGTTGTAGTTGTTGTTG	(GCA) ₆ ...(AACAA)	159	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.3846	0.6000	0.7821	0.0756
Dmed ^{UNICAMP} _ssr126	GQ344947	CCACAACACTACGAAACGGAAA GAACTGAAACTGAGCCACCA CGAAAGTGGAAATCTGA	(TC) ₉	291	TD ₆₅₋₅₅	13	2	0.0769	0.2123	0.2949	0.1220
Dmed ^{UNICAMP} _ssr127	GQ344947	GTGTGCGTATGTGAGTGG CTGCGGCTGTGACTCTCTA GATGTGGAGCAGGCAATAAAT	(AC) ₁₆	276	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0769	0.6431	0.7179	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr128	GQ344948	AATGTTGCTCGCACTGTGAC TCACAACCAACCACACCC TTCATCGGTGGGTGTGTG	(CA) ₈	216	TD ₆₅₋₅₅	13	5	0.0769	0.7538	0.8333	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr129	GQ344949	CTGAACTTGAACGCTGCTG TGCAGCAGCGTTTCAAGTT AATAAGCACGTGTGGTTTTTC	(ATAC) ₄	230	TD ₆₅₋₅₅	13	3	0.0000	0.2831	0.2949	0.0026
Dmed ^{UNICAMP} _ssr130	GQ344950	TGGCTGTGCTGTGAATGATC TGTGTTGTGCTCCTCCCTCT	(CA) ₁₀	154	TD ₆₅₋₅₅	12	6	0.4167	0.7246	0.8939	0.0383
Dmed ^{UNICAMP} _ssr131	GQ344951	AATGTTGCTCGCACTGTGAC TCACAACCAACCACACCC TTCATCGGTGGGTGTGTG	(GTT) ₆	164	TD ₆₅₋₅₅	10	3	0.0000	0.3579	0.3778	0.0029
Dmed ^{UNICAMP} _ssr132	GQ344951	CTGAACTTGAACGCTGCTG TGCAGCAGCGTTTCAAGTT AATAAGCACGTGTGGTTTTTC	(GT) ₉	156	TD ₆₅₋₅₅	8	2	0.0000	0.2333	0.2500	0.0686
Dmed ^{UNICAMP} _ssr133	GQ344951	TGCAGCAGCGTTTCAAGTT AATAAGCACGTGTGGTTTTTC TGGCTGTGCTGTGAATGATC	(GT) ₈	245	TD ₆₅₋₅₅	13	9	0.2308	0.7046	0.7308	0.0000*
Dmed ^{UNICAMP} _ssr134	GQ344952	TGGCTGTGCTGTGAATGATC TGTGTTGTGCTCCTCCCTCT	(GT) ₈	232	TD ₆₅₋₅₅	13	4	0.0000	0.5046	0.5256	0.0000*

REFERENCES

- Ananina G, Peixoto AA, Souza WN, da Silva LB, Klaczko LB (2002) Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:691-694
- Ananina G, Peixoto AA, Bitner-Mathé BC, Souza WN, da Silva LB, Valente VLS, Klaczko LB (2004) Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. Genet Mol Biol 27:61-69
- Andrade CAC, Hatadani LM, Klaczko LB (2005) Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: effect of the temperature. J Therm Biol 30:518-523
- Andrade CAC, Vieira RD, Ananina G, Klaczko LB (2009) Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. Genetica 135:13-23
- Azeredo-Espin AML, Schroder RFW, Huettel MD, Sheppard WS (1991) Mitochondrial-DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). Experientia 47:483-485
- Billotte N, Lagoda PJJ, Risterucci A-M, Baurens F-C (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54:277-288
- Bitner-Mathé BC, Peixoto AA, Klaczko LB (1995) Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. Heredity 75:54-61
- Carvalho AB, Peixoto AA, Klaczko LB (1989) Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. Heredity 62:425-428
- Carvalho AB, Klaczko LB (1993) Autosomal suppressors of sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. Heredity 71:546-551
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Biol Rep 19:299-306

- Dobzhansky T, Pavan C (1943) Studies on Brazilian species of *Drosophila*. Bol Facul Fil Cien Let Univ S Paulo n36 Biologia Geral n4
- Hatadani LM, Klaczko LB (2008) Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica* 133:335-342
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Statist* 5:299-314
- Katti MV, Rankejar PK, Gupta VS (2001) Differential distribution of simple sequence repeats of eukaryotic genome sequences. *Mol Biol Evol* 18:1161-1167
- Miller MP (1997) Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Nei (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248-249
- Rocha F, Medeiros HF, Klaczko LB (2008) The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* 63:280-287
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp365-386
- Schug MD, Wtterstrand KA, Gaudette MS, Lim RH, Hutter CM, Aquadro CF (1998) The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 7:57-70
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1441-1452

- Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet* 98:171-177
- Tóth G, Gáspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10:967-981
- Vilela CR (1992) On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revta Bras Entomol* 36:197-221

CAPÍTULO II

**“*Drosophila mediopunctata* microsatellites II:
cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila*
species”**

Prianda R. Laborda
Louis B. Klaczko
Anete P. de Souza

Conservation Genetics Resources (2009) 1: 281-296

Technical note

***Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species**

Prianda R. Laborda¹, Louis B. Klaczko² and Anete P. de Souza^{1,3*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, CEP 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

E-mail anete@unicamp.br

Phone 55-19-35211132

FAX 55-19-35211089

ABSTRACT

Heterologous amplification of 134 recently developed *Drosophila mediopunctata* microsatellites is here reported. Cross-species amplification was analyzed in 30 species of the *Drosophila* and *Sophophora* subgenera, and emphasis was given to the *tripunctata* group. The overall microsatellite transfer rate was 48%. The highest cross-species amplifications were observed in *D. unipunctata* (n=94) and *D. roehrae* (n=82). The phylogenetic proximity to *D. mediopunctata* did not correspond to greater numbers of successfully amplified microsatellites. Of the 134 microsatellite loci, 21 failed to amplify in all species and eighteen were detected in all of them. A UPGMA dendrogram, based on Jaccard's similarities in the *tripunctata* group, recovered few expected phylogenetic relationships. The data demonstrated that many *D. mediopunctata* microsatellites are now available as potentially useful markers for genetic investigation and conservation of other *Drosophila* species.

KEYWORDS

Drosophila, microsatellites, cross-species amplification, *tripunctata* group

The use of microsatellite markers as tools for genetic investigations has revolutionized the way researchers explore genomes and assess genetic diversity. The ease of use and the low-cost routine of microsatellites make them a great option when it comes, for instance, to conservation or genetic mapping studies. Nevertheless, the availability of microsatellites rely on their not so inexpensive and, eventually, time-consuming development as genetic markers. Therefore, the possibility of using isolated and well-characterized microsatellite markers for the study of closely related species has been a desirable shortcut. In addition, heterologous microsatellites enable analyses of species relationships. Unlike many phylogenetic approaches based on one or few genomic regions, microsatellites offer the possibility of using multilocus data. Consequently, several authors have used these molecular markers to successfully pursue the complex phylogenetic relationships within the genus *Drosophila* (Harr et al. 1998; Orsini et al. 2004).

The first microsatellite loci isolated for the fly *Drosophila mediopunctata* were reported recently by Laborda et al. (2009). This species belongs to the subgenus *Drosophila* and to the *tripunctata* group, the second largest group in the genus (Vilela 1992). However, many *tripunctata* species are still poorly investigated. In this work, we report cross-species amplification of 134 *D. mediopunctata* microsatellites in 30 species of the subgenera *Drosophila* and *Sophophora*, with emphasis in the *tripunctata* subdivision. The main goals were to provide molecular markers for unstudied species and to evaluate the feasibility of the *D. mediopunctata* microsatellite loci to investigate genetic relationships among these species.

The 30 evaluated species are listed in Table 1, with classification data obtained in the website <http://taxodros.unizh.ch>. Genomic DNA from ten flies of each species was isolated in bulk, according to the salting out method described by Aljanabi and Martinez (1997). Heterologous amplifications were performed with the same polymerase chain reactions (PCRs) parameters and according to the annealing conditions optimized for each microsatellite primer pair described in Laborda et al. (2009). PCR products were visualized by electrophoresis in TBE 0.5x 3% agarose gels stained with ethidium bromide. Gels were scored in two ways; the first, considering three categories (1 - good amplification conditions in the expected length; 2 - presence of amplification products, but with PCR adjustments

required, and 3 - absence of amplification), and the second, considering only presence or absence of amplification product for the given locus. The binary matrix was used to estimate Jaccard's similarities (Jaccard 1908), which were then used to produce a UPGMA clustering. The analyses were performed in NTSYSpc (Rohlf 1997). The bootstrap confidence levels were obtained with the software BOOD v3.2 (personal communication by A. G. S. Coelho).

Heterologous amplifications of the *D. mediopunctata* microsatellite markers resulted in 48% overall loci transfer rate (1,938 positive amplifications out of 4,020 possible combinations), of which 78% do not require further optimization (Table 1). The loci that showed undesirable profiles require PCR adjustments of template DNA concentration and/or annealing temperature. The highest numbers of transferred microsatellites were $n=94$ in *D. unipunctata* (70%) and $n=82$ in *D. roehrae* (61%), whereas the lowest rate was $n=51$ in *D. willistoni* (38%). Taking into account the markers that still require optimization, the average was 64 markers per species; in the *tripunctata* group, the average was 67 and, out of it, the average was 62. This result showed that there is no evident association between the number of successfully amplified markers and the phylogenetic proximity to *D. mediopunctata*. Wilder et al. (2002), using *Drosophila dumni* markers, described contrasting results. In their work, it is reported a high rate of heterologous amplifications within the *cardini* group and a low rate for the species that do not belong to this group. Nevertheless, it should be considered that the authors used only one species to represent each group, what may have biased the data. Of the 134 *D. mediopunctata* microsatellites, 21 did not amplify in any of the 30 evaluated species, whereas 18 loci could be successfully amplified in all of them. In addition, 22 markers were visualized in more than 25 species. This result may indicate conserved genomic fragments or linkage disequilibrium with selective constrained regions. The BLASTn search in the GenBank using *D. mediopunctata* original sequences did not return information that could support this hypothesis. It should be considered, though, that the *tripunctata* species, supposed to display the highest sequence similarities with *D. mediopunctata*, are still poorly represented in the GenBank. In spite of the fact that higher rates of heterologous amplification were not observed for the *tripunctata* group in

comparison to the other evaluated species, *D. mediopunctata* microsatellites still hold great potential for genetic investigation of some *tripunctata* species.

Even though there was no available allelic information on the evaluated species, the binary data of the developed *D. mediopunctata* microsatellite loci were further tested in a clustering analysis using only the *tripunctata* species. This kind of data does not consist of variation in the number of repeats of the microsatellite locus, but of its flanking regions. The interpretation of amplification products as present or absent indirectly reveals polymorphisms in the microsatellite primer sites. Therefore, the question to be answered in the present genetic analysis is: “In a given locus, are the microsatellite flanking region sequences similar among the analyzed species?”. In order to evaluate the informativeness level of this type of data, a UPGMA dendrogram based on Jaccard’s similarities was constructed (Figure 1). The dendrogram was partially consistent with literature data. The clusters *D. mediopunctata* – *D. unipunctata* - *D. roehrae*, *D. frotapessoai* - *D. paramediostriata* and *D. mediosignata* - *D. paraguayensis* had already been reported by Hatadani et al. (2009). The cluster *D. mediosignata* - *D. paraguayensis* had also been reported by Yotoko et al. (2003) and Robe et al. (2005). These previous studies used mitochondrial genes to obtain their consensus phylogenies, what consists of a far different method of establishing genetic relationships among species than the one here employed. The molecular strategy adopted to explore relationships in this work, i.e., the binary data obtained by means of polymorphisms in primer sites, seems to enable the recovery only of the best supported clusters, which probably show the strongest relationships among species. The use of allelic information on the variation in repeat number shall increase the power of *D. mediopunctata* microsatellite loci to reveal phylogenetic relationships among the *tripunctata* species.

This work evaluated *D. mediopunctata* microsatellite loci both by determining their heterologous amplification rates in other *Drosophila* species and by analyzing their ability to recover genetic relationships. The cross-species amplification data demonstrated that many of the *D. mediopunctata* microsatellites are suitable as ready-to-use molecular markers in some *Drosophila* species, since high rates of transfer were observed. The presence/absence data derived from heterologous amplifications among the *tripunctata* species could only partially recover already reported phylogenetic relationships. Nevertheless, the recently

developed *D. mediopunctata* microsatellites markers still have great potential of application in other perspectives of the genetic study of some still not well known *Drosophila* species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support by means of a graduate scholarship granted to PRL (2004/03385-1) and a research grant awarded to APS (2004/03203-0), and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research fellowship awarded to APS. The authors are also grateful to Dr. Laudénir Prioli, who carefully revised the manuscript and provided valuable comments on it.

Table 1 Cross-species amplification data of 134 *Drosophila mediopunctata* microsatellites in 30 *Drosophila* species, according to subgenus and group classification. (“+” = presence of amplification, “+/-” = presence of amplification, but requiring optimization, “m” = missing data). The loci in **bold** represent the fifteen microsatellites that displayed the best features for gel analysis disregarding the number of species that could be amplified.

SUBGENUS	<i>Drosophila</i>															<i>Sophophora</i>			<i>Dorsilopha</i>														
	<i>tripunctata</i>															<i>cardini</i>	<i>guarani</i>	<i>immigrans</i>	<i>pallidipennis</i>	<i>virilis</i>	<i>melanogaster</i>	<i>saltans</i>	<i>willistoni</i>	<i>busckii</i>									
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotopessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediostriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediostriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevantii</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr001																			+	+	+												
Dmed ^{UNICAMP} _ssr002	+	+/-	+	+/-	+		+		+/-	+/-	+	+	+	+/-	+						+	+	+	+/-		+/-	+	+					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr004													+/-																				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr005	+	+			+/-		+		+		+	+/-	+										+	+	+/-								
Dmed ^{UNICAMP} _ssr006	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr007	+	+			+/-		+	+	+	+	+	+/-												+									
Dmed ^{UNICAMP} _ssr008	+										+	+													+		+						
Dmed ^{UNICAMP} _ssr009					+							+																					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr010												+												+/-									
Dmed ^{UNICAMP} _ssr011				+/-							+	+					+/-		+/-						+/-				+/-	+/-			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr012											+																						
Dmed ^{UNICAMP} _ssr013	+	+									+						+								+/-		+/-						

SUBGENUS	<i>Drosophila</i>															<i>Sophophora</i>			<i>Dorsilopha</i>											
	<i>tripunctata</i>															<i>cardini</i>	<i>guarani</i>			<i>immigrans</i>	<i>pallidipennis</i>	<i>virilis</i>	<i>melanogaster</i>	<i>saltans</i>	<i>willistoni</i>	<i>busckii</i>				
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotpessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediotriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediotriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevanti</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>
Dmed ^{UNICAMP} _ssr030	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr031												+																		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr032	+	+	+		+	+	+		+	+		+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr033	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr034	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr035	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr036	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr037	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr038	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr039	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr040		+	+		+		+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-		+/-	+/-	+	+	+	+		+	+	+	+	+/-	+/-		+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr041		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr042																														
Dmed ^{UNICAMP} _ssr043	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr044	+		+	+	+			+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+			+	+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr045																														

SUBGENUS	Drosophila																				Sophophora		Dorsilopha							
	tripunctata										cardini	guarani				immigrans	pallidipennis	virilis	melanogaster	saltans	willistoni	busckii								
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotpessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediotriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediotriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevanti</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>
Dmed ^{UNICAMP} _ssr046	+/-		+	+				+/-	+			+	+/-				+	+	+	+		+		+				+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr047		+/-									+	+										+/-				+/-	+/-	+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr048											+	+				+							+			+/-	+/-			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr049	+	+			+	+	+		+	+		+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+		+			+/-	+	+/-	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr050																														
Dmed ^{UNICAMP} _ssr051											+	+	+/-	+/-		+														
Dmed ^{UNICAMP} _ssr052		+		+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed^{UNICAMP}_ssr053	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed^{UNICAMP}_ssr054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr056		+	+	+	+	+	+/-	+		+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+		+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr057	+	+	+	+	+/-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+		+	+	+	+	+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr058	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr059													+/-				+/-		+	+										
Dmed ^{UNICAMP} _ssr060	+	+	+/-	+	+	+	+		+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr061	+/-										+													+/-			+/-			

SUBGENUS	Drosophila																			Sophophora			Dorsilopha											
	tripunctata																			cardini	guarani	immigrans	pallidipennis	virilis	melanogaster	saltans	willistoni	busckii						
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotaessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediotriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediotriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevantii</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr062	+/-		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr063	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr064	+		+/-			+/-	+/-	+/-							+/-				+							+/-	+/-							
Dmed ^{UNICAMP} _ssr065	m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	m	+	+		+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	m		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr066	+/-				+/-	+/-	+/-				+	+/-	+	+/-	+/-								+/-		+/-	+/-	+/-	+/-						
Dmed ^{UNICAMP} _ssr067												+																						
Dmed ^{UNICAMP} _ssr068																																		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr069	+/-							+										+/-	+/-	+/-	+/-		+/-			+	+/-	+				+		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr070																																		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr071	+		+	+	+	+	+				+	+	+	+/-	+			+	+	+/-		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr072			+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr073	+	+		+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+		+				+	+	+	+			+	+		+					+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr074																																		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr075	+												+	+																				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr076									+		+	+																						
Dmed ^{UNICAMP} _ssr077											+	+																						

	SUBGENUS																						SUBGENUS										
	<i>Drosophila</i>																						<i>Sophophora</i>		<i>Dorsilopha</i>								
	GROUP																						GROUP										
	<i>tripunctata</i>											<i>cardini</i>	<i>guarani</i>	<i>immigrans</i>	<i>pallidipennis</i>	<i>virilis</i>	<i>melanogaster</i>	<i>saltans</i>	<i>willistoni</i>	<i>busckii</i>													
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotaessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediotriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediotriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevanti</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr094			+							+	+	+					+	+			+	+/-		+/-						+/-			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr095	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr096	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr097	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-		+				+		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr098			+	+	+		+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr099	+				+	+	+	+	+	+	+	+			+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr100											+	+/-																					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr101													+																				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr102	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr103	+	+	+/-	+	+		+	+	+	+		+	+		+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr104																																	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr105											+	+	+		+					+	+	+		+			+				+/-		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr106	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr107	+/-		+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+/-	+					+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr108																																	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr109																																	

SUBGENUS	<i>Drosophila</i>																				<i>Sophophora</i>			<i>Dorsilopha</i>							
GROUP	<i>tripunctata</i>										<i>cardini</i>			<i>guarani</i>			<i>immigrans</i>	<i>pallidipennis</i>	<i>virilis</i>	<i>melanogaster</i>	<i>saltans</i>	<i>willistoni</i>		<i>busckii</i>							
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotaessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediotriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediotriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevantii</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr110	+	+					+				+	+	+	+							+	+	+		+/-	+	+			+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr111				+/-								+									+										+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr112											+						+										+				+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr113	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		+	+	+		+/-		+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Dmed ^{UNICAMP} _ssr114																															
Dmed ^{UNICAMP} _ssr115		+	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr116	+/-	+	+		+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+		+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr117	+											+						+													
Dmed ^{UNICAMP} _ssr118	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr119	+/-				+			+	+			+	+								+	+/-									
Dmed ^{UNICAMP} _ssr120																															
Dmed ^{UNICAMP} _ssr121	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr122	+	+		+							+	+	+	+	+	+		+		+			+	+/-				+/-	+	+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr123	+	+		+		+/-		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+	+		+	+	+	+	+	+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr124		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dmed ^{UNICAMP} _ssr125											+	+																			

	SUBGENUS																														
	<i>Drosophila</i>																				<i>Sophophora</i>		<i>Dorsilopa</i>								
	GROUP																														
	<i>tripunctata</i>										<i>cardini</i>		<i>guarani</i>		<i>immigrans</i>	<i>pallidipennis</i>	<i>virilis</i>	<i>melanogaster</i>	<i>saltans</i>	<i>willistoni</i>	<i>busckii</i>										
SPECIES	<i>D. bandeirantorum</i>	<i>D. cuaso</i>	<i>D. frotaessoai</i>	<i>D. mediopicta</i>	<i>D. mediosignata</i>	<i>D. mediotriata</i>	<i>D. metzii</i>	<i>D. nappae</i>	<i>D. paraguayensis</i>	<i>D. paramediotriata</i>	<i>D. roehrae</i>	<i>D. trifilum</i>	<i>D. unipunctata</i>	<i>D. cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. neocardini</i>	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. griseolineata</i>	<i>D. guaraja</i>	<i>D. maculifrons</i>	<i>D. ornatifrons</i>	<i>D. immigrans</i>	<i>D. pallidipennis</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. sturtevanti</i>	<i>D. nebulosa</i>	<i>D. paulistorum</i>	<i>D. willistoni</i>	<i>D. busckii</i>	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr127	+	+	+/-	+	+		+	+	+	+			+	+/-				+	+	+/-	+/-		+	+/-						+/-	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr128	+				+		+		+		+		+					+		+											
Dmed ^{UNICAMP} _ssr129				+/-			+/-		+/-	+/-	+/-	+/-					+/-	+/-		+/-					+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr130																															
Dmed ^{UNICAMP} _ssr131																															
Dmed ^{UNICAMP} _ssr132																															
Dmed ^{UNICAMP} _ssr133	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr134											+																				
	70	57	64	63	62	56	65	60	65	65	82	77	94	64	61	61	54	60	71	65	71	63	65	64	54	66	65	67	51	56	

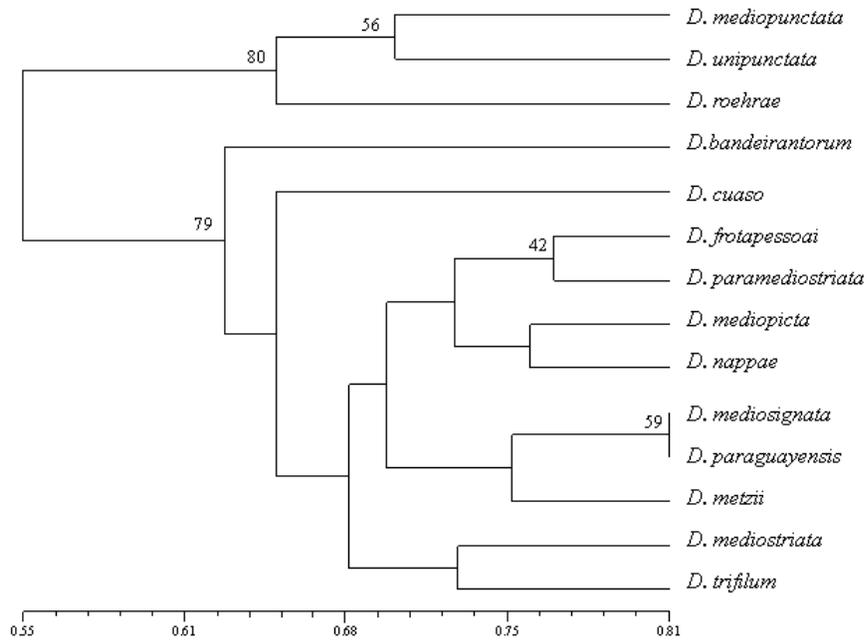


Figure 1 UPGMA dendrogram based on heterologous amplification of 134 *Drosophila mediopunctata* microsatellites markers in thirteen species from the *tripunctata* group. Genetic similarities were estimated by the Jaccard coefficient. Numbers in the dendrogram indicate bootstrap probabilities higher than 40%

REFERENCES

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693
- Harr B, Weiss S, David JR, Brem G, Schlötterer C (1998) A microsatellite-based multilocus phylogeny of *Drosophila melanogaster* species complex. *Curr Biol* 8:1183-1186
- Hatadani LM, McInerney JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB (2009) Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* 51:595-600
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44:223-270
- Laborda PR, Mori GM, Souza AP (2009) *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. (submitted to *Conserv Genet Res*)
- Orsini L, Huttunen S, Schlötterer C (2004) A multilocus microsatellite phylogeny of the *Drosophila virilis* group. *Heredity* 93:161-165
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M, Loreto ELS (2005) Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. *Mol Phylogenet Evol* 36:623-640
- Rohlf F (1997) NTSYSpc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, v. 2.1 Exerter Publications, New York.
- Vilela CR (1992) On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revta Bras Entomol* 36:197-221
- Wilder JA, Diaz T, O'Neill RJW, Kenney J, Hollocher H (2002) Characterization and isolation of novel microsatellites from the *Drosophila dunnii* subgroup. *Genet Res* 80:177-185
- Yotoko KSC, Medeiros HF, Solferini VN, Klaczko LB (2003) A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the tripunctata radiation. *Mol Phylogenet Evol* 28:614-619

CAPÍTULO III

“A molecular linkage map for *Drosophila mediopunctata* confirms synteny with *D. melanogaster* and suggests a region that controls the variation in the number of abdominal spots”

Prianda R. Laborda
Rodrigo Gazaffi
A. Augusto F. Garcia
Anete P. de Souza

Original article

A molecular linkage map for *Drosophila mediopunctata* confirms synteny with *D. melanogaster* and suggests a region that controls the variation in the number of abdominal spots

Prianda R. Laborda¹, Rodrigo Gazaffi², A. Augusto F. Garcia² and Anete P. de Souza^{1*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) and Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

²Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brazil

*Corresponding author

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, CEP 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

E-mail anete@unicamp.br

Phone 55-19-35211132

FAX 55-19-35211089

ABSTRACT

The classical approach to gene discovery relies on the construction of linkage maps. We report the first molecular-based linkage map for *Drosophila mediopunctata*, which is a Neotropical species of the *tripunctata* group. Eight hundred F₂ individuals were genotyped at 49 microsatellite loci, resulting in a map that is ~450 cM long. Five linkage groups were detected, and the species' chromosomes were identified through cross-references to BLASTn searches and Müller elements. Strong synteny was observed when compared with the *D. melanogaster* chromosome arms but little conservation in the gene order was seen. The incorporation of morphological data corresponding to the number of central abdominal spots on the map was consistent with the expected location of genomic regions responsible for the phenotype on the second chromosome.

KEYWORDS

Drosophila mediopunctata, microsatellite markers, linkage mapping, synteny, number of abdominal spots, pigmentation

INTRODUCTION

The availability of extensive sequence data that has been provided by various genome projects in recent years makes the discovery of gene positions a matter of bioinformatics and cross-referencing data. Nevertheless, the discovery of gene locations has been a central issue in genetics since its beginning, and the classic methods of pursuing this objective rely on the construction of linkage maps. In spite of technological advancements, the use of traditional strategies for localizing and ordering genomic regions is still an elegant and efficient way to begin exploring genomes that have not yet been targeted by large-scale sequencing efforts.

Our model of interest is *Drosophila mediopunctata* (Dobzhansky & Pavan, 1943), which is a Neotropical forest-dwelling fly of the *tripunctata* group (Frota-Pessoa, 1954). Studies concerning the natural variation, the sex ratio phenomenon, and *P* element transfers have demonstrated different facets of the *D. mediopunctata* biology (for a review, see Klaczko, 2006). Its genome ($2n=12$) has five pairs of acrocentric chromosomes and a pair of dots (Kastritsis, 1966), and cytological maps that were developed on the basis of polytene chromosome banding show a high variability in the number of inversions in this species (Kastritsis, 1966; Ananina *et al.*, 2002). An interesting question in *D. mediopunctata* is the genetic basis of the variation in the central abdominal spots after which the species was named. Phenotypes may vary from zero to three spots. Hatadani *et al.* (2004) showed the influence of the second chromosome on abdominal color and identified the inversions that might be responsible for it. The identification of the genes responsible for this phenotype could shed light on the adaptation process of this species.

The construction of linkage maps is the first step towards gene mapping in a molecular manner and provides insights into the genomic organization. Despite substantial progress in the study of *D. mediopunctata*, molecular landmarks within its genome are still not available because, thus far, studies have only provided a chromosomal level of resolution. The availability of a genetic map based on molecular markers will provide new genomic parameters and increase the ability to approach the loci associated with phenotypes of interest.

The objective of this study is to construct the first molecular linkage map for *D. mediopunctata* to supply genomic references for this species and encourage the discovery of genes associated with its evolution. We also aim to use the morphological data obtained from the mapping population to estimate the location of regions that might be associated with the abdominal spot phenotype. Our laboratory recently developed more than 100 microsatellite markers, which are also known as simple sequence repeats (SSRs), for *D. mediopunctata* (Laborda *et al.*, 2009), and, in this study, we use these markers to genotype an F₂ mapping population.

RESULTS

The microsatellite-based genetic map of *D. mediopunctata* showed five linkage groups (LGs) with a total size of 453.8 centimorgans (cM) and a density of 1 SSR/9.5 cM (Fig. 1). Of the 134 microsatellites available for this species, 81 showed polymorphism among the strains selected for the crosses, and 49 showed a suitable profile for mapping. All 49 genotyped markers were linked to the map, with the exception of Dmed^{UNICAMP}_ssr005, which will be discussed later. The distribution of the mapped markers appears to be random throughout the map's length.

The LGs showed sizes that varied from 124.1 cM (LG1) to 59.4 cM (LG5), and the number of markers in each LG was between 13 (LG3) to 7 (LG4). The largest gap observed was 35.7 cM (LG2), and the smallest gap was 1.2 cM (LG5). Two markers (Dmed^{UNICAMP}_ssr087 and Dmed^{UNICAMP}_ssr088) flanked the minor gap; these markers were isolated from the same DNA library clone, which provided prior information regarding their linkage. As expected, they were localized next to each other in the recombination map with little mapping distance between them. This was also observed for the marker pair Dmed^{UNICAMP}_ssr030 and Dmed^{UNICAMP}_ssr031 (LG3) as well as Dmed^{UNICAMP}_ssr119 and Dmed^{UNICAMP}_ssr120 (LG4).

The five LGs revealed during the construction of the linkage map were expected because five major chromosomes comprise the *D. mediopunctata* genome. To identify the LG that corresponds to each chromosome, we performed a BLASTn search against the *D.*

melanogaster genome using the genomic library DNA sequences from which the mapped microsatellites were isolated. Although 33% of the BLASTn searches showed no significant similarities in the DNA sequences, all of the linked microsatellites were associated with the same chromosome arm of *D. melanogaster* (Table 1). For example, the DNA sequences of Dmed^{UNICAMP}_ssr002, Dmed^{UNICAMP}_ssr010, Dmed^{UNICAMP}_ssr024, Dmed^{UNICAMP}_ssr086 and Dmed^{UNICAMP}_ssr113 (LG2) showed significant similarity to the DNA sequences of the X chromosome of *D. melanogaster*, and the sequences of Dmed^{UNICAMP}_ssr051, Dmed^{UNICAMP}_ssr053, Dmed^{UNICAMP}_ssr098, Dmed^{UNICAMP}_ssr119 and Dmed^{UNICAMP}_ssr120 (LG4) showed significant similarity with the 2L chromosome arm. The marker, Dmed^{UNICAMP}_ssr005, was not linked to any of the LGs but showed similarity to the fourth chromosome of *D. melanogaster*, which indicates that this microsatellite is localized in the dot (sixth) chromosome of *D. mediopunctata*. Because the Müller elements were recently identified in *D. mediopunctata* (M. T. Brianti, PhD Thesis, unpublished data), it was possible to identify each of the five species chromosomes in the linkage map (Fig. 2). The X chromosome was 110 cM in length and contained nine markers; chromosome II was 95 cM in length (disregarding the phenotypic marker) and had 13 markers; chromosome III was 59 cM in length and had 10 markers; chromosome IV was 124 cM in length and contained nine markers, and chromosome V was 65 cM in length and contained seven markers.

The information provided in the BLASTn search was also used to check the order of the *D. mediopunctata* markers in relation to the markers in *D. melanogaster*. The physical localizations of the mapped loci in the *D. melanogaster* genome were compared to their genetic localizations on the *D. mediopunctata* map (Fig. 3). We observed little congruence in the positions of the microsatellites along the genomes of the two species for all of the Müller elements.

The phenotypic data, which were added to the linkage map to identify the region that might contain loci responsible for the abdominal spot phenotype, were ambiguously placed into three chromosomes: the sexual, the second and the fourth. Further mapping of this marker revealed that it is most likely localized to one extremity of chromosome II (Fig. 2).

DISCUSSION

The first linkage map constructed for *D. mediopunctata* successfully grouped 48 microsatellite markers and revealed an intermediate genome size of ~450 cM. The reference species, *D. melanogaster*, has a standard recombination map size of ~275 cM (Tweedie *et al.*, 2009). Other genetic maps based on microsatellites demonstrate variable genome length in the genus *Drosophila*, such as 260 cM for *D. mojavensis* (Staten *et al.*, 2004); 290 cM for a hybrid between *D. sechellia* and *D. simulans* (Macdonald & Goldstein, 1999); 450 cM, not including the X chromosome, for *D. virilis* (Hutunnen *et al.*, 2004) and 500 cM for *D. montana* (Schäfer *et al.*, 2010). An excess of markers in one or more LGs, which would indicate a difference in the amount of repetitive regions on the different chromosomes, was not observed, in contrast to the data for *D. mojavensis* (Staten *et al.*, 2004).

The arrangement of microsatellites along the map did not show any clear aggregation of markers, which would indicate a concentration of repetitive DNA in some regions of the genome. Feldmeyer *et al.* (2010) found that microsatellites were non-randomly distributed along the LGs in the housefly, *Musca domestica*, and another non-random distribution pattern was observed in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Stratikopoulos *et al.*, 2008). However, this was not the case for *D. mediopunctata*.

The markers were assembled into five LGs, as expected, and all of the markers were successfully linked to the map, which demonstrates the importance of using a large population size for mapping. Ferreira *et al.* (2006) predicted the influence of population size on the accuracy of linkage mapping. Small populations might result in fragmented LGs and in inversion of the order of some markers. Fragmented LGs have been observed in *D. mojavensis* (Staten *et al.*, 2004), *Anopheles funestus* (Wondji *et al.*, 2005) and *C. capitata* (Stratikopoulos *et al.*, 2008). These studies used mapping populations of 200, 174 and 175 individuals, respectively, which may have influenced the statistical analyses. In addition to the mapping method used, biological factors, such as non-random cross over rates and/or microsatellite distribution should also be considered when evaluating the quality of the linkage map.

The LGs contained regions with different recombination rates, if the assumption that the markers used in the mapping effort were randomly distributed throughout the genome is correct. Chromosome III, for example, showed little recombination between the markers because of its short length and more saturated profile. However, chromosome IV, which was the largest LG in the map, had the highest recombination rate among the genotyped loci. The X chromosome contained regions with both high and low recombination rates; this variation in recombination rates was also observed on chromosome II (LG3), which had 11 markers concentrated along 2/3 of its length and only two that fell within the remaining 1/3. Ananina *et al.* (2002) previously described the highly polymorphic nature of this chromosome with regard to polytene inversions. The 17 alleles there described encompass almost all of the chromosome's length, with the exception of the final three segments near the centromere. The organization of chromosome II seen in the linkage map therefore might reflect a low rate of recombination in the inverted regions, which might have resulted in the markers being located near each other in one region and also in a higher rate of recombination at one of its extremities, where only two markers were detected.

As expected, based on Müller's work (Müller, 1940), a notable synteny was observed between the chromosomes of *D. mediopunctata* and *D. melanogaster* in the BLASTn searches. No microsatellite locus was localized outside of the predicted homologous arm of the *D. melanogaster* genome. However, the order of the loci is not consistent in the two species, probably because of the numerous genome re-organization events, especially paracentric inversions, that probably occurred since the species diverged (Bhutkar *et al.*, 2008). Sturtevant & Novitski (1941) reported, "...in general, there is little similarity in the sequence of corresponding loci within each element, except when such closely related species as *melanogaster* and *simulans* are compared". Although we are comparing the linkage data of *D. mediopunctata* to the physical structure of *D. melanogaster* chromosomes and some ambiguity may be expected as a result, our data corroborate this statement because we are dealing with species from different subgenera (*Drosophila* x *Sophophora*). In addition, the lack of correspondence observed here is consistent with the observations seen in *D. virilis* and *D. mojavensis* (both from the subgenus *Drosophila*) when compared with the *D. melanogaster* genome (Bhutkar *et al.*,

2008). The *D. mediopunctata* loci that could not be identified in the *D. melanogaster* genome may therefore reveal chromosomal regions that were rearranged during evolution and lost their similarity to this reference genome.

The detection of an influence on the abdominal spot phenotype from chromosome II provides further evidence of this chromosome's importance in the pigmentation of this species. Chromosome II has been shown to have a major impact on the color polymorphism, and chromosome V has also been shown to affect this phenotype (Hatadani *et al.*, 2004). We detected an influence from chromosome IV and the sexual chromosome, in addition to chromosome II, because the LGs representing these chromosomes collapsed when the morphological data were added. This scenario may indicate that the second chromosome has a major effect on the phenotype, whereas minor effects may be attributable to other regions in the genome. Hatadani *et al.* (2004) also investigated the association of chromosome II inversions with this pigmentation pattern and demonstrated that PAo and PCo, which are proximal inversions, were associated with lighter and darker phenotypes, respectively. However, in our map, the phenotypic marker was localized to a chromosome extremity that likely corresponds to the distal region (BLASTn searches with the *Dmed*^{UNICAMP}_{_ssr014} and *Dmed*^{UNICAMP}_{_ssr078} loci suggest that they are localized near to the telomeric and centromeric ends, respectively). If the strong linkage disequilibrium between the proximal inversions and some distal inversions (Peixoto & Klaczko, 1991) is considered, and if we assume that the effects on phenotype are caused by distal inversions, then it is possible to relate our results to those observed by Hatadani *et al.* (2004). However, improvements in the use of this phenotypic data to enhance the precision of this analysis are needed.

We report here the first molecular-based genetic map for *D. mediopunctata* and a genomic region that might control the variation in the number of central abdominal spots. This effort is intended to establish genomic references for the species and to assist future investigations into a wide range of biological characteristics.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fly stocks

The strains used as the first generation for the mapping population were chosen on the basis of their microsatellite profile. Thirteen laboratory strains were previously genotyped at 134 loci (Laborda *et al.*, 2009). The most genetically divergent pair of strains that had the same karyotype for polytene chromosome inversions was used to maximize the number of markers that could be applied to the map. The ITC229ET (three spots phenotype) and ITC29I (zero spots phenotype) strains were selected.

Crosses

An F_2 -mapping design was chosen. Reciprocal crosses using 120 fly couples were conducted, and F_1 flies from both crosses were then intercrossed. Flies were raised at 16.5°C on culture medium that contained wheat flour, agar, milk powder, sugar and yeast. Approximately 3000 F_2 individuals were obtained, all of which were phenotyped for the number of abdominal spots (“0”, “1”, “2” or “3” spots were attributed to each individual). For the molecular analysis, 800 F_2 (400 females and 400 males) individuals were randomly selected.

Microsatellite genotyping

Genomic DNA from single F_2 flies was isolated using the salting-out method described by Aljanabi & Martinez (1997). Of the 134 markers available, 81 showed polymorphisms between the two parental strains, whose genetic profiles had already been established. Ninety F_2 individuals were initially genotyped at these 81 markers to evaluate whether their segregation pattern was appropriate for mapping. The 49 microsatellites that displayed the expected pattern (segregation of only two alleles) were then selected for genotyping of the entire population (Table 1). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in 96-well microplates using 20- μ L reactions containing 0.5 ng of genomic DNA, 1x PCR buffer, 1.5 mM magnesium chloride, 0.1 mM of each dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1 U of *Taq* DNA

polymerase. The thermocycler conditions for each of the selected loci are described in Laborda *et al.* (2009). The PCR products were resolved in 3% agarose gels stained with ethidium bromide or 6% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate, depending on the resolution required for the locus.

Linkage analysis

The map was constructed using the software OneMap (Margarido *et al.*, 2007), which uses multipoint technology based on Hidden Markov Models. The clustering of the markers used a minimum LOD score of 3.6 and a maximum recombination fraction of 0.4. To obtain the best order for each LG, the algorithms “compare” (LG1, LG2 and LG4), “order” and “ripple” (LG3 and LG5) were applied as presented in MAPMAKER/EXP (Lander *et al.*, 1987) and further studied by Mollinari *et al.* (2009). The phenotypic data were used as a 50th marker, and their association with other markers was based on two-point tests. The phenotypic data showed an association with LG1, LG2 and LG3, and the algorithm “try” was used to localize the phenotypic marker within each group. Genetic distances, in centimorgans, were obtained by means of the Kosambi mapping function (Kosambi, 1944). The LGs were drawn in MapChart (Voorrips, 2002).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for their financial support by means of a graduate fellowship received by PRL (2004/03385-1) and a research grant awarded to APS (2004/03203-0). The authors also thank Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko, for the parental fly strains and Gustavo M. Mori for helping during the phenotyping procedures.

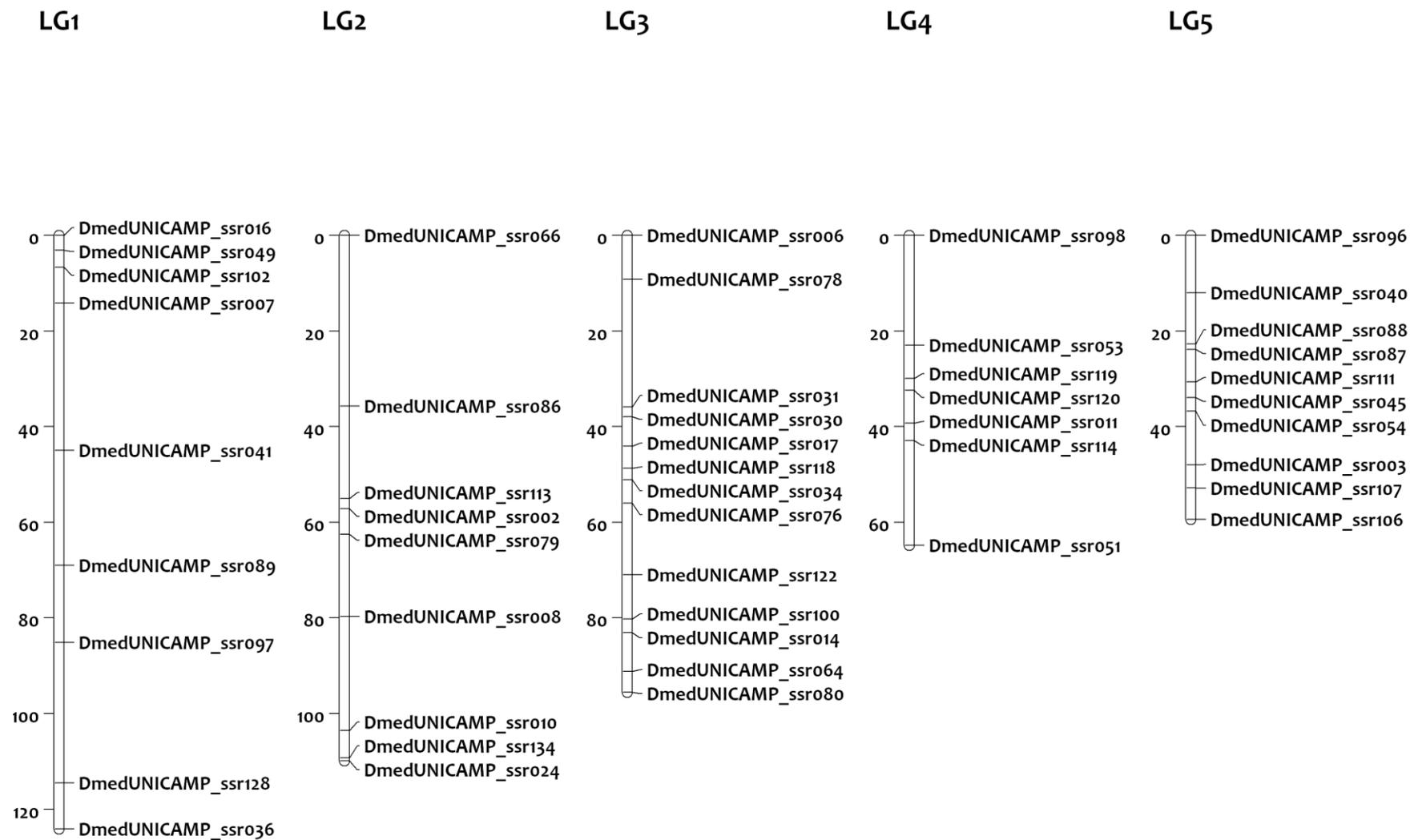


Figure 1. Linkage groups for *Drosophila mediopunctata*. Microsatellite loci are given on the right and distances (cM) are shown on the left.

Table 1. *Drosophila mediopunctata* (Dmed) mapped microsatellite loci, their localization and their synteny to *D. melanogaster* (Dmel) chromosome arms as detected in the BLASTn searches. E-value magnitudes are indicated. “NM” – non-mapped

Dmed locus	GenBank accession	Dmed linkage group (Dmel synteny)					
		1	2	3	4	5	NM
Dmed ^{UNICAMP} _ssr002	GQ344837		$\sqrt{(X)} 10^{-16}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr003	GQ344838					$\sqrt{(3L)} 10^{-11}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr005	GQ344840						$\sqrt{(4)}$
Dmed ^{UNICAMP} _ssr006	GQ344841			$\sqrt{}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr007	GQ344842	$\sqrt{}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr008	GQ344843		$\sqrt{}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr010	GQ344845		$\sqrt{(X)} 10^{-05}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr011	GQ344846				$\sqrt{}$		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr014	GQ344849			$\sqrt{(3R)} 10^{-32}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr016	GQ344851	$\sqrt{}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr017	GQ344852			$\sqrt{(3R)} 10^{-33}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr024	GQ344858		$\sqrt{(X)} 10^{-21}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr030	GQ344864			$\sqrt{}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr031	GQ344864			$\sqrt{}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr034	GQ344867			$\sqrt{(3R)} 10^{-11}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr036	GQ344869	$\sqrt{(2R)} 10^{-10}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr040	GQ344872					$\sqrt{(3L)} 10^{-08}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr041	GQ344873	$\sqrt{(2R)} 10^{-03}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr045	GQ344876					$\sqrt{(3L)} 10^{-25}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr049	GQ344879	$\sqrt{(2R)} 10^{-14}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr051	GQ344881				$\sqrt{(2L)} 10^{-09}$		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr053	GQ344883				$\sqrt{(2L)} 10^{-07}$		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr054	GQ344884					$\sqrt{}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr064	GQ344891			$\sqrt{}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr066	GQ344893		$\sqrt{}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr076	GQ344901			$\sqrt{(3R)} 10^{-02}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr078	GQ344903			$\sqrt{(3R)} 10^{-14}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr079	GQ344904		$\sqrt{}$				

Dmed locus	GenBank accession	Dmed linkage group (Dmel synteny)					
		1	2	3	4	5	NM
Dmed ^{UNICAMP} _ssr080	GQ344905			√			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr086	GQ344911		$\sqrt{(X)} 10^{-11}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr087	GQ344912					$\sqrt{(3L)} 10^{-03}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr088	GQ344912					$\sqrt{(3L)} 10^{-03}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr089	GQ344913	√					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr096	GQ344919					$\sqrt{(3L)} 10^{-05}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr097	GQ344920	$\sqrt{(2R)} 10^{-50}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr098	GQ344921				$\sqrt{(2L)} 10^{-09}$		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr100	GQ344923			√			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr102	GQ344925	$\sqrt{(2R)} 10^{-21}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr106	GQ344929					$\sqrt{(3L)} 10^{-02}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr107	GQ344930					$\sqrt{(3L)} 10^{-13}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr111	GQ344934					$\sqrt{(3L)} 10^{-02}$	
Dmed ^{UNICAMP} _ssr113	GQ344936		$\sqrt{(X)} 10^{-10}$				
Dmed ^{UNICAMP} _ssr114	GQ344937				√		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr118	GQ344941			$\sqrt{(3R)} 10^{-18}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr119	GQ344942				$\sqrt{(2L)} 10^{-20}$		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr120	GQ344942				$\sqrt{(2L)} 10^{-20}$		
Dmed ^{UNICAMP} _ssr122	GQ344944			$\sqrt{(3R)} 10^{-20}$			
Dmed ^{UNICAMP} _ssr128	GQ344948	$\sqrt{(2R)} 10^{-09}$					
Dmed ^{UNICAMP} _ssr134	GQ344952		√				

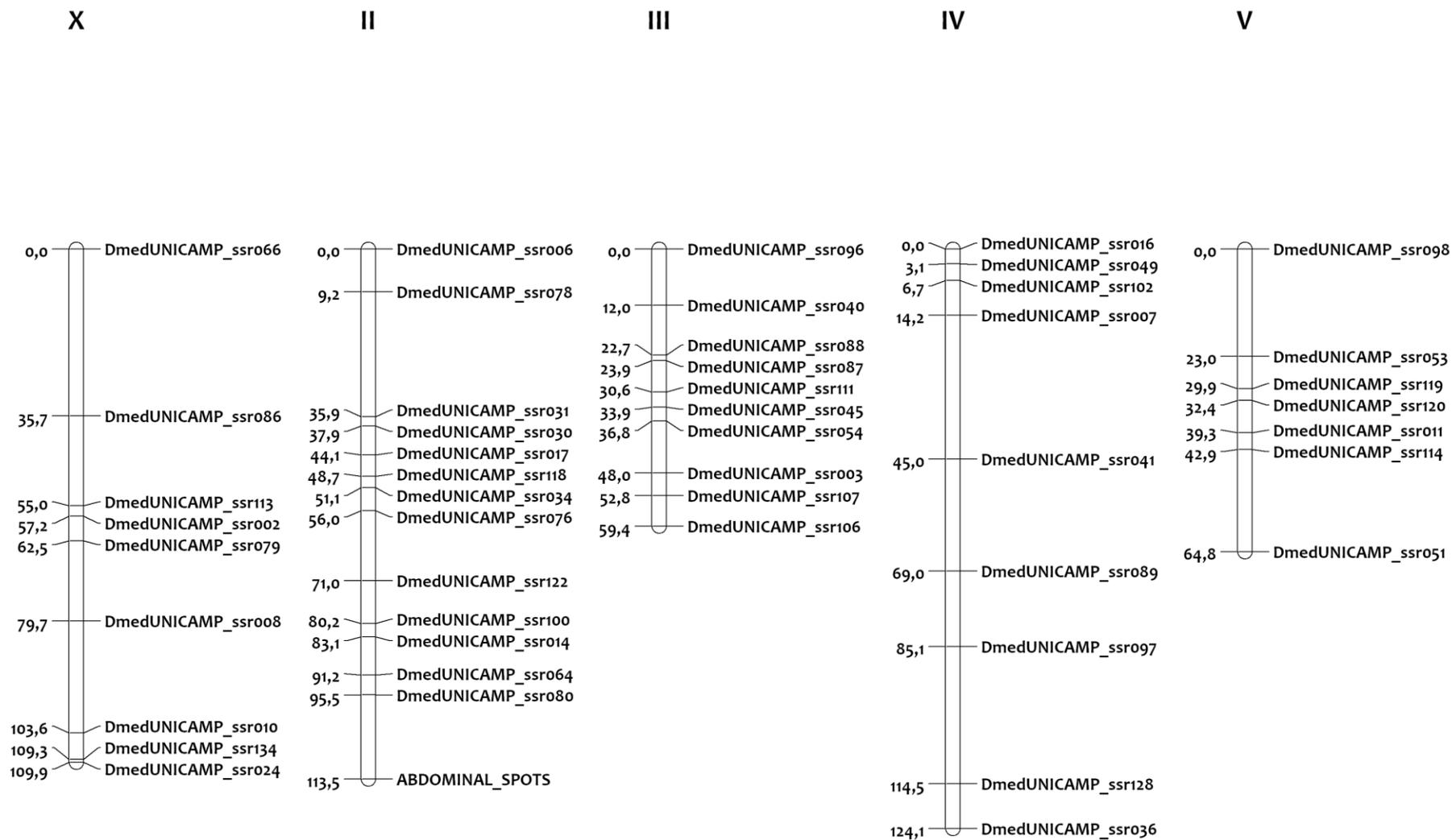


Figure 2. A detailed recombination map for *Drosophila mediopunctata* that shows the identification of the species chromosomes and a putative region that might control the abdominal spot number phenotype.

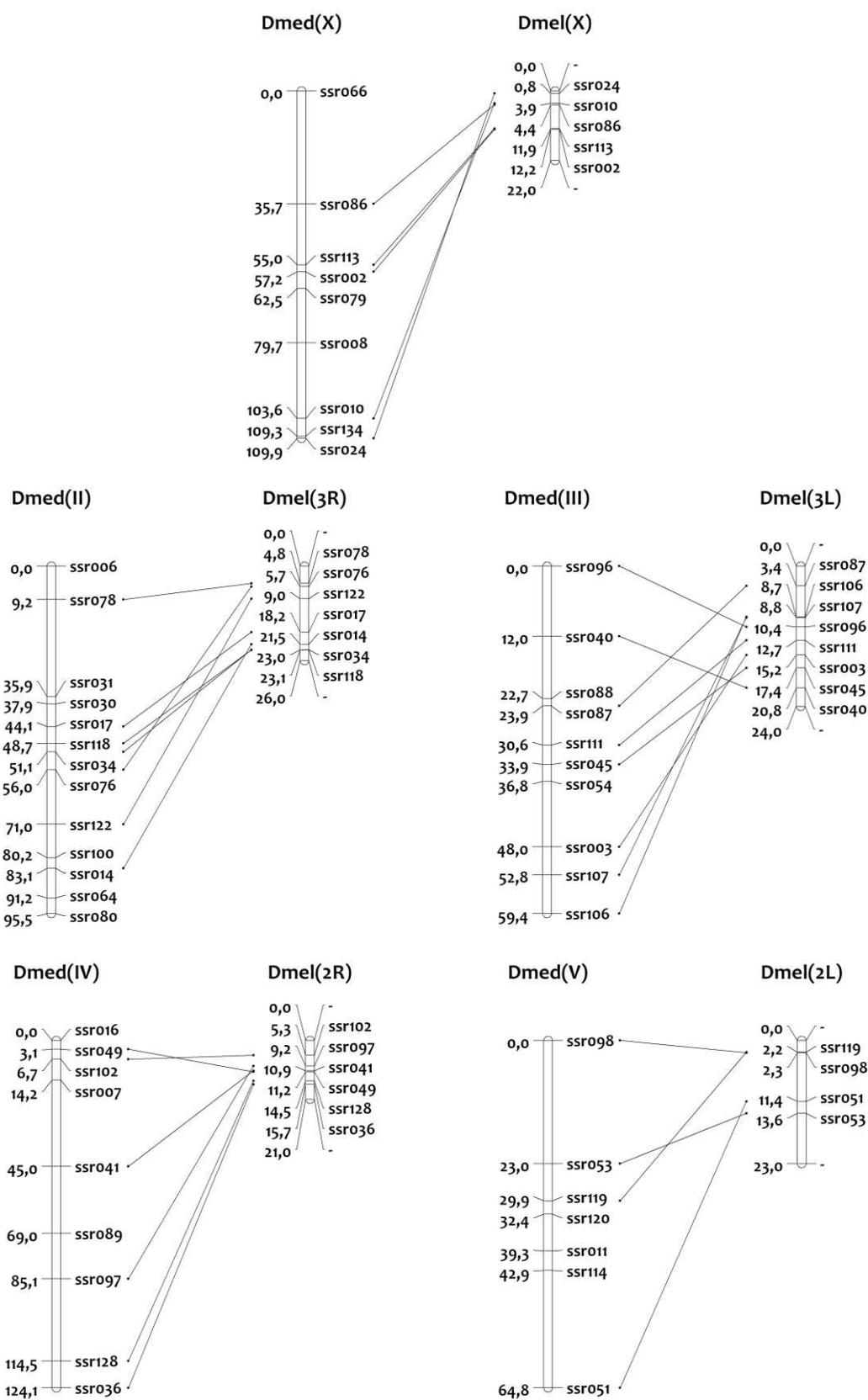


Figure 3. Comparative order of the *Drosophila mediopunctata* microsatellite loci in the two genomes. On the left side of each chart, the *D. mediopunctata* chromosomes in cM are presented, and, on the right side of each chart, the *D. melanogaster* chromosomes in Mb are given.

REFERENCES

- Aljanabi, S.M. and Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* **25**: 4692-4693.
- Ananina, G., Peixoto, A.A., Souza, W.N., da Silva, L.B. and Klaczko, L.B. (2002) Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**: 691-694.
- Bhutkar, A., Schaeffer, S.W., Russo, S.M., Xu, M., Smith, T.F. and Gelbart, W.M. (2008) Chromosome rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. *Genetics* **179**: 1657-1680.
- Dobzhansky, T. and Pavan, C. (1943) Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bol Facul Fil Cien Let Univ S Paulo* n36 Biologia Geral n4.
- Feldmeyer, B., Pen, I. and Beukeboom, L.W. (2010) A microsatellite marker linkage map of the housefly, *Musca domestica*: evidence for male recombination. *Insect Mol Biol* **19**: 575-581.
- Ferreira, A., da Silva, M.F, Silva, L.C. and Cruz, C.D. (2006) Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet Mol Biol* **29**: 187-192.
- Frota-Pessoa, O. (1954) Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arq Mus Para* **10**: 253-304.
- Hatadani, L.M., Baptista, J.C.R, Souza, W.N. and Klaczko, L.B. (2004) Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* **93**: 525-534.
- Huttunen, S., Aspi, J., Hoikkala, A. and Schlötterer, C. (2004) QTL analysis of variation in male courtship song in *Drosophila virilis*. *Heredity* **92**: 263-269.
- Kastritsis, C.D. (1966) Cytological Studies of Some Species of the *tripunctata* Group of *Drosophila*. Univ Texas Publs, Texas, p. 413-474.
- Klaczko, L.B. (2006) Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* **126**: 43-55.
- Kosambi, D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* **12**: 172-175.

-
- Laborda, P.R., Mori, G.M. and Souza, A.P. (2009) *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. *Conserv Genet Res* **1**: 297-307.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. and Newburg, L. (1987) MAPMAKER: an interactive computing package for constructing primary genetic linkages of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-181.
- Macdonald, S.J. and Goldstein, D.B. (1999) A quantitative genetic analysis of male sexual traits distinguishing the sibling species *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. *Genetics* **153**: 1683-1699.
- Margarido, G.R.A, Souza, A.P. and Garcia, A.A.F. (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* **144**: 78-79.
- Mollinari, M., Margarido, G.R., Vencovsky, R. and Garcia, A.A.F. (2009) Evaluation of algorithms used to order markers on genetic maps. *Heredity* **103**: 494-502.
- Müller, H.J. (1940) Bearings of the 'Drosophila' work on systematics, pp. 185-268 in *The New Systematics*, edited by J. Huxley. Clarendon Press, Oxford.
- Peixoto, A.A. and Klaczko, L.B. (1991) Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. *Genetics* **129**: 773-777.
- Schäfer, M.A., Mazzi, D., Klappert, K., Kauranen, H., Vieira, J., Hoikkala, A., Ritchie, M.G. and Schlötterer, C. (2010) A microsatellite linkage map for *Drosophila montana* shows large variation in recombination rates, and a courtship song trait maps to an area of low recombination. *J Evol Biol* **23**: 518-527.
- Staten, R., Schully, S.D. and Noor, M.A.F. (2004) A microsatellite linkage map of *Drosophila mojavensis*. *BMC Genet* **5**: 12-19.
- Stratikopoulos, E.E., Augustinos, A.A., Petalas, Y.G., Vrahatis, M.N., Mintzas, A., Mathiopoulos, K.D. and Zacharopoulou, A. (2008) An integrated genetic and cytogenetic map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, based on microsatellite and morphological markers. *Genetica* **133**: 147-157.
- Sturtevant, A.H. and Novitski, E. (1941) The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* **26**: 517-541.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G.,

Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, H. and The FlyBase Consortium. (2009) FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res* **37**: D555-D559.

Voorrips, R.E. (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* **93**: 77–78.

Wondji, C.S., Hunt, R.H., Pignatelli, P., Steen, K., Coetzee, M., Besansky, N., Lobo, N., Collins, F.H., Hemingway, J. and Ranson, H. (2005) An integrated genetic and physical map for the malaria vector *Anopheles funestus*. *Genetics* **171**: 1779–1787.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

Nosso projeto foi concebido com o objetivo de fornecer para *Drosophila mediopunctata* instrumental molecular que pudesse refinar e facilitar a investigação da espécie. Dentro da tradição de nosso laboratório de (1) utilizar marcadores moleculares para examinar diferentes espécies e (2) construir mapas genéticos com a intenção de localizar regiões associadas a fenótipos de interesse biológico, propusemos o desenvolvimento de marcadores microssatélites e o mapeamento destes para *D. mediopunctata*. Acreditamos que esta deveria ser a primeira iniciativa rumo a uma fase de estudos sobre a espécie com a perspectiva molecular.

Os marcadores microssatélites tornaram-se muito populares na Genética devido a características como herança mendeliana codominante, multialelismo e distribuição ampla pelo genoma. Esse perfil possibilita o uso desses locos em estudos com diferentes objetivos. Estrutura e dinâmica de populações, diversidade genética, mapeamento de QTLs, parentesco e história evolutiva das espécies são exemplos de áreas que avançaram com o auxílio das informações provenientes desse tipo de marcador genético. Portanto, dado que o conhecimento destes locos amplia as abordagens que podem ser aplicadas na investigação da espécie de interesse, essa classe de marcador foi a escolhida para *D. mediopunctata*.

Como previamente mencionado, o desenvolvimento de microssatélites para espécies sem genoma seqüenciado requer a construção de bibliotecas genômicas. Nós adotamos a estratégia de enriquecimento de biblioteca por sondas repetitivas, descrita em Billotte *et al.* (1999) e apresentada ao nosso laboratório pelo professor Angie-Marie Risterucci, do CIRAD-FR, em 2002. Para *D. mediopunctata* foi construída uma biblioteca com aproximadamente 2000 clones dos quais 800 foram duplamente seqüenciados. A etapa de alinhamento e edição das sequências foi longa e trabalhosa, pois foi feita de forma individual e com a ajuda de três diferentes *softwares*. Na identificação dos microssatélites, optamos pelo uso de sequências perfeitas (sem interrupções) e com número mínimo de sete repetições, em vez de cinco, haja vista que muitos locos foram encontrados e acreditávamos que o tamanho da região repetitiva pudesse estar relacionado ao nível de

polimorfismo. Foram encontrados mais de 600 locos com esse perfil em 480 clones, o que indicou cerca de 50% de clones positivos. A densidade de microssatélites na biblioteca foi de 95 a cada 100 Kb ou 71 dinucleotídeos a cada 100 Kb. Com exceção dos trabalhos de Ross *et al.* (2003), Schug *et al.* (2004) com *D. ananassae* e Unckless *et al.* (2008) com *D. innubila*, as demais iniciativas de desenvolvimento desse marcador dentro do gênero *Drosophila* utilizaram bibliotecas não enriquecidas e mostraram resultados menos promissores: para *D. dunni*, foram observados 13% de clones positivos (Wilder *et al.* 2002); para *D. melanogaster*, apenas 1,3% dos clones continha microssatélites e menos de dois dinucleotídeos foram encontrados a cada 100 Kb (Schug *et al.* 1998a); para *D. montana*, apenas 1% dos clones foi positivo (Orsini e Schlötterer 2004); para *D. subobscura*, apenas 2% dos clones eram positivos e cinco dinucleotídeos foram encontrados a cada 100 Kb (Pascual *et al.* 2000); para *D. virilis*, detectou-se 3% de clones positivos e quatro microssatélites a cada 100 Kb (Schlötterer e Harr 2000). O microssatélite Dmed^{UNICAMP}_ssr005, único não ligado ao mapa e cuja similaridade via BLASTn com o cromossomo 4 de *D. melanogaster* indica estar localizado no cromossomo VI de *D. mediopunctata* mostra que a biblioteca enriquecida foi eficaz também na amostragem do cromossomo pontual da espécie. A porcentagem de dinucleotídeos em relação ao total de microssatélites (75%) assim como o motivo mais frequentemente encontrado (73% de AC/GT) corroboraram dados da literatura (Schug *et al.* 1998a; Katti *et al.* 2001; Tóth *et al.* 2000). Como a biblioteca de *D. mediopunctata* foi construída com base em apenas duas sondas de dinucleotídeos [(GT)_n e (CT)_n] pode ter sido gerado um viés nas proporções dos diferentes motivos. De fato, a biblioteca de *D. mediopunctata* revelou um único AT/TA, segunda maior classe vista para o genoma de *D. melanogaster* (Schug *et al.* 1998a; Bachtrog *et al.* 1999). Simultaneamente, mais de 25% de AG/CT, motivo alvo do enriquecimento, foi detectado. Com relação ao número de repetições, observamos que os marcadores de *D. mediopunctata* são menores do que alguns reportados para outras espécies de *Drosophila* e para outros animais. A média entre os dinucleotídeos foi de 8,7 repetições; em *D. ananassae* observou-se 8,09 (Schug *et al.* 2004), em *D. arizonae*, 9,05 (Ross *et al.* 2003), em *D. dunni*, 8,6 (Wilder *et al.* 2002), em *D. melanogaster*, 10,1 (Schug *et al.* 1998a), em *D. mojavensis*, 8,86 (Ross *et al.* 2003), em *D. montana*, 9,95 (Orsini e Schlötterer 2004), em *D. neotestacea*, 8,13 (Ross *et al.* 2003), em *D.*

pachea, 9,8 (Ross et al. 2003), em *D. pseudoobscura*, 11,7 (Noor et al. 2000), em *D. recens*, 7,55 (Ross et al. 2003), em *D. simulans*, 10,05 (Hutter et al. 1998), em *D. subobscura*, 14,9 (Pascual et al. 2000) e em *D. virilis*, 12,7 (Schlötterer e Harr 2000). Alguns desses trabalhos usaram poucos locos e outros apenas aqueles com maior número de repetições, o que pode ter influenciado as médias obtidas. Fora do gênero, observaram-se tamanhos que variam de treze repetições em humanos (Stallings et al. 1991) a mais de 25 em peixes (Brooker et al. 1994). Portanto, nota-se que *D. mediopunctata* tem como característica microssatélites de tamanho reduzido, principalmente se comparada a organismos fora do seu gênero. A baixa taxa de mutação, característica dos microssatélites de *Drosophila* (Schug et al. 1997; Schug et al. 1998b; Schlötterer et al. 1998), e as restrições à manutenção de longos arranjos nas populações (Harr e Schlötterer 2000) podem justificar a menor extensão dessas regiões nesse grupo de moscas. Ainda sobre o tamanho dos microssatélites, agora com foco na diferença entre os motivos AC/GT e AG/CT, nosso trabalho obteve resultados contrastantes aos de Bachtrog et al. (1999). Os locos AG/CT, apesar de menos freqüentes, apresentaram média de número de repetições maior (9,9 repetições) do que a vista para AC/GT (8,2 repetições) ($P \lll 0,01$; dados não mostrados em Laborda et al. 2009a).

Após a caracterização da biblioteca, iniciamos a caracterização dos locos microssatélites propriamente ditos. Os bons resultados que já havíamos obtido com o programa *touchdown* (Don et al. 1991) para outras espécies nos levou a adotá-lo como estratégia inicial para determinar as condições de amplificação. Poucos locos não exibiram o padrão desejado, o que acelerou a etapa de caracterização. A detecção de polimorfismo, muitas vezes limitante em estudos com marcadores moleculares, também não representou um entrave. Apesar de termos utilizado apenas treze linhagens de laboratório nesta etapa, poucos locos mostraram-se monomórficos. A leitura dos géis seguiu um padrão conservativo: bandas com baixa intensidade não foram lidas e, no caso de grande proximidade entre dois alelos, eles foram considerados um só. Em adição, não foram feitas estimativas do tamanho (em pares de bases) de cada alelo. Portanto, o número de alelos observado pode ser uma subestimativa para alguns locos. A ausência de informações sobre tamanho dos alelos impossibilitou a detecção de alelos nulos. As correlações significativas

entre número de alelos e número de repetições corroboram alguns trabalhos que defendem que a variabilidade é dependente do tamanho do microsatélite (Goldstein e Clark 1995; Harr e Schlötterer 2000; Bachmann *et al.* 2004). Todavia, o cálculo dessas correlações com dados de variabilidade em populações naturais pode trazer informações mais precisas e comparáveis aos da literatura.

A avaliação dos microsatélites desenvolvidos para *D. mediopunctata* em outras espécies do gênero não fazia parte de nossos objetivos iniciais, entretanto, devido à disponibilidade de várias espécies no laboratório, optamos por verificar o alcance heterólogo desses marcadores. Um *bulk* de dez indivíduos de cada espécie foi usado nas amplificações com a intenção de estimarmos simultaneamente a qualidade dos produtos de amplificação e o polimorfismo. Todavia, optamos por não prosseguir com as estimativas de polimorfismo devido à possibilidade de confusão entre os perfis com mais de uma banda: houve dificuldade em avaliar se a presença de mais de uma banda era fruto de amplificação inespecífica ou polimorfismo propriamente dito. Portanto, mais uma vez decidimos adotar uma leitura conservativa. Alguns trabalhos desprezaram bons resultados em experimentos com microsatélites não específicos, porém apenas entre espécies do mesmo grupo (p. ex. Colson *et al.* 1999; Noor *et al.* 2000; Wilder *et al.* 2002; Schug *et al.* 2004; Moraes e Sene 2007). Em contraponto, Unckless *et al.* (2008) mostrou baixo poder de amplificação em *D. falleni*, mais próxima espécie de *D. innubila*, para que foram desenvolvidos os microsatélites. Nossos resultados foram surpreendentes porque mostraram níveis de amplificação fora do grupo *tripunctata* comparáveis ao observado dentro do grupo (média_{tripunctata} = 67,69, média_{fora_tripunctata} = 62,23, $P = 0,1157$). Níveis de amplificação entre os subgêneros também não evidenciaram diferença significativa (média_{Drosophila} = 65,79, média_{fora_Drosophila} = 59,83, $P = 0,1079$; dados não mostrados em Laborda *et al.* 2009b). De forma geral, a comparação com os resultados reportados na literatura deve ser feita com cautela, haja vista que podemos esperar comportamento diferencial dos locos em condições heterólogas. Relações filogenéticas de diferentes amplitudes entre diferentes espécies e características inerentes aos locos, como níveis de variabilidade ou localização genômica, são fatores que podem interferir no seu uso fora da

espécie alvo. O uso de genótipos de forma individualizada (e não em *bulk*) e a obtenção de frequências alélicas em nível populacional (e não apenas de dados de presença/ausência) para cada uma das espécies permitirá uma avaliação mais precisa sobre o alcance dos locos de *D. mediopunctata*. Poderá também fornecer informações sobre o viés de amostragem (*ascertainment bias*; Ellegren *et al.* 1995) esperado neste tipo de experimento.

A utilização da matriz binária de dados de amplificação heteróloga para investigar as relações interespecíficas foi despretensiosa. A literatura havia registrado dois exemplos bem-sucedidos de reconstrução filogenética em *Drosophila* a partir de microssatélites (Harr *et al.* 1998b; Orsini *et al.* 2004). Decidimos então verificar se nossos dados poderiam de alguma maneira aproximar os resultados anteriormente reportados para o grupo *tripunctata*. A nossa estratégia certamente diferiu daquelas empregadas nos trabalhos supracitados, uma vez que a informação biológica de que dispúnhamos não era de fonte alélica. Os nossos dados de polimorfismo retrataram variação nas regiões flangeadoras, pois foram obtidos da avaliação da presença ou ausência de amplificação. Desta forma, exibiram de maneira indireta as diferenças no nível de sequência entre as espécies. Em adição, amostraram o genoma de maneira mais ampla, pois mais de uma centena de locos foi usada. O agrupamento das espécies do grupo *tripunctata* (Figura 1, Capítulo II) revelou algumas relações previamente detectadas (Yotoko *et al.* 2003; Robe *et al.* 2005; Hatadani *et al.* 2009). Isto era esperado pelo menos para as espécies (possivelmente) mais aparentadas, haja vista que os tempos de divergência são menores e a conservação entre as seqüências deve ser maior. De maneira geral, dúvida sobre as reais relações filogenéticas no grupo *tripunctata* persiste na literatura e o fato de diferentes conjuntos de espécies serem usados também dificulta comparações entre os trabalhos. Acreditamos que dados de frequências alélicas obtidos com os microssatélites de *D. mediopunctata* aliados ao desenvolvimento de medidas de distâncias ajustadas ao modo de evolução destes marcadores (discutido em Harr *et al.* 1998b e Schlötterer 2001) podem contribuir para a elucidação deste cenário.

Sobre o mapa de ligação, os aspectos mais específicos que desejamos abordar estão quase todos no Capítulo III. Dado o formato do artigo, pudemos explorar melhor os

resultados e as idéias, diferentemente dos Capítulos I e II, onde as limitações de espaço impostas pelo periódico impossibilitaram a incorporação de todas as nossas impressões. Todavia gostaríamos de rever alguns detalhes operacionais desta fase do projeto.

Ao contrário do geralmente visto em trabalhos de mapeamento, a construção da população foi feita em função dos marcadores que nela seriam mapeados. Antes de iniciarmos os cruzamentos, analisamos o perfil molecular entre as estirpes de modo a escolher um par que exibisse maior número de locos polimórficos. A escolha das estirpes também foi guiada pelos seus caritótipos, uma vez que não seria possível obter recombinantes de um cruzamento entre linhagens com diferentes inversões cromossômicas. As estirpes selecionadas apresentam diferentes perfis genéticos. ITC229ET é uma linhagem padrão homocariotípica, obtida em meados da década de 1980 (Peixoto 1989), com fenótipo “três pintas”, e ITC29I é uma linhagem que foi endocruzada por vinte gerações (Hatadani *et al.* 2004), com fenótipo “zero pinta”. O endocruzamento a que ITC29I foi imposta ocasionou pequeno número de heterozigotos (apenas quatro) enquanto ITC229ET, por sua vez, apresentou 25 locos em heterozigose entre os 134. Os perfis genéticos das estirpes, principalmente o de ITC229ET, que não apresenta grande parte do genoma em condição de homozigose, poderiam dificultar o mapeamento devido à segregação de mais de dois alelos na população. Por isso decidiu-se utilizar apenas aqueles locos que fossem homozigotos, além, é claro, de apresentarem polimorfismo entre as duas estirpes. A obtenção da população de mapeamento durou cinco meses, desde a separação das fêmeas virgens para o cruzamento inicial até a fenotipagem da moscas F_2 . Nossa intenção inicial era utilizar para o mapeamento 100 marcadores e apenas 200 indivíduos. Todavia, o desenvolvimento de marcadores, que estava sendo feito de forma paralela, indicava que não estaria disponível um grande número de locos. Então decidimos aumentar o tamanho da população F_2 que seria usado para a fase de genotipagem como medida de compensação pelo número menor de microssatélites que seriam usados. Foram obtidos e fenotipados aproximadamente 3000 indivíduos F_2 , dos quais, por questões operacionais, foram utilizados 800 (400 fêmeas e 400 machos) para as análises moleculares. A redução no número de marcadores aplicáveis ao mapeamento foi ocasionada por diferentes motivos: (1) ausência do padrão homozigoto em uma ou nas duas estirpes, (2) ausência de

polimorfismo entre elas, (3) baixa qualidade de leitura dos géis e (4) padrão de segregação diferente de esperado.

Suplantadas estas questões, procedemos a genotipagem da população e construímos o primeiro mapa de ligação para *D. mediopunctata*. Em uma primeira análise, onde utilizamos apenas 33 marcadores, já foi possível detectar os cinco grupos de ligação esperados. Posteriormente, incluímos os demais dados e confirmou-se o mapa anteriormente construído. Creditamos ao tamanho de nossa população de mapeamento o sucesso na obtenção de um mapa de recombinação com número de grupos de ligação equivalente ao número de cromossomos da espécie. A incorporação de todos os marcadores ao mapa também foi facilitada pelo número de recombinantes que em nosso trabalho certamente foi superior. O mapa gerou novas informações sobre o genoma de *D. mediopunctata*: extensão de moderada a grande, se comparada a outras espécies de *Drosophila*, com os cromossomos X e IV sendo os maiores (Figura 2, Capítulo III). O mapa trouxe ainda a possibilidade de avaliação da sintenia com os cromossomos de *D. melanogaster* (Tabela 1, Capítulo III). Nossos resultados corroboraram a sintenia existente no gênero *Drosophila* (Muller 1940; Schaeffer *et al.* 2008) e também trouxeram indícios sobre a falta de conservação da ordem dos locos entre as duas espécies (Figura 3, Capítulo III). Esta última observação foi feita com base em pequeno número de locos e na ausência de dados de localização física para os marcadores de *D. mediopunctata*. Informações provenientes de hibridizações *in situ*, como os vistos nos recentes estudos de Santos *et al.* (2010) e Cuadrado e Jouve (2011), poderão aumentar a precisão dos resultados sobre ordenação de regiões ao longo dos cromossomos. Com relação à característica “número de pintas abdominais”, apesar de o mapeamento ter localizado uma possível região no cromossomo II, ainda é necessário refinar a análise para obtermos com mais precisão as regiões que estão regendo o caráter. Nossa análise utilizou os dados morfológicos como um marcador genético, com genótipos semelhantes aos dos marcadores moleculares. Os indivíduos com fenótipos “uma pinta” e “duas pintas” foram agrupados e foram incorporados à análise como heterozigotos. Esta estratégia impõe grande perda de informação e não é a mais apropriada para o mapeamento de características morfológicas. Todavia, este estudo exploratório corroborou os dados de Hatadani *et al.* (2004) para

influência preponderante do cromossomo II neste cenário.

Pretendemos continuar a interpretação dos dados e é nosso objetivo preparar um quarto trabalho. Nele exploraremos o mapeamento mais refinado da característica “número de pintas abdominais” e as diferenças entre os mapas obtidos separadamente para machos e fêmeas (dados não apresentados aqui). Apesar da continuidade de nossas análises, acreditamos que foi possível contribuir para o avanço do conhecimento de *D. mediopunctata* e esperamos que as informações geradas por este trabalho possam fomentar novas iniciativas.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

De forma geral, foi possível conhecer uma parte do genoma de *D. mediopunctata*, pela observação das características dos marcadores microssatélites e do mapa de ligação construído. Os marcadores e o mapa forneceram simultaneamente informações previamente desconhecidas para a espécie e ferramental para novas abordagens de investigação.

O trabalho identificou mais 600 microssatélites, disponibilizou mais de uma centena de marcadores para *D. mediopunctata* e as características dos locos isolados corroboram dados da literatura dentro do gênero *Drosophila*: os locos microssatélites têm tamanho reduzido (poucas repetições), há preponderância de dinucleotídeos e o motivo mais freqüente é AC/GT.

Os níveis de amplificação heteróloga foram altos e, em média, não mostraram alcance diferencial entre as espécies do grupo *tripunctata* e as espécies de outros grupos; os microssatélites de *D. mediopunctata* são potenciais marcadores para investigação de espécies aparentadas e da relação entre elas.

A construção do mapa genético demonstrou a existência de cinco grupos de ligação e tamanho de genoma de médio a grande se comparado aqueles de espécies de *Drosophila* já estudadas; existe grande sintonia entre os cromossomos de *D. mediopunctata* e os de *D. melanogaster* e baixa conservação de ordem dos locos entre essas espécies.

O fenótipo “número de pintas abdominais” está associado ao cromossomo II porém não foi possível correlacionar a sua localização no mapa com a localização sugerida na literatura.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

A disponibilidade de marcadores moleculares e de um mapa genético-molecular para *D. mediopunctata* gera um novo cenário de possibilidades para o estudo da espécie. Como mencionado anteriormente, a espécie poderá agora ser estudada sob perspectiva molecular, o que pode ser duplamente útil: agora é possível (1) usar os marcadores moleculares aliados aos citológicos e morfológicos para proporcionar uma visão da dinâmica evolutiva em vários níveis e (2) iniciar a investigação mais precisa do genoma.

Como próximas etapas no estudo de *D. mediopunctata*, visualizamos:

- A investigação da evolução dos microssatélites da espécie, com estimativas da taxa de mutação geral e das classes separadamente (di-, tri-, tetranucleotídeos) para verificar se os diferentes locos podem trazer diferentes informações e assim podermos aproveitar melhor as características de cada marcador;
- O refinamento da localização física dos microssatélites, com hibridizações *in situ*, especialmente em cromossomos politênicos; esta abordagem pode identificar marcadores associados às diferentes inversões cromossômicas;
- O estudo da diversidade em populações naturais, com o aprofundamento do conhecimento sobre a variabilidade genética e a forma como ela se distribui e evolui na espécie; em adição, os microssatélites podem ser referenciais de evolução neutra nas populações, o que pode ser confrontado com dados de marcadores sob seleção natural em busca de evidências de adaptação biológica;
- A análise das relações filogenéticas entre espécies do grupo *tripunctata*, agora com a possibilidade de uso de vários locos simultaneamente e maior amostragem genômica;
- O mapeamento molecular de caracteres, regidos por QTLs ou de herança mais simples.

LITERATURA CITADA

LITERATURA CITADA

- Abbott, A. 1999. Annotation competition spurs *Drosophila* sequencing efforts. **Nature** 400: 699.
- Adams, M.D. *et al.* 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287: 2185-2195.
- Amos, W., Hutter, C.M., Schug, M.D., Aquadro, C.F. 2003. Directional evolution of size coupled with ascertainment bias for variation in *Drosophila* microsatellites. **Mol. Biol. Evol.** 20: 660-662.
- Ananina, G., Peixoto, A.A., Souza, W.N., Klaczko, L.B. 2002. Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 97: 691-694.
- Ananina, G., Peixoto, A.A., Bitner-Mathé, B.C., Silva, L.B., Valente, V.L.S., Klaczko, L.B. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. **Gen. Mol. Biol.** 27: 61-69.
- Andrade, C.A.C., Hatadani, L.M., Klaczko, L.B. 2005. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: effect of the temperature. **J. Therm. Biol.** 30: 518-523.
- Andrade, C.A.C., Vieira, R.D., Ananina, G., Klaczko, L.B. 2009. Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. **Genetica** 135: 13-23.
- Bächli, G. 2007. TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. V1.03. Disponível em <http://www.taxodros.uzh.ch>.
- Bachmann, L., Bareiss, P., Tomiuk, J. 2004. Allelic variation, fragment length analyses and population genetic model study on *Drosophila* microsatellites. **J. Zool. Syst. Evol. Research** 42: 215-222.
- Bachtrog, D., Weiss, S., Zangerl, B., Brem, G., Schlötterer, C. 1999. Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. **Mol. Biol. Evol.** 16: 602-610.

-
- Bachtrog, D., Agis, M., Imhof, M., Schlötterer, C. 2000. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs – evidence from *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.** 17: 1277-1285.
- Batista, M.R.D. 2010. Estudos citogenéticos em dípteros: inversões cromossômicas em *Drosophila mediopunctata* e fotomapa dos cromossomos politênicos em *Cochliomyia hominivorax*. Tese. Doutorado em Genética e Biologia Molecular. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP. 82 p.
- Billotte, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A-M., Baurens, F-C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** 54: 277-288.
- Bitner-Mathé, B.C., Peixoto, A.A., Klaczko, L.B. 1995. Morphological variation in natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. **Heredity** 75: 54-61.
- Bitner-Mathé, B.C. & Klaczko, L.B. 1999a. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. **Heredity** 83: 688-696.
- Bitner-Mathé, B.C. & Klaczko, L.B. 1999b. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. **Genetica** 105: 35-42.
- Brianti, M.T. 2009. Análise de cromossomos de espécies da radiação *tripunctata* de *Drosophila*. Tese. Doutorado em Genética e Biologia Molecular. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP. 69 p.
- Bridges, C.B. 1916. Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity. **Genetics** 1: 1-52, 107-163.
- Brooker, A.L., Cook, D., Bentzen, P., Wright, J.M., Doyle R.W. 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 51: 1959-1966.
- Celniker, S.E. et al. 2002. Finishing the whole-genome: Release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. **Gen. Biology** 3: research0079.1-0079.14.
- Cobb, M., Huet, M., Lachaise, D., Veuille, M. 2000. Fragmented forests, evolving flies: molecular variation in African populations of *Drosophila teissieri*. **Mol. Ecol.** 9: 1591-1597.
-

-
- Colson, I. & Goldstein, D.B. 1999. Evidence for complex mutations at microsatellite loci in *Drosophila*. **Genetics** 152: 617-627.
- Colson, I., MacDonald, S.J., Goldstein, D.B. 1999. Microsatellite markers for interspecific mapping of *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. **Mol. Ecol.** 8: 1951-1955.
- Cuadrado, A. & Jouve, N. 2011. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. **BMC Genom.** 12: 205.
- Dilda, C.L. & Mackay, T.F. 2002. The genetic architecture of *Drosophila* sensory bristle number. **Genetics** 162: 1655-1674.
- Dobzhansky, T. & Pavan, C. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Bol. Facul. Fil. Cien. Let. Univ. S. Paulo** 36: Biologia Geral n4.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Res.** 19: 4008.
- Dyer, K.A. Identification and characterization of 21 polymorphic microsatellite loci from the mycophagous fly *Drosophila neotestacea*. **Mol. Ecol. Notes** 7: 1120-1122.
- Ellegren, H., Primmer, C.R., Sheldon, B.C. 1995. Microsatellite 'evolution': directionality or bias? **Nat. Genet.** 11: 360-362.
- England, P.R., Briscoe, D.A., Frankham, R. 1996. Microsatellite polymorphisms in a wild population of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Res. Camb.** 67: 285-290.
- Fisher, R. A. 1918. The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. **Trans. R. Soc. Edinburgh** 52: 399-433.
- Forbes, S. N., Valenzuela, R. K., Keim, P., Service, P.M. 2004. Quantitative trait loci affecting life span in replicated populations of *Drosophila melanogaster*. I. Composite interval mapping. **Genetics** 168: 301-311.
- Frota-Pessoa, O. 1954. Revision of the *tripunctata* group of the *Drosophila* with the description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). **Arq. Museu Paranaense** 10: 253-330.
- Frydenberg, J., Pertoldi, C., Dahlgaard, J., Loeschcke, V. 2002. Genetic variation in original and colonizing *Drosophila buzzatii* populations analysed by the microsatellite loci isolated with a new PCR screening method. **Mol. Ecol.** 11: 181-190.
-

-
- Gleason, J.M. & Ritchie, M.G. 2004. Do quantitative trait loci (QTL) for a courtship song difference between *Drosophila simulans* and *D. sechellia* coincide with candidate genes and intraspecific QTL? **Genetics** 166: 1303-1311.
- Gockel, J., Kennington, W.J., Hoffmann, A., Goldstein, D.B., Partridge, L. 2001. Nonclinality of molecular variation implicates selection in maintaining a morphological cline of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 158: 319-323.
- Gockel, J., Robinson, S.J.W., Kennington, W.J., Goldstein, D.B., Partridge, L. 2002. Quantitative genetic analysis of natural variation in body size in *Drosophila melanogaster*. **Heredity** 89: 145-153.
- Goldstein, D.B. & Clark, A.G. 1995. Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Res.** 23: 3882-3886.
- Gottschalk, M.S., Hofmann, P.R.P., Valente, V.L.S. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Check List** 4: 485-515.
- Harr, B., Zangerl, B., Brem, G., Schlötterer, C. 1998a. Conservation of locus-specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species, *D. melanogaster* and *D. simulans*. **Mol. Biol. Evol.** 15: 176-184.
- Harr, B., Weiss, S., David, J.R., Brem, G., Schlötterer, C. 1998b. A microsatellite-based multilocus phylogeny of the *Drosophila melanogaster* species complex. **Curr. Biol.** 8: 1183-1186.
- Harr, B. & Schlötterer, C. 2000. Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. **Genetics** 155: 1213-1220.
- Harr, B., Zangerl, B., Schlötterer, C. 2000. Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 17: 1001-1009.
- Harr, B., Kauer, M., Schlötterer, C. 2002. Hitchhiking mapping: a population-based fine-mapping strategy for adaptive mutations in *Drosophila melanogaster*. **P. Natl. Acad. Sci.** 99: 12949-12954.

- Hatadani, L.M., Baptista, J.C.R, Souza, W.N., Klaczko, L.B. 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. **Heredity** 93: 525-534.
- Hatadani, L.M. & Klaczko, L.B. 2008. Shape and size variants on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. **Genetica** 133: 335-342.
- Hatadani, L.M., McInerney, J.O., Medeiros, H.F., Junqueira, A.C.M., Azeredo-Espin, A.M., Klaczko, L.B. 2009. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** 51: 595-600.
- Hoskins, R.A. et al. 2000. A BAC-based physical map of the major autosomes of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287: 2271-2274.
- Hoskins, R.A. et al. 2002. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. **Gen. Biology** 3: research0085.1-0085.16.
- Hutter, C.M., Schug, M.D., Aquadro, C.F. 1998. Microsatellite variation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: a reciprocal test of ascertainment bias hypothesis. **Mol. Biol. Evol.** 15: 1620-1636.
- Huttunen, S. & Schlötterer, C. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Drosophila virilis* and their cross species amplification in members of the *D. virilis* group. **Mol. Ecol. Notes** 2: 593-597.
- Huttunen, S., Aspi, J., Hoikkala, A., Schlötterer, C. 2004. QTL analysis of variation in male courtship song characters in *Drosophila virilis*. **Heredity** 92: 263-269.
- Kastritsis, C.D. 1966. Cytological studies of some species of the *tripunctata* group of *Drosophila*. **Univ. Tex. Publs.** 6615: 413-474.
- Katti, M.V., Rankejar, P.K., Gupta, V.S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats of eukaryotic genome sequences. **Mol. Biol. Evol.** 18: 1161-1167.
- Kimmerly, W. et al. 1996. A P1-based physical map of the *Drosophila* euchromatic genome. **Genome Res.** 6: 414-430.
- Klaczko, L.B. 1995. Population Genetics of *Drosophila mediopunctata*. Em: *Genetics of Natural Populations*, Levine, L. (ed.), Columbia University Press. New York.

- Kruglyak, S., Durrett, R.T., Schug, M.D., Aqadro, C.F. 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. **P. Natl. Acad. Sci.** 95: 10774-10778.
- Laborda, P.R., Mori, G.M., Souza, A.P. 2009a. *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. **Conserv. Genet. Res.** 1: 297-307.
- Laborda, P.R., Klaczko, L.B., Souza, A.P. 2009b. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. **Conserv. Genet. Res.** 1: 281-296.
- Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 397-401.
- Loreto, E.L.D., da Silva, L.B., Zaha, A., Valente, V.L.S. 1998. Distribution of transposable elements in Neotropical species of *Drosophila*. **Genetica** 101: 153-165.
- Loreto, E.L.D., Valente, V.L.S., Zaha, A., Silva, J.C., Kidwell, M.G. 2001. *Drosophila mediopunctata* P Elements: a new example of horizontal transfer. **J. Heredity** 92: 375-381.
- Macdonald, S.J. & Goldstein, D.B. 1999. A quantitative genetic analysis of male sexual traits distinguishing the sibling species *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. **Genetics** 153: 1683-1699.
- Machado, L.P.B., Manfrin, M.H., Silva-Junior, W.A., Sene, F.M. 2003. Microsatellite loci in the cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). **Mol. Ecol. Notes** 3: 159-161.
- Mackay, T.F. 1995. The genetic basis of quantitative variation: numbers of sensory bristles of *Drosophila melanogaster* as a model system. **Trends Genet.** 11: 464-470.
- Magiafoglou, A., Carew, M.E., Hoffmann, A.A. 2002. Shifting clinal patterns and microsatellite variation in *Drosophila serrata* populations: a comparison of populations near the southern border of the species range. **J. Evol. Biol.** 15: 763-774.

-
- Michalakis, Y. & Veuille, M. 1996. Length variation of CAG/CAA trinucleotide repeats in natural populations of *Drosophila melanogaster* and its relation to the recombination rate. **Genetics** 143: 1713-1725.
- Moehring, A.J., Li, J., Schug, M.D., Smith, S.G., de Angelis, M., Mackay, T.F., Coyne, J.A. 2004. Quantitative trait loci for sexual isolation between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. **Genetics** 167: 1265-74.
- Moraes, E.M. & Sene, F.M. 2007. Microsatellite and morphological variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **J. Zool. Syst. Evol. Res.** 45: 336-344.
- Morgan, T. H. 1910. Sex limited inheritance in *Drosophila*. **Science** 32: 120-122.
- Morgan, T.H. & Lynch, C.J. 1912. The linkage of two factors in *Drosophila* that are not sex-linked. **Biol. Bull.** 23: 174-182.
- Müller, H.J. 1940. Bearings of the 'Drosophila' work on systematics, pp. 185–268. Em: *The New Systematics*, Huxley, J. (ed.), Clarendon Press, Oxford.
- Myers, E.W. et al. 2000. A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. **Science** 287: 2196-2204.
- Noor, M.A.F., Schug, M.D., Aquadro, C.F. 2000. Microsatellite variation in populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. **Genet. Res. Camb.** 75: 25-35.
- Norry, F.M., Dahlggaard, J., Loeschcke. 2004. Quantitative trait loci affecting knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Ecol.** 13: 3585-3594.
- Norry, F.M., Sambucetti, P., Scannapieco, A.C., Gomez, F.H., Loeschcke. 2007. X-linked QTL for knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. **Ins. Mol. Biol.** 16: 509-513.
- Orgogozo, V., Broman, K.W., Stern, D.L. 2006. High-resolution quantitative trait locus mapping reveals sign epistasis controlling ovariole number between two *Drosophila* species. **Genetics** 173: 197-205.
- Orsini, L. & Schlötterer, C. 2004. Isolation and characterization of microsatellites in *Drosophila montana* and their cross-species amplification in *D. virilis*. **Mol. Ecol. Notes** 4: 412-414.
- Orsini, L., Huttunen, S., Schlötterer, C. 2004. A multilocus microsatellite phylogeny of the *Drosophila virilis* group. **Heredity** 93: 161-165.
-

-
- Pascual, M., Schug, M., Aquadro, C.F. 2000. High density of long dinucleotide microsatellites in *Drosophila subobscura*. **Mol. Biol. Evol.** 17: 1259-1267.
- Peixoto, A.A. & Klaczko, L.B. 1991. Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversions polymorphisms of *Drosophila*. **Genetics** 129: 773-777.
- Peixoto, A.A. 1989. Polimorfismos de inversões cromossômicas de *Drosophila mediopunctata* na população do Parque Nacional do Itatiaia. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas. UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.
- Peters, M.B., Hagen, C., Snyder, B., Glenn, T.C., Gowaty, P.A. 2009. Microsatellite markers isolated from *Drosophila hydei*. **Mol. Ecol. Res.** 9: 817-819.
- Robe, L.J., Valente, V.L.S., Budnik, M., Loreto, E.L.S. 2005. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Mol. Phylogenet. Evol.** 36: 623-640.
- Rocha, F., Medeiros, H.F., Klaczko, L.B. 2008. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. **Evolution** 63: 280-287.
- Ross, C.L., Dyer, K.A., Erez, T., Miller, S.J., Jaenike, J., Markow, T.A. 2003. Rapid divergence of microsatellite abundance among species of *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 20: 1143-1157.
- Saavedra, C.C., Callegari-Jacques, S.M., Napp, M., Valente, V.L.S. 1995. A descriptive and analytical study of neotropical drosophilid communities. **J. Zool. Syst. Evol. Res.** 33: 62-74.
- Santos, J., Serra, L., Solé, E., Pascual, M. 2010. FISH mapping of microsatellite loci from *Drosophila subobscura* and its comparison to related species. **Chromosome Res.** 18: 213-226.
- Schaeffer, S.W. et al. 2008. Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. **Genetics** 179: 1601-1655.
- Schäfer, M.A., Mazzi, D., Klappert, K., Kauranen, H., Vieira, J., Hoikkala, A., Ritchie, M.G., Schlötterer, C. 2010. A microsatellite linkage map for *Drosophila montana* shows large variation in recombination rates, and a courtship song trait maps to an area of low recombination. **J. Evol. Biol.** 23: 518-527.
-

-
- Schlötterer, C., Vogl, C., Tautz D. 1997. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. **Genetics** 146: 309-320.
- Schlötterer, C., Ritter, R., Harr, B., Brem, G. 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Mol. Biol. Evol.** 15: 1269-1274.
- Schlötterer, C. & Harr, B. 2000. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Mol. Biol. Evol.** 17: 1641-1646.
- Schlötterer, C. 2001. Genealogical inference of closely related species based on microsatellites. **Genet. Res. Camb.** 78: 209-212.
- Schug, M.D., Mackay, T.F.C., Aquadro, C.F. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genet.** 15: 99-102.
- Schug, M.D., Wetterstrand, K.A., Gaudette, M.S., Lim, R.H., Hutter, C.M., Aquadro, C.F. 1998a. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Ecol.** 7: 57-70.
- Schug, M.D., Hutter, C.M., Noor, M.A.F., Aquadro, C.F. 1998b. Mutation and evolution of microsatellites in *Drosophila melanogaster*. **Genetica** 102/103: 359-367.
- Schug, M.D., Hutter, C.M., Wetterstrand, K.A., Gaudette, M.S., Mackay, T.F.C., Aquadro, C.F. 1998c. The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.** 15: 1751-1760.
- Schug, M.D., Regulski, E.E., Pearce, A., Smith, S.G. 2004. Isolation and characterization of dinucleotide repeat microsatellite of *Drosophila ananassae*. **Genet. Res. Camb.** 83: 19-29.
- 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 de Zoologia** 33: 315-326.
- Stallings, R.L., Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hildebrand, C.E., Moyzis, R.K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics** 10: 807-815.
- Staten, R., Schully, S.D., Noor, M.A.F. 2004. A microsatellite linkage map of *Drosophila mojavensis*. **BMC Genet.** 5: 12-19.
-

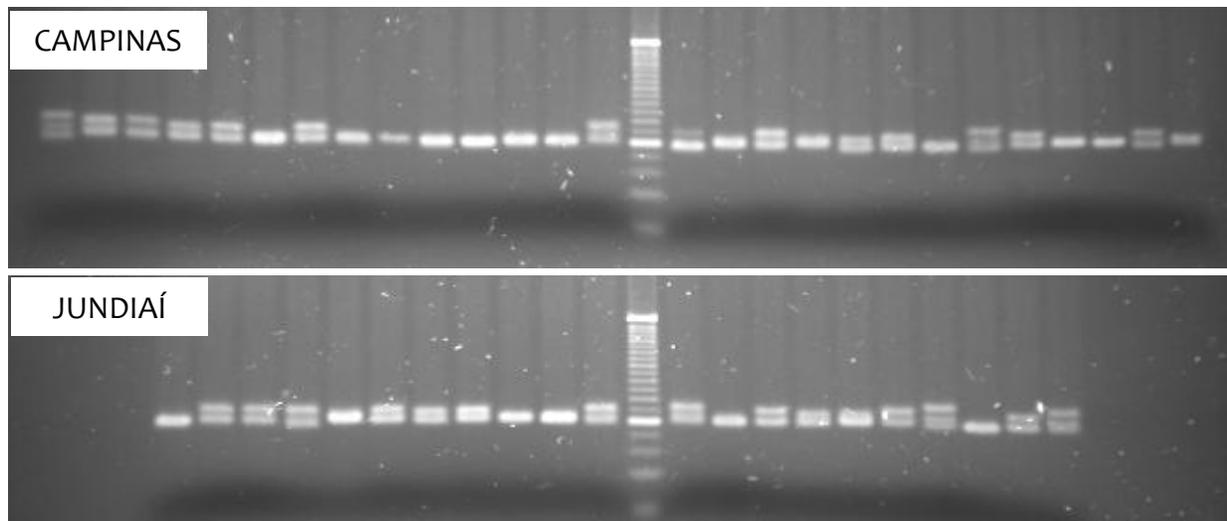
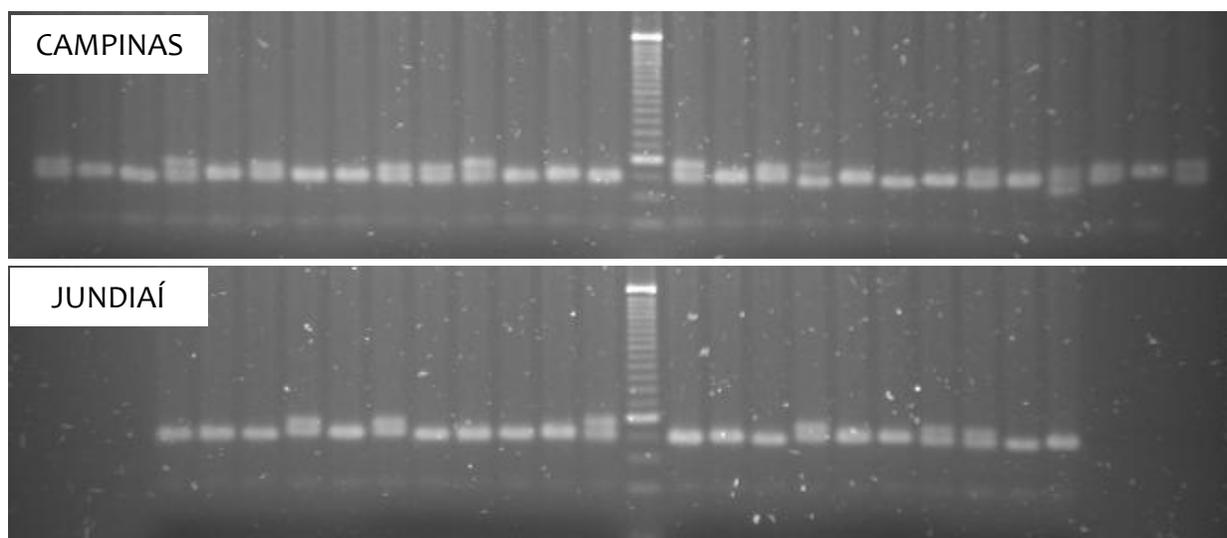
- Sturtevant, A.H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. **J. Exper. Zool.** 14: 43-59.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** 17: 6463-6471.
- Throckmorton, L.H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography in *Drosophila*. Em: King, R.C. (ed.), Handbook of Genetics, Plenum, New York, pp. 421-459.
- Tidon-Sklorz, R. & Sene F.M. 1995. Fauna of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the northern area of the "Cadeia do Espinhaço", states of Minas Gerais and Bahia, Brazil: biogeographical and ecological aspects. **Iheringia Ser. Zool.** 78: 85-94.
- Tidon-Sklorz, R., Vilela C.R., Sene F.M., Pereira, M.A.Q.R. 1994. The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó, state of Minas Gerais, Brazil. **Revta. Bras. Ent.** 38: 627-637.
- Tóth, G., Gáspari, Z., Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.** 10: 967-981.
- Unckless, R.L., Boelio, L.M., Schifano, M., Dyer, K.A. 2008. Isolation and characterization of 30 polymorphic microsatellite loci from the mycophagous fly *Drosophila innubila*. **Mol. Ecol. Res.** 8: 939-942.
- Val, F.C., Vilela, C.R., Marques, M.D. 1981. Drosophilidae of the Neotropical region. Em: *The Genetics and Biology of Drosophila* (vol. 3a), Ashburner, N., H.C. Carson e J.N. Thompson, Jr (eds.), Academic Press. London.
- Venter, J.C. et al. 1998. Shotgun sequencing of the human genome. **Science** 208: 1540-1542.
- Vermeulen, C.J., Bijlsma, R., Loeschcke, V. 2008a. A major QTL affects temperature sensitive adult lethality and inbreeding depression in life span in *Drosophila melanogaster*. **BMC Evol. Biol.** 8: 297-397.
- Vermeulen, C.J., Bijlsma, R., Loeschcke, V. 2008b. QTL mapping of inbreeding-related cold sensitivity and conditional lethality in *Drosophila melanogaster*. **J. Evol. Biol.** 21: 1236-1244.
- Weber, J.L. & May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 388-396.

- Wilder, J.A., Diaz, T., O'Neill, R.J.W., Kenney, J., Hollocher, H. 2002. Characterization and isolation of novel microsatellites from the *Drosophila dunni* subgroup. **Genet. Res. Camb.** 80: 177-185.
- Williams, M.A., Blouin, A.G., Noor, M.A.F. 2001. Courtship songs of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. II. Genetics of species differences. **Heredity** 86: 68-77.
- Yotoko, K.S.C., Medeiros, H.F., Solferini, V.N., Klaczko, L.B. 2003. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Mol. Phylogenet. Evol.** 28: 614-619.

APÊNDICE I

APÊNDICE I

Durante o desenvolvimento dos locos microssatélites de *D. mediopunctata*, amostras de duas populações naturais foram avaliadas. Coletas haviam sido feitas na região de Campinas (Condomínio Colinas do Atibaia) e Jundiaí (Serra do Japi) e estavam disponíveis no laboratório. Como a determinação das condições ótimas de uso dos microssatélites foi conduzida com estirpes de laboratório, decidiu-se utilizar as populações naturais para avaliar o comportamento dos locos também com outro tipo de material biológico. Aproximadamente 90 microssatélites foram amplificados em 48 indivíduos. Todavia, devido à dificuldade de leitura dos géis, apenas 25 locos foram genotipados. As condições de amplificação e eletroforese são as mesmas daquelas descritas no Capítulo III. A seguir estão exemplos de géis produzidos durante a genotipagem e uma tabela que reúne as estimativas da variabilidade encontradas para as populações.

A**B**

Perfis de amplificação dos microssatélites de *Drosophila mediopunctata* em 48 indivíduos de duas populações naturais da espécie. (Géis de agarose 3% TBE 0,5x; padrão de peso molecular “ladder 25bp”). **A:** loco $Dmed^{UNICAMP}_{ssr003}$; **B:** loco $Dmed^{UNICAMP}_{ssr018}$.

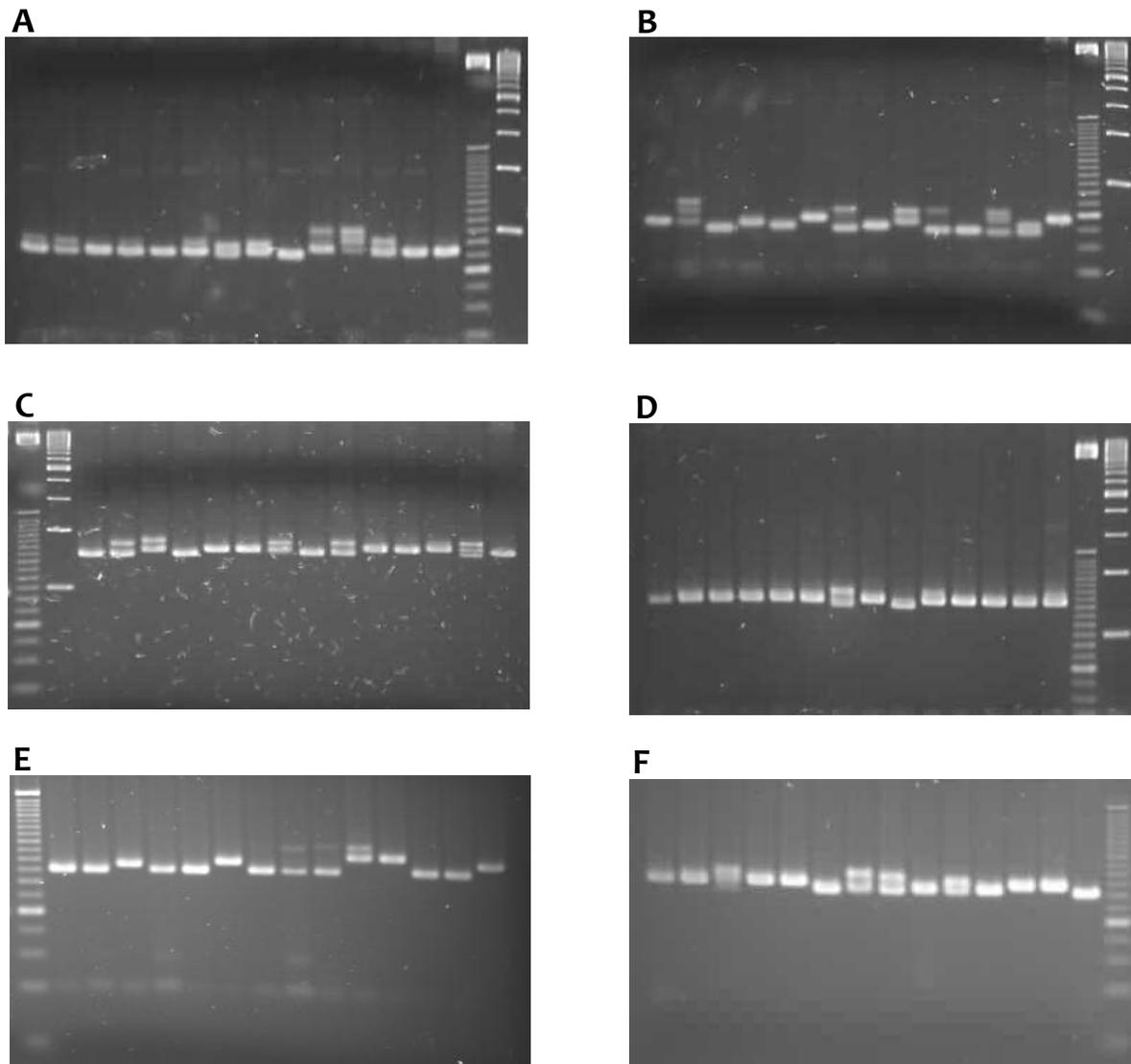
Estimativas de variabilidade genética em duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* com a avaliação de 25 locos microssatélites. N_A - número de alelos, n - tamanho amostral, H_O - heterozigosidade observada, H_E - heterozigosidade esperada, AP - alelos privativos, $P(EHW)$ - P -valores para os testes de desvio das proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. (*) mostra significância a $P < 0,05$; (^B) mostra significância após a correção de Bonferroni - $P < 0,002$.

Loco	CAMPINAS						JUNDIAÍ						C + J				
	N_A	n	H_O	H_E	AP	$P(EHW)$	N_A	n	H_O	H_E	AP	$P(EHW)$	N_A	n	H_O	H_E	$P(EHW)$
1 Dmed ^{UNICAMP} _ssr003	10	27	0,63	0,83	1,11	0,0116*	9	20	0,85	0,79	2	0,4763	11	47	0,72	0,82	0,0091*
2 Dmed ^{UNICAMP} _ssr005	3	27	0,33	0,57		0,0046*	3	21	0,38	0,58		0,0900	3	48	0,35	0,57	0,0006 ^B
3 Dmed ^{UNICAMP} _ssr013	8	26	0,12	0,78	6,7,10,11	0,0000 ^B	7	20	0,10	0,77	3,8,9	0,0000 ^B	11	46	0,11	0,78	0,0000 ^B
4 Dmed ^{UNICAMP} _ssr014	10	26	0,54	0,84	1,9	0,0000 ^B	9	18	0,56	0,84	2	0,0120*	11	44	0,55	0,83	0,0000 ^B
5 Dmed ^{UNICAMP} _ssr016	9	27	0,30	0,75	1,2	0,0000 ^B	8	19	0,42	0,74	10	0,0033*	10	46	0,35	0,76	0,0000 ^B
6 Dmed ^{UNICAMP} _ssr018	7	27	0,81	0,78	1,7	0,4898	5	20	0,45	0,73		0,0032*	7	47	0,66	0,76	0,1744
7 Dmed ^{UNICAMP} _ssr023	8	25	0,08	0,75	5,6,9	0,0000 ^B	7	18	0,22	0,73	3,8	0,0000 ^B	10	43	0,14	0,75	0,0000 ^B
8 Dmed ^{UNICAMP} _ssr024	9	23	0,39	0,78	4,8,10	0,0000 ^B	7	19	0,11	0,77	2	0,0000 ^B	10	42	0,26	0,78	0,0000 ^B
9 Dmed ^{UNICAMP} _ssr029	7	26	0,58	0,70	7	0,2504	7	20	0,65	0,65	8	1,0000	8	46	0,61	0,68	0,5450
10 Dmed ^{UNICAMP} _ssr030	11	26	0,85	0,87	4,7,11	0,3128	10	18	0,44	0,86	12,13	0,0000 ^B	13	44	0,68	0,87	0,0000 ^B
11 Dmed ^{UNICAMP} _ssr035	3	27	0,30	0,53		0,0161*	3	19	0,16	0,39		0,0033*	3	46	0,24	0,50	0,0001 ^B
12 Dmed ^{UNICAMP} _ssr039	9	24	0,25	0,78	6	0,0000 ^B	8	19	0,32	0,82		0,0000 ^B	9	43	0,28	0,79	0,0000 ^B
13 Dmed ^{UNICAMP} _ssr044	9	27	0,56	0,55	1,3,6,8,10	0,2876	5	20	0,40	0,57	7	0,2035	10	47	0,49	0,55	0,2229
14 Dmed ^{UNICAMP} _ssr049	4	19	0,58	0,56	4	1,0000	3	19	0,74	0,62		0,3730	4	38	0,66	0,59	0,5051
15 Dmed ^{UNICAMP} _ssr050	11	27	0,48	0,85	7,1	0,0000 ^B	12	21	0,86	0,87	1,3,12	0,7333	14	48	0,65	0,88	0,0000 ^B
16 Dmed ^{UNICAMP} _ssr053	13	27	0,74	0,91	1,2,7,11,13	0,1197	8	19	0,58	0,88		0,0006 ^B	13	46	0,67	0,89	0,0000 ^B
17 Dmed ^{UNICAMP} _ssr055	2	27	0,48	0,44		1,0000	3	19	0,58	0,52	1	0,3443	3	46	0,52	0,47	0,3007
18 Dmed ^{UNICAMP} _ssr057	6	26	0,81	0,76	1	0,7965	6	20	0,75	0,80	2	0,3057	7	46	0,78	0,77	0,4948
19 Dmed ^{UNICAMP} _ssr058	6	27	0,56	0,65	2,8	0,5328	8	21	0,48	0,69	1,3,6,10	0,0112*	10	48	0,52	0,67	0,0303*
20 Dmed ^{UNICAMP} _ssr062	4	26	0,42	0,52	4	0,1701	3	20	0,45	0,51		0,8159	4	46	0,43	0,51	0,1180
21 Dmed ^{UNICAMP} _ssr066	8	25	0,44	0,83	1,7,8	0,0000 ^B	5	16	0,69	0,79		0,0744	8	41	0,54	0,82	0,0000 ^B
22 Dmed ^{UNICAMP} _ssr087	6	27	0,74	0,78		0,2731	8	19	0,89	0,84	1,2	0,7517	8	46	0,80	0,80	0,3331
23 Dmed ^{UNICAMP} _ssr091	3	27	0,15	0,14	4	1,0000	3	21	0,24	0,22	2	1,000	4	48	0,19	0,18	1,0000
24 Dmed ^{UNICAMP} _ssr122	5	25	0,24	0,73	3	0,0000 ^B	5	21	0,48	0,62	1	0,0063*	6	46	0,35	0,68	0,0000 ^B
25 Dmed ^{UNICAMP} _ssr125	12	27	0,81	0,79	1,3,4,5	0,4445	11	21	0,67	0,82	11,12,15	0,0000 ^B	15	48	0,75	0,80	0,0227*
Médias	7,3	25,9	0,49	0,70			6,5	19,5	0,50	0,70			8,5	45,4	0,49	0,70	

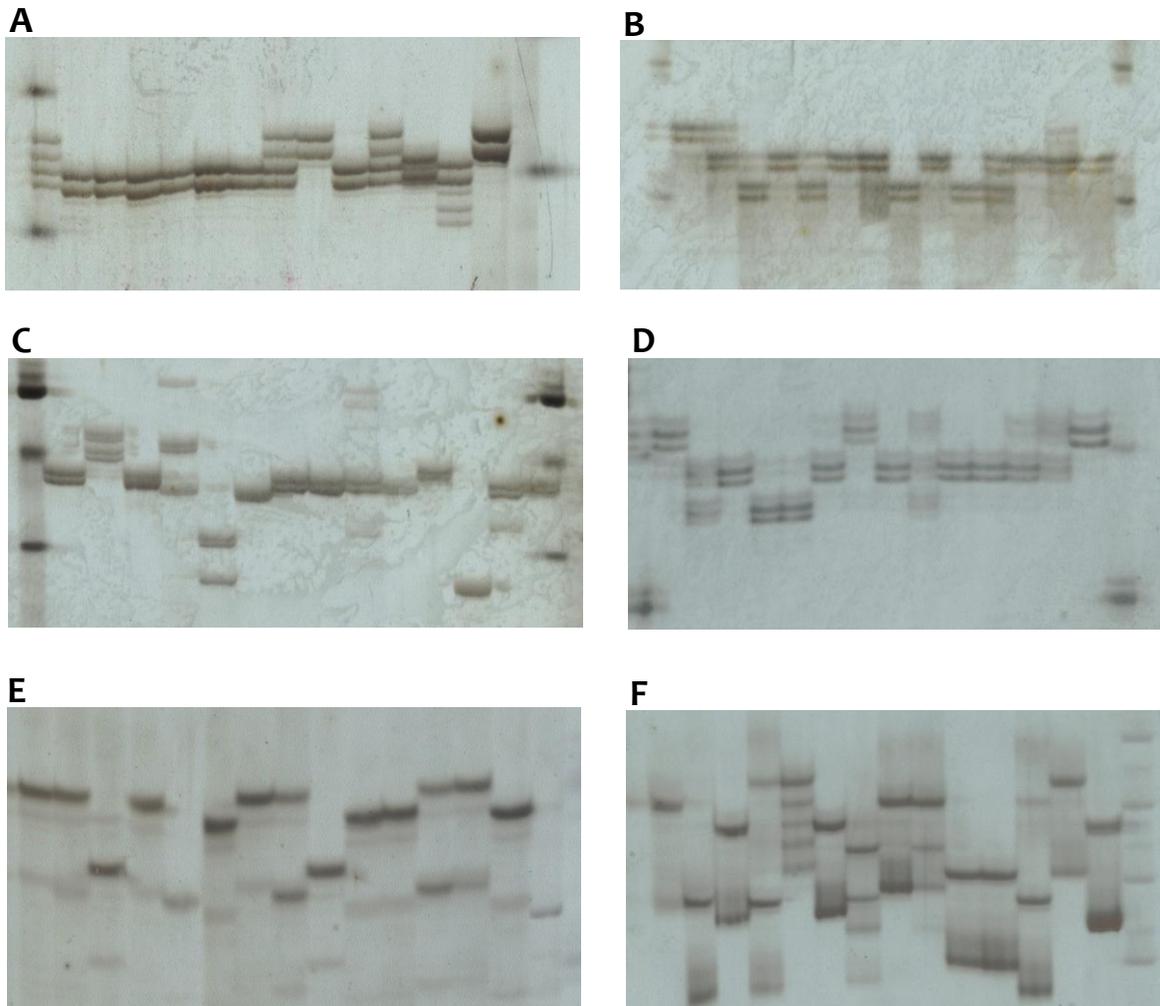
APÊNDICE II

APÊNDICE II

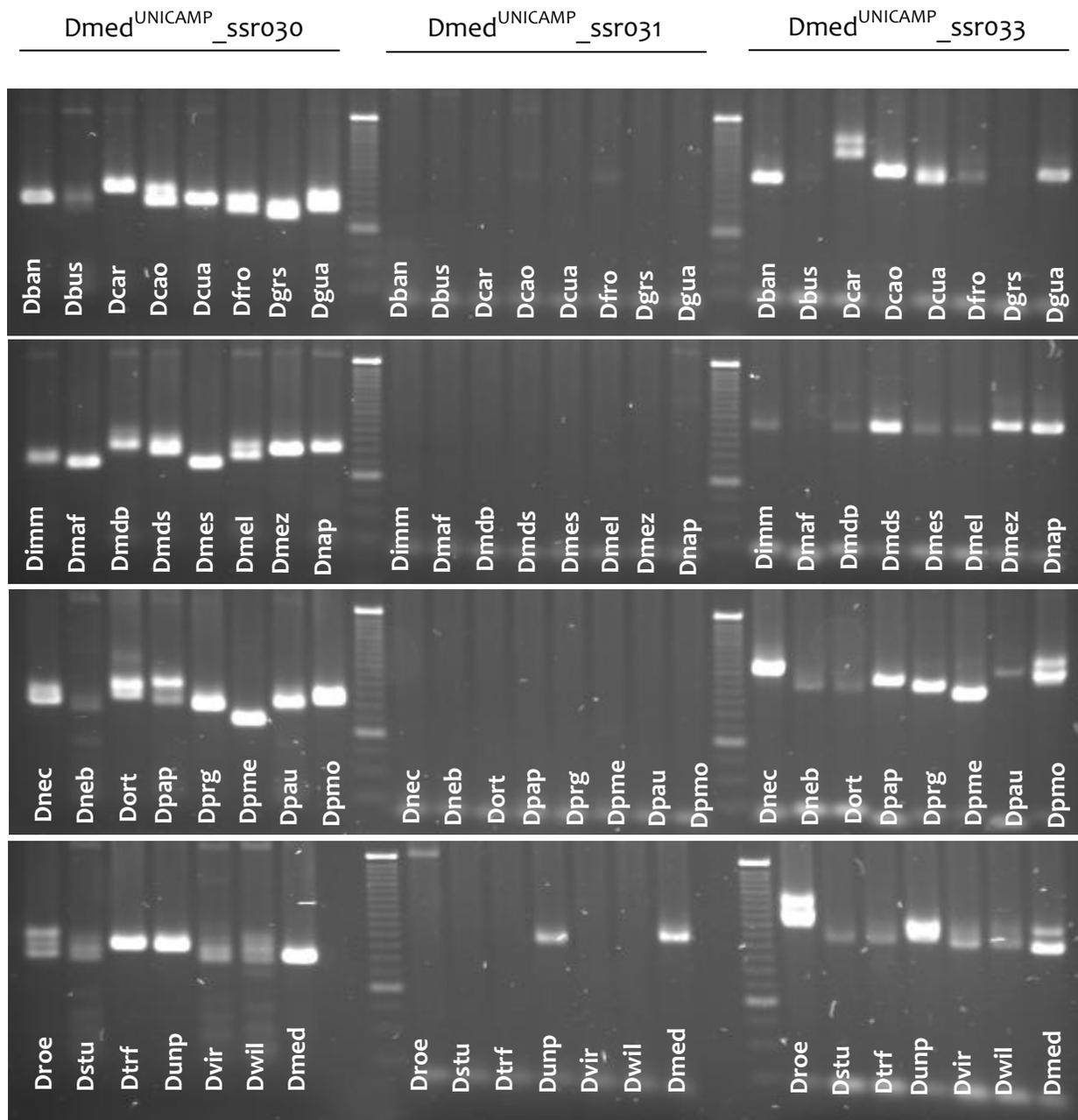
A natureza do trabalho que esta tese apresentou é baseada no acúmulo de grande quantidade de dados. Ao final de cada etapa, as informações coletadas ao longo de meses são sumarizadas em grandes tabelas ou planilhas. Deste modo, os cuidados tomados durante a aquisição dos dados, as estratégias escolhidas e os pequenos avanços feitos no dia-a-dia muitas vezes não ficam visíveis. Portanto, para exemplificar os vários momentos “reais” que resultaram neste trabalho, aqui estão algumas imagens.



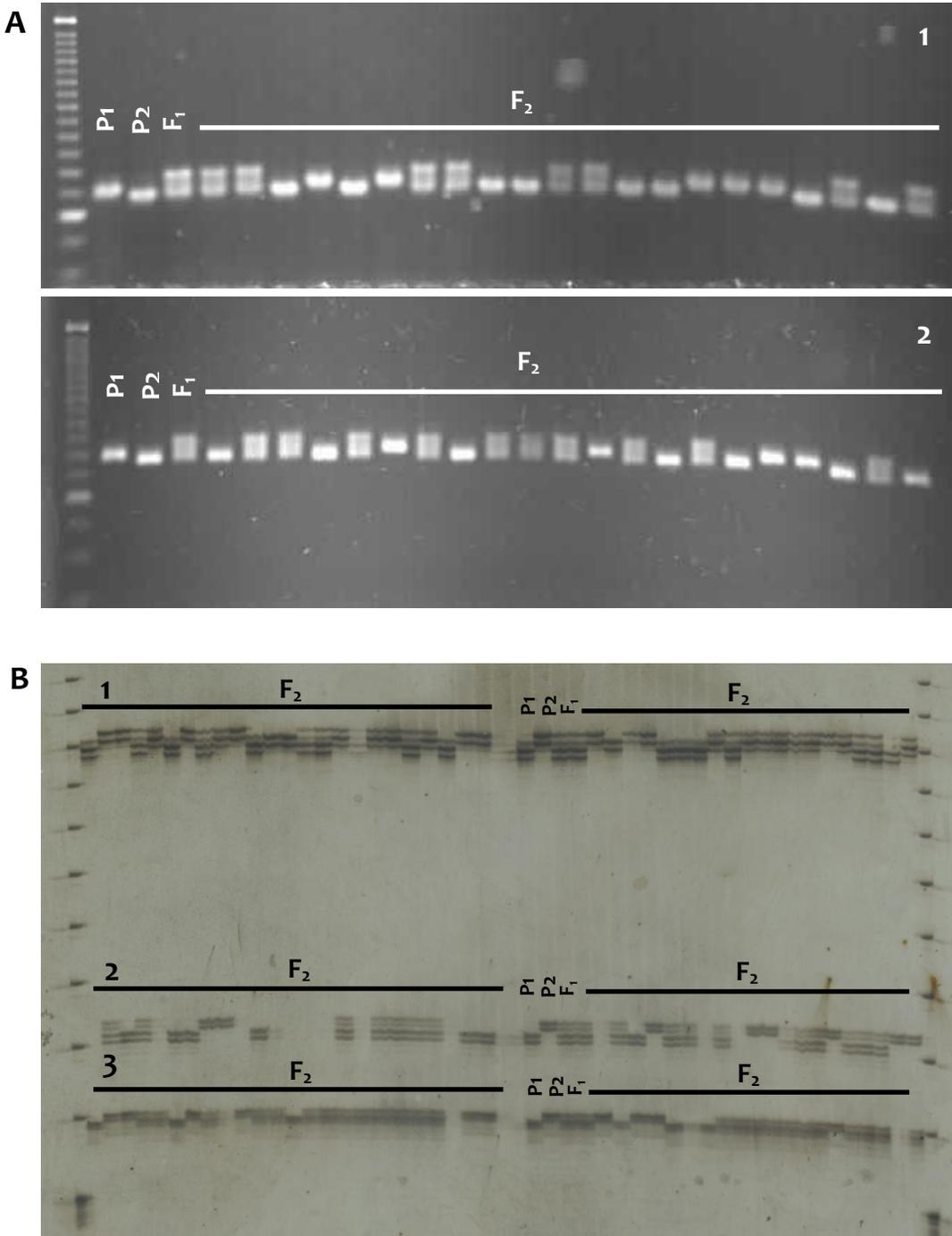
Perfis de amplificação dos microssatélites de *Drosophila mediopunctata* nas estirpes durante a fase de caracterização dos locos. (Géis de agarose 3% TBE 0,5x; padrões de peso molecular “ladder 25bp” e “ladder 200bp”). **A:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr032; **B:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr034; **C:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr060; **D:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr126; **E:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr092; **F:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr016. (Controles: últimos genótipos à direita).



Perfis alélicos dos microssatélites de *Drosophila mediopunctata* nas estirpes. (Géis de poliacrilamida 6% TBE 1x; padrão de peso molecular “ladder 10bp”). **A:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr009; **B:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr018; **C:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr133; **D:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr058; **E:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr039; **F:** loco Dmed^{UNICAMP}_ssr098. (Controles: últimos genótipos à direita).



Perfis de amplificação heteróloga dos microssatélites de *Drosophila mediopunctata* em espécies do gênero *Drosophila*. (Géis de agarose 3% TBE 0,5x; padrão de peso molecular “ladder 25bp”). Dban: *D. bandeirantorum*; Dbus: *D. busckii*; Dcar: *D. cardini*; Dcao: *D. cardinoides*; Dcua: *D. cuaso*; Dfro: *D. frotapessoai*; Dgrs: *D. griseolineata*; Dgua: *D. guaraja*; Dimm: *D. immigrans*; Dmaf: *D. maculifrons*; Dmdp: *D. mediopicta*; Dmds: *D. mediosignata*; Dmes: *D. mediotriata*; Dmel: *D. melanogaster*; Dmez: *D. metzii*; Dnap: *D. nappae*; Dnec: *D. neocardini*; Dneb: *D. nebulosa*; Dort: *D. ornatifrons*; Dpap: *D. pallidipennis*; Dprg: *D. paraguayensis*; Dpme: *D. paramediotriata*; Dpau: *D. paulistorum*; Dpmo: *D. polymorpha*; Droe: *D. roehrae*, Dstu: *D. sturtevantii*; Dtrf: *D. trifilum*; Dpnp: *D. unipunctata*; Dvir: *D. virilis*; Dwil: *D. willistoni*; **Dmed: *D. mediopunctata***.



Perfis de genotipagem dos microssatélites de *Drosophila mediopunctata* na população F_2 de mapeamento. **A:** (1) $Dmed^{UNICAMP_ssr017}$; (2) $Dmed^{UNICAMP_ssr106}$ (géis de agarose 3% TBE 0,5x; padrão de peso molecular “ladder 25bp”); **B:** (1) $Dmed^{UNICAMP_ssr051}$; (2) $Dmed^{UNICAMP_ssr045}$; (3) $Dmed^{UNICAMP_ssr120}$ (géis de poliacrilamida 6% TBE 1x; padrão de peso molecular “ladder 10bp”).



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
19 de julho de 2011.

CIBio: 02/2011

Projeto CIBio: 14/2003

Identificação:

03/2005 – **Doutorado:** Prianda Rios Laborda, CPG-GBM UNICAMP.

Projeto: Marcadores microssatélites na investigação do genoma de *Drosophila mediopunctata*: desenvolvimento e construção de mapa genético de ligação.

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG em 13/02/2003 sob número 14/2003
(em andamento)

Coordenador: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edi Lúcia Sartorato".

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP