# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

# INSTITUTO DE BIOLOGIA

Mitsue Taukeuti Brianti

"Análise de Cromossomos de Espécies da Radiação tripunctata de Drosophila"

Este exemplar corresponde à redação final da tese, defendida pelo(a), candidato (a) Kente Brianti e aprovada pela Comissão

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

i

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Campinas, 2009

# FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B76a	Brianti, Mitsue Taukeuti Análise de cromossomos de espécies da radiação tripuntacta de Drosophila / Mitsue Taukeuti Brianti. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.
	Orientador: Louis Bernard Klaczko. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência. 2. Região organizadora do nucléolo. 3. Cromossomos gigantes. 4. Elementos de Müller. I. Klaczko, Louis Bernard. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Chromosome analysis of species of the tripunctata radiation of Drosophila. **Palavras-chave em inglês**: Fluorescence in situ hybridization; Nucleolus organizer region; Giant chromosomes; Müller elements.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora**: Louis Bernard Klaczko, Vera Nisaka Solferini, Luciana Bolsoni Lourenço, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Alexandre Afrânio Peixoto.

Data da defesa: 21/12/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 21 de dezembro de 2009

# **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (Orientador)

Prof. Dr. Alexandre Afrânio Peixoto

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

.

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini

Profa. Dra. Denise Selivon Scheepmaker

Assinatura Assinatura

Assinatura

uciana Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

## Agradecimentos

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram para chegar até aqui, com certeza sem elas este caminho seria impossível de percorrer.

As professoras da banca prévia: Vera Nisaka Solferini e Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, que com muita gentileza e disponibilidade se deslocaram até aqui para assistir minha apresentação e pelas sugestões que certamente contribuíram para sua melhora. E aos professores da banca Alexandre Afrânio Peixoto, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Luciana Bolsoni Lourenço, Vera Nisaka Solferini.

À professora Shirlei Maria Recco-Pimentel pela colaboração e por abrir a porta de seu laboratório possibilitando a execução da maior parte do trabalho de hibridação com rDNA.

Ao Prof Áureo Tatsumi Yamada por me disponibilizar o uso de seu fotomicroscópio.

Aos funcionários e ex-funcionários do laboratório que tornaram este trabalho possível, onde destaco: Salete, Solange; e Klélia que além de toda dedicação no apoio técnico, tem sido também, uma grande amiga ao longo de toda minha história na Unicamp.

Aos colegas de laboratório, Ayana, Diogo, Felipe, Gália, Iuri, Marcão, Roberto, pela ajuda e gratificante convívio.

À Gália pela ajuda imprescindível.

Ao Marcão e Gália que se dedicaram para garantir o bom funcionamento do laboratório por um bom tempo.

Aos colegas de laboratório com os quais já não convivo mais, mas que no início deste trabalho foram fundamentais no apoio, dos quais destaco Luciane M. Hatadani e Hermes Fonseca de Medeiros, que coletaram, identificaram e mantiveram a coleção de espécies do grupo *tripunctata* utilizadas neste trabalho.

Ao Gê por toda dedicação, apoio e compreensão.

Ao Gabriel, que me honrou com sua chegada e me tornou mais completa.

À minha mãe que tem sido Mãe este tempo todo me apoiando em minhas escolhas.

Ao professor Louis Bernard, pela orientação e formação além de toda dedicação que supera a orientação profissional.

À CAPES, CNPq, FAEPEX-UNICAMP, e FAPESP, pelo apoio financeiro, em especial por minha bolsa de doutorado (CAPES).

"Sempre vão surgir em mim, novas fantasias, Sinto vibrando no ar, E sei que não é vã, a cor da esperança, A esperança do amanhã."

Cartola

# Índice

Agradecimentos	iv
Índice	vi
Resumo	vii
Summary	viii
I. Introdução Geral	1
I.1. O grupo e a radiação <i>tripunctata</i>	1
I.2. Cromossomos no gênero Drosophila	2
I.3. rDNA	3
I.4. Os elementos de Muller	5
I.5. Cromossomos em D. mediopunctata, D. unipuctata e D. roehrae	6
I.6. Mapas de cromossomos politênicos	8
I.7. Inferências evolutivas usando cromossomos politênicos	8
I.8. Utilização da localização de genes na determinação da homologia cromossômica	9
II. Objetivos e Justificativa	10
II.1. Objetivos Específicos	12
III. Organização da Tese e Contribuição da Autora	13
V. Artigos	
V.1. Comparative Analysis of the Chromosomal Positions of rDNA Genes in Species of the <i>tripunctata</i> Radiation of <i>Drosophila</i>	14
V.2. Fotomapas, Polimorfismo de Inversões e Identificação dos Elementos de Muller dos Cromossomos Politênicos de Três Espécies do Grupo <i>tripunctata</i> de <i>Drosophila</i> (Diptera: Drosophilidae)	24
VI. Apêndice	
VI.1. Comparações qualitativa do padrão de bandas entres os elementos B e D das espécies <i>D. mediopunctata</i> , <i>D. unipuctata</i> e <i>D. roehrae</i>	53
VII. Conclusões Gerais	57
VIII. Bibliografia Geral	58

#### **Resumo**

Acredita-se que no gênero *Drosophila*, o subgênero *Drosophila* é procedente do subgênero *Sophophora* e deu origem a outros gêneros e subgêneros e, particularmente, a duas radiações: *virilis-repleta* e *immigrans-Hirtodrosophila*. Esta última teve uma origem paleotropical, onde inicialmente se diversificou e se expandiu, enviando a radiação *tripunctata* aos Neotrópicos. A radiação *tripunctata* sofreu uma diversificação neotropical importante e atualmente é composta por 9 grupos de espécies adaptadas a áreas florestais. Este projeto se insere num amplo contexto de compreender a evolução da radiação *tripunctata* de *Drosophila*. Para isso foram usadas duas abordagens: a) analisamos a posição do rDNA nos cromossomos mitóticos de 16 espécies da radiação *tripunctata*; b) e, com cromossomos politênicos, focalizamos nossa atenção no estudo detalhado de um agrupamento monofilético dentro do grupo *tripuntata* – o agrupamento de espécies relacionadas com *D. mediopunctata* (*D. mediopunctata, D. unipunctata e D. roehrae*) – usando métodos de citogenética clássica e molecular. Deste modo os objetivos deste trabalho foram:

- Examinar a variação da posição dos genes codificantes do RNA ribossomal (rDNA) em espécies da radiação *tripunctata*.

- Produzir fotomapas de cromossomos politênicos de D. roehrae e D. unipunctata.

- Caracterizar as inversões cromossômicas (pontos de quebra) que ocorrem em populações de D. roehrae e D. unipunctata

- Identificar os elementos cromossômicos de Muller pela localização, através de hibridação *in situ*, de genes de cópia única de *D. melanogaster* em cromossomos politênicos das espécies *D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

As conclusões gerais foram:

- A presença de uma NOR em cada cromossomo sexual é uma condição ancestral no gênero *Drosophila* e este caráter é bem conservado neste gênero.

- Os cromossomos politênicos das três espécies são bem similares, sendo possível determinar com relativa facilidade a homologia dos cromossomos menos polimórficos.

- Existe um padrão de polimorfismo de inversões entres os elementos de Muller nestas espécies: o elemento E é o mais polimórfico, com muitas inversões em cada espécie; o elemento C é o segundo mais polimórfico, enquanto B e D são os menos polimórficos.

- *Drosophila unipunctata* apresenta uma conformação cariotípica singular, a despeito das espécies *D. mediopunctata* e *D. unipunctata* serem consideradas filogeneticamente mais próximas que *D. roehrae*, o que sugere uma rápida evolução cromossômica.

#### SUMMARY

In the genus *Drosophila*, the subgenus *Drosophila* arose from the subgenus *Sophophora* and subsequently gave rise to various subgenera and genera, and to two particularly important radiations: *virilis-repleta* and *immigrans-Hirtodrosophila*. The latter originated in the Paleotropics, where it initially diversified and expanded, taking the *tripunctata* radiation to the Neotropics. The *tripunctata* radiation suffered significant Neotropical diversification and, at present, is composed of nine species groups adapted to forest habitats. The ultimate aim underlying this project is to understand the evolution of the *tripunctata* radiation of *Drosophila*. To address this matter, two approaches were used: a) we investigated the rDNA position, on mitotic chromosomes, in 16 species of the *tripunctata* radiation; b) and, with polytene chromosomes, we focused our attention in the detailed study of three closely related species of the *tripunctata* group. (*D. mediopunctata*, *D. unipunctata* and *D. roehrae*) - using classical and molecular cytogenetic analysis. More specifically, we aimed to:

- investigate the rDNA position in species of *tripunctata* radiation through *in situ* hybridization on mitotic chromosomes.

- prepare photomaps of the polytene chromosome of *D. roehrae* and *D. unipunctata*, locating the breaking points of the inversions.

- identify Muller's elements, in polytene chromosomes of *D. mediopunctata*, *D. roehrae* and *D. unipunctata* through *in situ* hybridization using genes of *D. melanogaster* as probes.

Our conclusions were:

- The presence of a single nucleolus organizer region (NOR) on each sex chromosome is an ancestral and conserved state in the genus *Drosophila*.

- Drosophila mediopunctata, D. roehrae and D. unipunctata have similar polytene chromosomes, which allowed us to establish the homology of chromosomal elements through the comparison of banding patterns.

- In these species, the distribution of breaking points through the Muller's elements is nonrandom: element E is the most polymorphic, with many inversions in each species; and element C is the second most polymorphic; while B and D are the least polymorphic.

- With the help of molecular genetic markers it has been previously established that *D*. *mediopunctata* is more closely related to *D*. *unipunctata* than to *D*. *roehrae*. However, *D*. *unipunctata* shows a notably different karyotype configuration, which suggests rapid chromosomal evolution.

# I. INTRODUÇÃO GERAL

*Drosophila* é um gênero rico em espécies e com uma história evolutiva de cerca de 120 milhões de anos (Tamura *et al.*, 2004). Estima-se que este gênero abranja em torno de 3500 espécies (Powell, 1997), com mais de 1.500 espécies já descritas (Ashburner *et al.*, 2005). O gênero *Drosophila* compreende 9 subgêneros, dos quais destacam-se *Drosophila* (composto por 35 grupos) e *Sophophora* (com 9 grupos) (Bächli, 2009).

*Drosophila melanogaster* vem sendo utilizada desde o início do século XX em trabalhos de diversas áreas da biologia e assim se consolidou como um organismo modelo. Outras espécies de *Drosophila* também se tornaram alvos de pesquisa e estes trabalhos contribuem continuamente para o conhecimento da evolução desse táxon. Atualmente mais de 1000 grupos de pesquisas estão distribuídos pelo mundo trabalhando com espécies do gênero *Drosophila* (Clark *et al*, 2003); cada vez mais este gênero continua a contribuir com descobertas importantes para as ciências biológicas.

#### I.1. O grupo e a radiação tripunctata

Segundo Throckmorton (1975) o subgênero *Drosophila* é procedente do subgênero *Sophophora*, dando origem a vários gêneros e subgêneros e, particularmente, a duas radiações: *virilis-repleta* e *immigrans-Hirtodrosophila*. Esta última teve origem paleotropical, onde inicialmente se diversificou e se expandiu, enviando a radiação *tripunctata* aos Neotrópicos, onde sofreu uma diversificação importante originando o grupo *tripunctata*, além de : *calloptera, cardini, guaramunu, guarani, macroptera, pallidipenis, rubifrons* e *sticta*.

O grupo *tripunctata*, com 79 espécies (Bächli, 2009), é o segundo maior grupo neotropical em número de espécies, menor apenas que o grupo *repleta* (Vilela, 1992). Tratase de um grupo bastante abundante em áreas florestais – principalmente no Sul do Brasil e no período de inverno – sendo raramente encontrado no Cerrado, ausente na Caatinga, e dificilmente achado em regiões urbanizadas (Sene *et al.*, 1980; Klaczko, 1995, 2006; Saavedra *et al.*, 1995). O grupo *tripunctata* é quase estritamente neotropical e a sua distribuição se estende desde o leste dos Estados Unidos e América Central até a América do Sul (Throckmorton, 1975). Talvez por essas características de sua distribuição possa servir como um indicador do grau de perturbação em nossas matas. Frota-Pessoa (1954) dividiu o grupo *tripunctata* em quatro subgrupos, com base em caracteres morfológicos. Vilela (1992) apontou que, com exceção de algumas espécies que obviamente têm estreita relação, o agrupamento nos subgrupos pode ser bastante artificial.

Segundo Throckmorton (1975), o grupo *tripunctata* não é monofilético, o que está de acordo com as conclusões de Kastritsis *et al.* (1970) baseadas em estudos citológicos. Três estudos recentes, envolvendo sistemática molecular da radiação *tripunctata* (Yotoko *et al.*, 2003; Robe *et al.*, 2005; Hatadani *et al.*, 2009), reforçaram a hipótese de que o grupo *tripunctata* não pode ser considerado monofilético. Porém, estes mesmos três trabalhos mostraram, de acordo com as idéias do Throckmorton, que a radiação *tripunctata* é uma grande linhagem monofilética.

Este projeto se insere num amplo contexto de compreender a evolução da radiação *tripunctata* de *Drosophila*. Para isso foram usadas duas abordagens: a) analisamos a posição do rDNA nos cromossomos mitóticos de 16 espécies da radiação *tripunctata*; b) com cromossomos politênicos, focalizamos nossa atenção no estudo detalhado de um agrupamento monofilético de três espécies dentro do grupo *tripunctata – Drosophila mediopunctata* (Dobzhansky & Pavan, 1943), *Drosophila unipunctata* (Patterson & Mainland in Patterson, 1943) *e Drosophila roehrae* (Pipkin & Heed, 1964)) – usando métodos de citogenética clássica e molecular.

#### I.2. Cromossomos no gênero Drosophila

Duas abordagens são frequentemente usadas para estudar cromossomos no gênero *Drosophila*. Uma, que utiliza cromossomos mitóticos ou meióticos e se preocupa mais com uma visão geral dos cariótipos das espécies estudadas. Para os cromossomos mitóticos, existe a possibilidade de utilizar métodos clássicos de bandeamento ou, além disso, usar a metodologia de hibridação *in situ* com sondas de genes de múltiplas cópias, uma vez que os cromossomos mitóticos de *Drosophila* são muito pequenos e genes de cópia única são dificilmente visualizados;neste caso, o gene que codifica o rDNA tem sido utilizado amplamente (Roy *et al.*, 2005; Loreto *et al.*, 2008).

A outra abordagem utilizaos cromossomos politênicos que, por apresentarem alta resolução de padrão de bandas, são material propício a estudos de rearranjos cromossômicos e determinação de homologias entre espécies (Powell, 1997).

No gênero *Drosophila* em geral, o conteúdo gênico dos elementos cromossômicos pouco varia. A manutenção do conteúdo dos genes nos braços cromossômicos deve-se à escassez de rearranjos entre estes braços ou seja, inversões pericêntricas e translocações são raras (Clayton & Guest, 1986; Powel, 1997).

Dentro de cada elemento, porém, a ordem dos genes pode mudar pois as inversões paracêntricas ocorrem com relativa freqüência em *Drosophila* (Hoffmann *et al.*, 2004; 2008). Características especiais na meiose evitam os efeitos negativos de inversões paracêntricas: na meiose masculina não há "crossing-over" e, deste modo, não é gerado nenhum recombinante aneuplóide de gametas dicêntricos ou acêntricos; na meiose feminina, onde o "crossing-over" ocorre, os cromossomos recombinantes dicêntricos ou acêntricos são eliminados nos corpúsculos polares antes que o gameta se torne funcional (Sturtevant & Beadle, 1936).

Quando surge uma inversão paracêntrica em um elemento cromossômico, a seleção pode favorecê-la, se ela mantiver combinações epistáticas favoráveis no segmento invertido (Dobzhansky 1949; Otto & Barton 2001), ou se este rearranjo reorganizar genes em grupos coordenadamente expressos (Spellman & Rubin 2002; Lercher *et al.*, 2003, Santos, 2009). As inversões paracêntricas são altamente polimórficas nas populações de muitas espécies de *Drosophila* (González *et al.*, 2006), e algumas destas inversões tornam-se fixas durante a especiação. Deste modo as inversões cromossômicas podem ser usadas para estudar a história evolutiva de um grupo de espécies (Sturtevant & Dobzhansky,1936; Carson, 1992; Wasserman, 1992; Rohde *et al.*, 2006; Schaeffer *et al.*, 2008).

As inversões pericêntricas e translocações são, realmente, bem mais raras em *Drosophila*. Isso porque estes rearranjos cromossômicos, diferentemente das inversões paracêntricas, têm conseqüências negativas devido aos efeitos deletérios de segmentos aneuplóides que podem ser gerados pela segregação entre cromossomos recombinados com translocações ou inversões pericêntricas (Swanson *et al.*, 1981).

# I.3. RDNA

Nos eucariotos, os genes de RNA ribossômico estão presentes em múltiplas cópias (Hirai *et al.*, 1998; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; Busin *et al.*, 2007, Paredes & Maggert, 2009). Estes genes são compostos por DNA ribossômico também chamado de rDNA.

O rDNA é uma família multigênica composta de um ou mais aglomerados de unidades de repetição (RU). Cada unidade consiste de seqüências altamente conservadas (Ganley & Kobayashi, 2007) que codificam os rRNAs 18S, 5.8S e 28S, são separadas por espaçadores internos de transcrição e espaços intergênicos.. Em *Drosophila*, bem como em outros insetos, algumas RU são interrompidas por elementos de retrotransposição, além da unidade 2S que também está presente (Glover, 1977; Stage & Eickbush, 2007).

Citogeneticamente os rDNAs são visíveis como regiões organizadoras do nucléolo (NORs) quando estão transcricionalmente ativos. O rDNA tem sido utilizado como marcador molecular para sistemática e reconstrução filogenética, tanto pela análise de seqüência nucleotídica (Halanych, 2005), quanto por sua localização (Roy *et al.*, 2005; Loreto *et al.*, 2008), e também como modelo de evolução para famílias multigênicas (Schlötterer & Tautz, 1994; Polanco *et al.*, 1998).

Investigando um extenso espectro de organismos (fungos, animais e plantas) já se verificou que a organização, tamanho e quantidade de repetições da unidade básica são altamente variáveis (John & Miklos, 1988; Shishido *et al.*, 2000; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; Singh *et al*, 2009).

Posição e número de NORs nos cromossomos têm sido investigados em espécies altamente relacionadas e também entre indivíduos da mesma espécie, mostrando que estes genes, quando estão localizados na heterocromatina, em alguns casos podem se rearranjar rapidamente, como por exemplo nos gafanhotos (Veltsos, Keller & Nichols, 2009) e nos besouros (Sánchez-Gea *et al.*, 2000). Porém eles podem ser constantes e bem conservados em outros casos, como nos dípteros, onde parece que a localização do rDNA está vinculada aos cromossomos sexuais (Marchi & Pili, 1994; Roy *et al.*, 2005; Goday *et al.*, 2006).

Cabrero & Camacho (2008) analisaram a localização do rDNA, através da técnica de FISH em 49 espécies de gafanhoto, 47 de uma única família (Acrididae). Acharam um número médio de 2,47 posições de rDNA no cariótipo haplóide das espécies envolvidas; porém foi identificada alta variação entre espécies, com algumas apresentando até nove ou dez diferentes localizações do rDNA. No entanto, numa amostra de cinco espécies de gafanhotos Neotropicais, também da família de Acrididae, uma variação menor na localização do rDNA foi achada e este fato foi atribuído à falta de elementos de transposição (Loreto *et al.*, 2008). Outro exemplo de rápido rearranjo e diversidade do padrão de distribuição da

localização do rDNA nos cromossomosde espécies próximas é na ordem Coleoptera, onde o padrão de distribuição do rDNA varia entre as diferentes tribos. Nas tribos Carabini e Harpalini o rDNA normalmente ocorre em só um par de autossomos (De la Rúa *et al.*, 1996; Martínez-Navarro *et al.*, 2004)o que não é observado nas tribos Cicindelini, Scaritini e Zabrini, que mostram alta variação (Galián *et al.*, 1995; Galián *et al.*, 1999; Sánchez-Gea *et al.*, 2000). Em Zabrini, Sánchez-Gea *et al.* (2000) estudaram 19 táxons onde foram detectadas variações quantitativas e qualitativas entre as espécies, subespécies, populações, e mesmo indivíduos. O número de cromossomos com rDNA variou de 2 a 12.

Estudos de genes rDNA ajudam a entender a relação genes-heterocromatina e também a resolver questões filogenéticas de espécies proximamente relacionadas. Dados a respeito do número e localização de NORs no gênero *Drosophila* são muito fragmentados; até o momento apenas 32 espécies de *Drosophila* já tinham sido estudadas sob este aspecto.

## I.4. Os elementos de Muller

Muller (1940) e Sturtevant & Novitski (1941) propuseram que o cariótipo ancestral de *Drosophila* devia ser formado por cinco pares de cromossomos grandes (elementos A, B, C, D e E) e um par de cromossomos pontuais (elemento F); e que os diferentes cariótipos seriam derivados de um simples rearranjo dos braços cromossômicos pela fusão ou fissão cêntrica (Clayton & Guest, 1986).

Deste modo, foi possível o estabelecimento de um sistema de nomenclatura comum para todo gênero, no qual os diferentes cromossomos ou braços cromossômicos correspondem a um dos seis elementos propostos (elementos de Muller: A, B, C, D, E e F) (Patterson & Stone, 1952; Ashburner & Berendes, 1978; Throckmorton, 1982; Ranz *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2005; Bhutkar *et al.*, 2008; Schaeffer *et al.*, 2008).

Esta hipótese foi testada através de diferentes estudos comparativos: análise de desequilíbrio de ligação de genes que apresentam homologia em diferentes espécies (Suttervant & Novitski, 1941; Patterson & Stone, 1952); emparelhamento de regiões aparentemente homólogas de cromossomos politênicos em híbridos interespecíficos (Throckmorton, 1982; Krimbas & Loukas, 1984); comparação de padrões de bandas dos cromossomos politênicos (muito eficaz para analisar espécies proximamente relacionadas) (Stalker, 1972; Yoon *et al.*, 1972); e similaridade de padrões de "puffs" nos cromossomos

durante o desenvolvimento das larvas (Ashburner & Berendes, 1978). Os resultados destes estudos geralmente confirmaram a proposta de Muller. Todavia, por mais bem sucedidos que sejam estes estudos, eles apresentam um problema: geralmente não conseguem demonstrar diretamente a similaridade das seqüências entre locos homólogos. Este problema pode ser resolvido utilizando ferramentas moleculares como a localização física de genes ou fragmentos de DNA específicos pela técnica de hibridação *in situ* e a comparação de genomas sequenciados.

Até agora tem sido relatado que genes ortólogos estão localizados no mesmo elemento de Muller em diferentes espécies de *Drosophila* (Sturtevant & Novitski 1941; Richards *et al.*, 2005). Em poucos casos excepcionais, os genes se movimentam entre os braços cromossômicos (Gonzalez *et al.*, 2004; Bhutkar *et al.*, 2007b). Recentemente a comparação dos blocos sintênicos, entre 12 espécies do gênero *Drosophila*, com genomas inteiramente seqüenciados, confirmou que os elementos de Muller são muito conservados. Os genes estão, em grande parte (95%), localizados no mesmo elemento e as inversões paracêntricas são o mecanismo dominante para embaralhar a ordem de genes ao longo de um cromossomo (Bhutkar *et al.*, 2008; Schaeffer *et al.*, 2008).

#### I.5. Cromossomos em D. mediopunctata, D. unipunctata e D. roehrae

Diferentes trabalhos usando métodos de filogenia molecular têm proposto que *D. mediopunctata D. unipunctata* e *D. roehrae* são espécies altamente relacionadas (Yotoko *et al.*, 2003; Robe *et al.*, 2005; Hatadani *et al.*, 2009). Este fato, também já tinha sido mencionado ao analisar a morfologia destas espécies (Pipkin & Heed, 1964; Patterson & Mainland, 1943).

É relativamente fácil identificar morfologicamente *D. mediopunctata* entre as espécies do grupo *tripunctata* (Vilela, 1992), porém esta identificação deixa de ser tão fácil ao comparar *Drosophila mediopunctata* e *D.unipunctata* e torna-se ainda mais difícil quando ambas são comparadas a *D. roehrae*. Isto não surpreende, uma vez que estas espécies são proximamente relacionadas.

*Drosophila mediopunctata* possui cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par pontual, que não se politeniza. Kastritsis (1966) publicou um mapa e um fotomapa preliminares para os cromossomos politênicos desta espécie. Posteriormente, Ananina *et al.* 

(2002) publicaram um novo mapa mais detalhado, caracterizando as inversões cromossômicas (marcando pontos de quebra) que ocorrem nesta espécie. Esta espécie possui alto grau de polimorfismo de inversões, que já foi bastante estudado apresentando inversões polimórficas nos cromossomos X, II e IV. O cromossomo II é o mais polimórfico com 17 inversões descritas. Didaticamente pode-se agrupar estas inversões em dois grupos: proximal ou distal, em função de sua localização. O grupo distal inclui 8 inversões (DA, DI, DS, DP, DV, DR, DL e DJ) e o proximal, 9 inversões (PC0, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PB0, PA0 e PA8) (Peixoto & Klaczko, 1991; Ananina et al., 2002). Teoricamente todas as combinações entre as inversões proximais e distais podem ocorrer, porém há um grande desequilíbrio de ligação entre elas: em uma amostra de 2130 cromossomos da população do Itatiaia, das 72 combinações possíveis só 31 foram encontradas (Peixoto & Klaczko 1991). Por exemplo, DA está fortemente associada com PAO com um coeficiente de desequilíbrio de ligação (D') com o valor de 0,98. Do mesmo modo, DP está associada com PC0 (D'= 0,97) e DS com PC0 (D'=0,95) (Peixoto & Klaczko, 1991). Além disto, observou-se um cline altitudinal e uma oscilação temporal cíclica nas freqüências de inversões compatíveis com uma resposta adaptativa às alterações de temperatura no campo (Ananina et al., 2004). No cromossomo X foram detectadas 3 inversões e no cromossomo IV uma (Carvalho et al., 1989; Klaczko et al., 1990; Peixoto & Klaczko, 1991).

*Drosophila roehrae* também apresenta o cariótipo na conformação ancestral: 5 pares de grandes cromossomos e um par de pontuais (Pipkin & Heed, 1964). Porém para esta espécie, até agora não havia fotomapa, mapa ou estudo do polimorfismo de inversões de seus cromossomos politênicos.

*Drosophila unipunctata,* apesar da proximidade filogenética, apresenta uma conformação cariotípica singular em relação a *D. mediopunctata* e *D. unipunctata.* Podem-se notar algumas peculiaridades como: duas fusões cêntricas originando dois pares de cromossomos metacêntricos, uma inversão pericêntrica no cromossomo X. e um par de cromossomos pontuais que se politeniza além do par que não se politeniza (Kastritsis, 1966). Esta espécie também teve seu mapa e fotomapa publicados por Kastritsis (1966) onde foram apontados 12 pontos de quebra de inversões no cromossomo 2L (elemento E), 12 pontos no cromossomo 3R (elemento C) e 2 pontos no cromossomo X (elemento A).

#### I.6. Mapas de cromossomos politênicos

Painter (1934) pela primeira vez observou cromossomos politênicos em *Drososophila* e, desde então, eles tornaram-se uma ferramenta importante para localização de genes, para detectar diversidade genética dentro das populações, e para inferir filogenia entre espécies relacionadas (Dobzhansky & Sturtevant, 1938; Ashburner & Lemeunier, 1976; Rohde *et al.*, 2006; Schaeffer *et al.*, 2008, Andreyenkova *et al.*, 2009).

Cromossomos politênicos têm-se mostrado especialmente valiosos na análise genética de *Drosophila* e outros dípteros. Até agora, cerca de 300 espécies de drosofilídeos possuem mapas de cromossomos politênicos disponíveis (para revisão, ver Ashburner, 1992; O'Grady *et al.*, 2001).

#### I.7. Inferências evolutivas usando cromossomos politênicos

A evolução cromossômica no gênero *Drosophila* pode ser investigada em três níveis organizacionais: citológico, gênico e DNA. Estudos citológicos têm tradicionalmente focado o padrão de bandas dos cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas do terceiro estágio. Este padrão de bandas tem sido amplamente utilizado em estudos evolutivos para inferir relações taxonômicas através de comparações entre espécies próximas. Importantes resultados já foram obtidos para várias espécies e grupos do gênero *Drosophila*: *D. pseudoobscura* (Sturtevant & Dodzhansky, 1936), espécies havaianas de *Drosophila* (Clayton, Carson & Sato, 1972), grupo *saltans* (Bicudo, 1973) grupo *melanogaster* (Lemeunier, David & Tsacas, 1986), grupo *virilis* (Throckmorton, 1982), grupo *repleta* (Wasserman, 1982) e espécies do grupo *willistoni* (Rohde *et al.*, 2006). Entretanto, este tipo de comparação é muito pouco informativo entre espécies de grupos diferentes, pois o número de mudanças ocorridas entre os cromossomos pode dificultar o estabelecimento de homologias entre os segmentos destes.

Recentemente, seqüências nucleotídicas têm complementado este método tradicional. Um estudo que compara estes dois métodos demonstrou que os dados obtidos com cromossomos politênicos e com seqüências nucleotídicas são altamente congruentes, porém algumas vezes isto não ocorre; nestes casos, os dados obtidos pelos cromossomos politênicos são mais informativos, provavelmente devido a alta consistência deste caráter (O'Grady *et al.*, 2001)decorrente da diferença das possibilidades de mudanças nas seqüências

nucleotídicas e cromossomos politênicos. Um nucleotídeo apresenta apenas quatro possibilidades de estado, enquanto que quebras cromossômicas podem ocorrer em vários pontos do cromossomo. Do mesmo modo, o estudo simultâneo de seqüências nucleotídicas e caracteres morfológicos para subsidiar estudos filogenéticos mostrou-se eficaz (Remsen & O'Grady, 2002; Meier & Wiegmann, 2002; Near *et al.*, 2003; Hodges e Zamudio, 2004).

Outra técnica que tem sido amplamente utilizada como uma alternativa relativamente prática para complementar estudos de filogenia é a localização de genes através de hibridação *in situ* (Pardue *et al.*, 1970). A comparação da ordem dos genes entre espécies permite traçar ancestralidade (Carson, 1987) e estimar a taxa de evolução cromossômica desde a divergência de um ancestral comum (Ranz, Casals & Ruiz, 2001; Koch & Kiefer, 2005; Bartolomé & Charlesworth, 2006; Schulze *et al.*, 2006).

### I.8. Utilização da localização de genes na determinação da homologia cromossômica

As técnicas de hibridação *in situ* (Pardue & Gall, 1969) e, posteriormente, a *"fluorescent in situ hybridization"* (FISH) permitiram confirmar as homologias cromossômicas propostas para diferentes grupos e estabelecer outras pela primeira vez localizando fragmento de seqüências de genes em diferentes espécies (Steineman *et al.*, 1984; Whiting *et al.*, 1989; Papaceit & Juan, 1993; Cuenca *et al.*, 1998; Bondinas *et al.*, 2002; Saura *et al.*, 2002; Bachtrog & Charlesworth, 2003; Michailova *et al.*, 2009). Desta maneira, tem sido possível identificar a homologia entre os cromossomos de espécies deste gênero, diretamente. As homologias cromossômicas além de se estenderem por todo gênero *Drosophila* têm também sido constatadas em outras espécies de dípteros, como por exemplo: mosquitos do gênero *Aedes*, a mosca *Lucilia cuprina* e a mosca *Musca domestica*. Desta maneira já se propôs que a conservação do conteúdo genético dos elementos cromossômicos poderia ser uma característica comum na evolução cariotípica dos dípteros (Heckel, 1993).

Estudos de homologias cromossômicas também vêm sendo amplamente realizados em espécies fora do gênero *Drosophila* (Gerbault-Serreau *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2005; DeSalle *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Perrocheau *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2006; Engelbrecht *et al.*, 2006; Trifonov *et al.*, 2008).

## **II. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

Apesar da importância ecológica e filogenética do grupo *tripunctata*, poucas de suas espécies foram bem estudadas. As mais estudadas são *D. tripunctata* e *D. mediopunctata*. *Drosophila tripunctata* é a única espécie do grupo presente na América do Norte e já foi objeto de vários estudosde genética de populações (Jaenike *et al.*, 1985, 1986), comportamento (McDaniel *et al.*, 1995; Jaenike, 1987) e resistência a altas temperaturas (Seager, 1991), entre outros. Já *D. mediopunctata* vem sendo estudada em diversos aspectos em nosso laboratório (Klaczko, 2006).

O estudo de *D. mediopunctata* é interessante, pois esta espécie apresenta características que contrastam com as de outras espécies do gênero muito estudadas (Klaczko, 1995; 2006). Em particular, pode-se mencionar: seu ciclo de vida longo com maior longevidade, sua fecundidade relativamente mais baixa e também o fato de estar melhor adaptada a temperaturas mais baixas. Desta forma, a biologia peculiar da espécie pode vir a revelar aspectos não observados em outras espécies modelos mais estudadas, como *D. melanogaster*, por exemplo.

Há mais de vinte anos, Klaczko e colaboradores iniciaram trabalhos com o objetivo de transformar *D. mediopunctata* num organismo modelo. Neste período, além de descobrir novos dados relacionados à espécie, desenvolveram novos métodos e obtiveram vários resultados com implicações gerais como, por exemplo: o método da elipse para a descrição da morfologia das asas de *Drosophila* (Klaczko & Bitner-Mathé, 1990) o teste experimental do Princípio de Fisher (Carvalho *et al.*, 1989) e a correlação entre valor médio de um caráter e sua norma de reação (Rocha *et al.*, 2009).

O desenrolar dos trabalhos levou, naturalmente, a ampliação do horizonte da pesquisa para incluir espécies do grupo *tripunctata* – e, como este não é monofilético, houve também a inclusão de espécies de outros grupos da radiação *tripunctata* de *Drosophila*. O presente trabalho está inserido neste contexto, no qual se busca compreender a evolução de espécies da radiação *tripunctata*. Para isso, focamos as análises de cromossomos nestas espécies, utilizando duas abordagens distintas. Primeiramente, nós nos preocupamos com um enfoque mais generalista onde analisamos a posição do rDNA nos cromossomos mitóticos de espécies da radiação *tripunctata*, desta forma criando uma visão geral das conformações cariotípicas. Posteriormente, focalizamos nossa atenção no estudo detalhado de um

agrupamento monofilético dentro da filogenia do grupo *tripuntata*, utilizando cromossomos politênicos: o agrupamento de espécies relacionadas com *D. mediopunctata* (*D. mediopunctata*, *D. unipunctata e D. roehrae*). Neste caso utilizamos métodos de citogenética clássica e molecular, com o intuito de produzir fotomapas para as três espécies envolvidas; identificar os elementos cromossômicos de Muller; e caracterizar as inversões cromossômicas encontradas em amostras de *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

A primeira ferramenta importante que deve ser desenvolvida para subsidiar estudos envolvendo cromossomos politênicos são seus mapas ou fotomapas, pois estes são utilizados para localização de genes, para detectar diversidade genética dentro das populações e para inferir filogenia entre espécies relacionadas.

Como mencionado anteriormente, *D. mediopunctata* e *D. unipunctata* já possuíam um mapa e fotomapa publicados, porém há mais de 50 anos e, desta forma, com baixa resolução impossibilitando estudos mais refinados, como por exemplo, comparação qualitativa do padrão de bandas entre as espécies. Foi nesse intuito que nos propusemos a refazer estes fotomapas com maior resolução que os anteriores,além de apresentar também um fotomapa inédito de *D. roehrae*, espécieestreitamente relacionada filogeneticamente a *D. mediopunctata* e *D. unipunctata*.

Também fizeram parte deste trabalho a identificação dos elementos de Muller destas espécies e a descrição do polimorfismo de inversões cromossômicas das espécies *D. unipunctata* e *D. roehrae.* A identificação dos elementos de Muller facilita as comparações destes elementos entre espécies proximamente relacionadas, além de potencialmente permitir comparações com outras espécies mais distantes, o que torna o estudo da evolução cromossômica deste grupo um modelo ainda mais atraente e interessante.

## **II.1. Objetivos Específicos**

#### Sendo assim os objetivos específicos deste trabalho foram:

1- Examinar a variação da posição dos genes codificantes do RNA ribossomal (rDNA) em espécies da radiação *tripunctata*.

2- Produzir fotomapas de cromossomos politênicos das espécies *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

3- Identificar os elementos cromossômicos de Muller pela localização, através de hibridação *in situ*, de genes de *D. melanogaster* em cromossomos politênicos das espécies *D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

4- Caracterizar as inversões cromossômicas (pontos de quebra) que ocorrem em populações de *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

## III. ORGANIZAÇÃO DA TESE E CONTRIBUIÇÃO DA AUTORA

Esta tese está organizada da seguinte forma: Introdução geral; dois capítulos (cada um referente a um artigo); um apêndice; e uma conclusão geral.

O primeiro artigo "**Comparative Analysis of the Chromosomal Positions of rDNA Genes in Species of the** *tripunctata* **Radiation of** *Drosophila*" foi publicado na revista "*Cytogenetic and Genome Research*", e contempla o objetivo 1 acima citado.

O segundo artigo "Fotomapas, Polimorfismo de Inversões e Identificação dos Elementos de Muller dos Cromossomos Politênicos de Três Espécies do Grupo *tripunctata* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)" está em fase final de preparação e deve ser enviado em breve para publicação. Este trabalho abrange os outros três objetivos assinalados (objetivos 2, 3 e 4).

No apêndice apresentamos uma comparação prévia dos elementos cromossômicos B e D das espécies *D. mediopunctata, D. unipunctata, D. roehrae.* E para encerrar apresentamos a conclusão geral do trabalho.

Este trabalho se insere na linha de pesquisa do Laboratório de Biodiversidade Genética e Evolução de *Drosophila* que visa compreender a evolução da radiação *tripunctata* de *Drosophila*. Desta forma, alguns resultados apresentados no segundo artigo desta tese ["Fotomapas, Polimorfismo de Inversões e Identificação dos Elementos de Muller dos Cromossomos Politênicos de Três Espécies do Grupo *tripunctata* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)"], são fruto dos esforços de uma das coautoras do trabalho. Ou seja, dos resultados relatados naquele capítulo, sou responsável pelo desenvolvimento de: a) fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. roehrae*; b) parciamente do fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. unipunctata*; c) levantamento dos rearranjos de inversões cromossômicas e marcação dos pontos de quebra das inversões nestes fotomapas; d) todas as hibridações *in situ*; e) as interpretações das hibridações para identificação do elementos de Muller.

Naturalmente, sou responsável por toda a parte experimental do primeiro trabalho.

V.1. Artigo 1

Comparative Analysis of the Chromosomal Positions of rDNA Genes in Species of the tripunctata Radiation of Drosophila

Publicado no periódico: Cytogenetic and Genome Research, 2009.

# **Original Article**

Cytogenetic and Genome Research

Cytogenet Genome Res 2009;125:149–157 DOI: 10.1159/000227840 Accepted after revision: April 2, 2009 by M. Schmid

# Comparative Analysis of the Chromosomal Positions of rDNA Genes in Species of the *tripunctata* Radiation of *Drosophila*

M.T. Brianti<sup>a</sup> G. Ananina<sup>a</sup> S.M. Recco-Pimentel<sup>b</sup> L.B. Klaczko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética e Evolução, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, and <sup>b</sup>Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

#### **Key Words**

Drosophila • FISH • Fluorescence in situ hybridization • Heterochromatin • NOR

#### Abstract

The location of rDNA on chromosomes has been found to be highly variable in different groups of insect families of various orders. Yet, in other insect families the rDNA position is relatively constant. This contrast so far has received limited attention. We investigated the rDNA position on mitotic chromosomes in 18 species of Drosophila, 16 of which are from the tripunctata radiation, subgenus Drosophila, through fluorescent in situ hybridization (FISH). All species showed fluorescent signals only on the sex chromosomes. On the X chromosome a single fluorescent mark, but with variable locations, was found. On the Y, we observed variation both in location and in number of fluorescent marks (from 1 to 5). This constancy of chromosome location, in contrast to the great variability found in other groups, is consistent with the work carried out in other species of Drosophila. This suggests that the presence of a nucleolus organizer region (NOR) on each sex chromosome is probably an ancestral condition in the genus. Moreover, this difference in the variation of rDNA position among groups points out an interesting evolution question, which deserves further study.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax +41 61 306 12 34 E-Mail karger@karger.ch www.karger.com 1424-8581/09/1252-0149\$26.00/0 Accessible online at: www.karger.com/cgr

© 2009 S. Karger AG, Basel

In all eukaryotes, ribosomal RNA genes, also called ribosomal DNA (rDNA), are a multigene family, consisting of one or more clusters of repeat units (RU). Each unit consists of highly conserved sequences [Ganley and Kobayashi, 2007]. These sequences, which encode the 18S, 5.8S, and 28S rRNAs, are separated by internal transcribed spacers and intergenic spacers [for reviews, see Moore and Steitz, 2002; Fromont-Racine et al., 2003]; in *Drosophila*, as well as in other insects, a 2S unit is also present in the RU [Glover, 1977; Stage and Eickbush, 2007].

When transcriptionally active, the rDNA is cytologically visible as nucleolus organizer regions (NOR). rDNA has been used as a molecular marker for systematics and phylogenetic reconstruction, both through the analysis of the nucleotide sequence [Halanych et al., 2005; Stage and Eickbush, 2007], and through its location on the chromosomes [Roy et al., 2005; Loreto et al., 2008]. The investigation of a large spectrum of organisms (fungi, animals, and plants) has revealed that the rDNA chromosomal location is highly variable, sometimes found restricted to the sex chromosomes while in other cases in all chromosomes [John and Miklos, 1988; Tsuchiya and Taga, 2001; Shishido et al., 2000; Veiga-Menoncello et al., 2003].

Louis B. Klaczko, Departamento de Genética e Evolução

Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas

UNICAMP, CP 6109, Campinas, São Paulo 13083-970 (Brazil)

Tel. +55 19 3521 1150, Fax +55 19 3521 6235, E-Mail lbk@unicamp.br

In insects data related to the number and location of NORs are scattered and in many groups there is large variation. In grasshopper, for example, there is high variation for rDNA location among species within most genera studied [Cabrero and Camacho, 2008].

In Diptera there seems to be a general tendency for the rDNA to be found on the sex chromosomes [Marchi and Pili, 1994]; but in various families, besides the sex chromosome position, there is an additional presence of rDNA in some autosomes. However, there are few cases where rDNA is found on the autosomes, but not in the sex chromosomes [Parise-Maltempi and Avancini, 2001; Stuart et al., 1981; Roy et al., 2005]. In the Hawaiian Drosophilids, 2 species of the *Idiomyia* genus, *I. sylvestris* and *I. heteroneura*, show rDNA exclusively in the autosomes [Stuart et al., 1981]. Actually the taxonomic position of these species is still a controversial matter, and they are sometimes classified as *Drosophila* [Grimaldi, 1990; Da Lage et al., 2007; Magnacca and O'Grady, 2008].

Data in the genus *Drosophila* are scarce and very fragmented. So far, a little more than 30 species have been studied by various authors for this aspect, but they are concentrated in only 2 species groups (*repleta* and *melanogaster*).

Species from the *ananassae* and *melanogaster* subgroups were recently studied for the position of rDNA through in situ hybridization (FISH) helping to settle phylogenetic questions, such as the relation between the species *D. sechellia*, *D. simulans*, and *D. mauritiana* [Roy et al., 2005]. These species had already been studied with other techniques (allozymes, gene sequence data and microsatellites), but there was little congruence among the results. With this methodology, the authors proposed that *D. sechellia* and *D. simulans* are closely related. Both species, in contrast to *D. mauritiana*, have no NOR on the Y chromosome; but 2 sites of a 240-bp NOR intergenic repeat sequence were detected on this chromosome.

Throckmorton [1975] recognized that the subgenus *Drosophila* was in fact a major radiation stemming out of the *Sophophora* subgenus and giving rise to various subgenera and genera, and particularly to 2 important radiations: *virilis-repleta* and *immigrans-Hirtodrosophila*. According to this author, the latter had a paleotropical origin, where it initially diversified and from where it expanded, sending the *tripunctata* lineage to the Neotropics; where it suffered a major radiation originating the species groups *tripunctata* and *guarani*, among others. The *tripunctata* group was divided into 4 subgroups, based on morphologic characters [Frota-Pessoa, 1954];

although, Vilela [1992] indicated that this grouping could be rather artificial. Moreover, several authors have pointed out that the *tripunctata* group is not monophyletic [Kastritsis et al., 1970; Throckmorton, 1975]. Two recent studies covering the molecular systematics of the *tripunctata* radiation [Yotoko et al., 2003; Robe et al., 2005] reinforced the hypothesis that the *tripunctata* group and subgroups proposed by Frota-Pessoa [1954] cannot be considered monophyletic groups. Yet both studies showed, in accordance with Throckmorton's ideas, that the *tripunctata* radiation is a large and speciose monophyletic lineage.

Our study focuses on the *tripunctata* radiation, with emphasis on the tripunctata group; this is the second largest Neotropical group in number of species (79 species), second only to the *repleta* group [Vilela et al., 1983; Vilela, 1992; Bächli, 2008]. The tripunctata group is almost strictly Neotropical and its distribution spans from Florida and Central America to South America [Throckmorton, 1975]. It is rather abundant in forest areas, especially in the South of Brazil [Saavedra et al., 1995; Klaczko, 2006]. In Brazil, an important species from the tripunctata group is D. mediopunctata. Several aspects of its biology make it an interesting model for studying the genetics of natural populations and various research studies characterizing its evolutionary biology have been carried out [Klaczko and Bitner-Mathé, 1990; Ananina et al., 2002; for a review, see Klaczko, 2006].

In the current study we investigated the rDNA position – through in situ hybridization on mitotic chromosomes – in 18 species of subgenus *Drosophila*, 16 of which are from 2 different groups of the *tripunctata* radiation: 11 species from the *tripunctata* group, 5 from the *guarani* group, with 2 of the *guarani* subgroup and 3 of the *guaramunu* subgroup. We also analyzed a species from the *repleta* group and another one from the *immigrans* group. Our objective was to analyze the evolution of the rDNA position among the species of the *tripunctata* radiation.

## **Materials and Methods**

#### Biological Material

Table 1 shows a list of the species studied. The larvae used were from live cultures routinely maintained in our laboratory.

#### Chromosomal Preparations

Mitotic chromosomes were obtained from the cerebral ganglion of fourth-instar larvae using hypotonic treatment. They then were fixed for 1 min in methanol:acetic acid:water (11:11:2;

Species group	Species subgroup	Species	Origin
tripunctata	Ι	D. nappae	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
-	II	D. mediopunctata	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
		D. unipunctata	Colinas do Atibaia (Campinas, SP)
		D. roehrae	Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ)
		D. paraguayensis	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
		D. cuaso	Bosque dos Jequitibás (Campinas SP)
		D. mediosignata	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
	III	D. frotapessoai	Colinas do Atibaia (Campinas, SP)
		D. paramediostriata	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
		D. mediostriata	Colinas do Atibaia (Campinas, SP)
	IV	D. metzii	Bosque dos Jequitibás (Campinas, SP)
guarani	guaramunu	D. maculifrons	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
		D. guaraja	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
		D. griseolineata	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
	guarani	D. guaru	Colinas do Atibaia (Campinas, SP)
		D. ornatifrons	Serra do Japi (Jundiaí, SP)
virilis	virilis	D. virilis	Barreiro Rico (Anhembi, SP)
immigrans	immigrans	D. immigrans	Colinas do Atibaia (Campinas, SP)

Table 1. List of the	species analy	yzed with	locality	of origin
----------------------	---------------	-----------	----------	-----------

vol/vol) and placed on acid-washed slides with one drop of 60% acetic acid, then they were squashed under siliconized coverslips. The preparations were held at -20°C for at least 30 min and then immersed in liquid nitrogen. After 1 min, the coverslips were removed by inserting a surgical blade between the slide and the coverslip. The slides were stored at -10°C until use [Ashburner, 1989].

#### Fluorescence in situ Hybridization

The ribosomal DNA probe used was pDm238. It contains the 18S, 5.8S, 2S, 28S genes plus intergenic spacers of Drosophila melanogaster, inserted in pBR322 plasmid [Rohia et al., 1981]. The probe was labeled with biotin-16-dUTP by nick-translation and the sites of hybridization were detected by immunocytological reaction with fluorochrome-conjugated avidin (FISH). The slides were pretreated in  $2 \times$  SSC at  $37^{\circ}$ C and dehydrated. The probe was denatured for 10 min at 100°C and the slides were denatured in 70% formamide solution at 70°C. The probe was then deposited on the slide (10  $\mu$ l per slide) and covered with a plastic coverslip. Hybridization was performed at 37°C overnight in a humidified chamber. After removing the plastic coverslip, the slides were washed 3 times for 5 min in PBT, and stained with propidium iodide [Viegas-Péquignot, 1992]. They were observed and photographed successively under an Olympus epifluorescence microscope using 2 different filters: one for revealing the hybridization signal (fluorochrome fluorescein isothiocyanate, excitation occurs at  $\lambda$  494 nm and emission at  $\lambda$ 521 nm) and the other for the chromosome structure stained with propidium iodide (excitation occurs at  $\lambda$  536 nm and emission at  $\lambda$  617 nm). The photographs were captured with an Olympus Q-color 3 camera and composed using the program

Image Pro Plus and Adobe Photoshop to generate figure 1. From each species at least 3 individuals were analyzed and from each larva at least 30 cells were observed.

#### Results

The mitotic chromosomes from the 18 species under study, hybridized with the pDm238 probe of Drosophila melanogaster are shown in figure 1. All species investigated showed fluorescent marks exclusively on the sex chromosomes, indicating high character conservation in relation to the number and position of fluorescent marks. In all studied species, we observed only one NOR on the X chromosome. Probe hybridization was predominantly located on the chromosome terminal point, although in the species D. guaraja, D. guaru, D. nappae, D. virilis and D. immigrans the fluorescent mark was observed far from the terminal location. As for the Y chromosome, most species also showed only one rDNA region, but in D. guaru and D. frotapessoai, we observed more than one mark (5 and 3, respectively), although in different positions. In approximately half of the species (D. cuaso, D. paraguayensis, D. mediopunctata, D. mediostriata, D. metzii, D.guaraja, D. guaru, D. ornatifrons, D. immigrans) the fluorescent mark was far from the ter-



**Fig. 1.** Mitotic chromosomes counterstained with propidium iodide and hybridized with pDm238 probe (all photomicrographs are in the same scale).

minal location. We can thus say that the variation in the position and in the number of rDNA regions was clearly higher on the Y chromosome than on the X chromosome (figs. 1 and 2).

#### Discussion

So far 32 species of *Drosophila* have been investigated for rDNA location. However, the several studies on the position of NORs in this genus are strongly biased, except for one species (*D. tumiditarsus*), all the remaining species belong to only 2 groups: *melanogaster* (subgenus *Sophophora*) and *repleta* (*virilis-repleta* radiation, subgenus *Drosophila*) and little is known about the consistency of this character in other groups. No information was available from species of the major *immigrans-Hirtodrosophila* radiation (subgenus *Drosophila*), which includes the *tripunctata* radiation.

By evaluating previously published data, we note a similar pattern in the location of rDNA between the subgenera *Drosophila* and *Sophophora*, in which, with some exceptions, the position of rDNA was limited to the sex chromosomes (table 2). The position of rDNA on both sex chromosomes was detected in 18 of the 32 species referred to in table 2. If we add up the 18 species we studied there are 36 in a total of 50 species with rDNA on both sex chromosomes. Among the others, in 5 species, rDNA was found on at least one of the sex chromosomes. For the remaining 9 species (table 2), which do not show rDNA genes in the sex chromosome, it was detected only on the dot chromosome. In fact, they probably represent only 2 independent evolutionary events: the first for D. tumiditarsus [Sinibaldi and Cummings, 1981]; and the second for 8 species from the *melanogaster* group, but all have descended from a common ancestor [Roy et al., 2005]. We can thus suggest that having a rDNA region on each sex chromosome is an ancestral character, common to the subgenera Drosophila and Sophophora, and is probably an ancestral character of the genus Drosophila, too.

Association of rRNA genes with sex chromosomes, mainly within heterochromatic regions or adjacent to them, has also been reported in many dipteran groups, such as mosquitoes, fruit flies (Tephritidae), and others [Marchi and Pili, 1994; Goday et al., 2006]. It is possible that the association between sex chromosomes and rRNA genes is a general feature of Diptera.



**Fig. 2.** Schematic representation of mitotic chromosomes and fluorescent marks. The phylogeny shown is a simplification of the phylogeny proposed by Hatadani et al. [2009] based on the genes *COI* and *COII*, to which we added an external group species (*D. virilis*).

In eukaryotes, ribosomal RNA genes (rDNA) are present in multiple copies in the heterochromatin [Andronico et al., 1985; Dubcovsky and Dvorak, 1995; Hirai et al., 1998; Shishido et al., 2000; Busin et al., 2008]. Actually, in Diptera most of the heterochromatin is found on the sex chromosomes and on the dot chromosomes. Therefore, if there is a tight association of rDNA and heterochromatin this could explain the same general association pattern of rDNA with sex and dot chromosomes [Marchi and Pili, 1994].

Furthermore, we suggest that the studied character is more variable on the Y chromosome than on the X; since we found more changes in position and in the number of rDNA regions on the Y chromosome. The X chromosome shows only one region of rDNA in all cases that we studied. The same is true for the other species shown in table 2 (except for the species which do not have rDNA on the X chromosome). Similarly, if we pay attention to the number of fluorescent marks found on the Y chromosome, we observe more variation, as we found species with more than one rDNA region: *D. frotapessoai* (3 sites) and *D. guaru* (5 sites). Once again, our data are consistent with those previously published (table 2). There are species with the Y chromosome showing: more than one rDNA region (*D. merina*, *D. vallismaia*, *D. hydei*, *D. eohydei*, and *D. replete*); no rDNA (*D. atripex*, *D. pallidosa*, *D. phaeopleura*, *D. bipectinata*, *D. malerkotliana*, *D. parabipectinata*, *D. pseudoananassae*, *D. varians*, *D. tumiditarsus*, *D. arizonae* and *D. mulleri*); and even only a 240-bp rDNA intergenic sequence (*D. simulans* and *D. sechelia*).

Subgenus	Radiation	Species group	Species	Number of rDNA sites and location
Drosophila	immigrans- Hirtodrosophila	immigrans tripunctata	D. immigrans <sup>a</sup> D. nappae <sup>a</sup> D. mediopunctata <sup>a</sup> D. unipunctata <sup>a</sup> D. roehrae <sup>a</sup> D. paraguayensis <sup>a</sup> D. cuaso <sup>a</sup> D. mediosignata <sup>a</sup> D. paramediostriata <sup>a</sup> D. mediostriata <sup>a</sup> D. mediostriata <sup>a</sup>	1 – X chromosome, 1 – Y chromosome 1 – X chromosome, 1 – Y chromosome
		guarani	D. frotapessoai <sup>a</sup> D. maculifrons <sup>a</sup> D. guaraja <sup>a</sup> D. griseolineata <sup>a</sup> D. ornatifrons <sup>a</sup>	1 – X chromosome, 3 – Y chromosome 1 – Y chromosome
			D. guaru <sup>a</sup>	1 – X chromosome, 5 – Y chromosome
Drosophila	virilis-repleta	virilis tumi ditanaua	D. virilis <sup>a</sup>	1 – X chromosome, 1 – Y chromosome
		repleta	D. tumutarsus D. hydei <sup>c</sup> D. repleta <sup>c</sup>	1 – X chromosome, 2 – Y chromosome
			D. eohydei <sup>c</sup>	1 – X chromosome, 2 – Y chromosome, additional rDNA transcriptionally inactive in autosomes 2, 3 and 4
			D. mercatorum <sup>a, e</sup>	1 – X chromosome, 1 – Y chromosome
			D. buzzati <sup>a, e</sup> D. mulleri <sup>f</sup> D. arizonae <sup>f</sup>	1 – X chromosome, 1 – cluster dot chromosome
Sophophora	Sophophora	melanogaster	D. teissieri <sup>h</sup> D. yakuba <sup>g,h</sup> D. orena <sup>g,h</sup> D. erecta <sup>g,h</sup> D. melanogaster <sup>h, k</sup> D. mauritiana <sup>g,h</sup> D. teissieri <sup>g,h</sup> D. santomea <sup>h</sup> D. yakuba <sup>h</sup> D. ercepeae <sup>h</sup>	1 – X chromosome, 1 – Y chromosome
			D. merina <sup>h</sup> D. vallismaia <sup>h</sup>	1 – X chromosome, 2 – Y chromosome
			D. simulans <sup>g, h</sup> D. sechelia <sup>g, h</sup>	1 – X chromosome
			D. ananassae <sup>t, j</sup> D. atripex <sup>h</sup> D. pallidosa <sup>h</sup> D. phaeopleura <sup>h</sup> D. bipectinata <sup>h</sup> D. malerkotliana <sup>h</sup> D. parabipectinata <sup>h</sup> D. pseudoananassae <sup>h</sup> D. varians <sup>h</sup>	1 – Y chromosome, 1 – dot chromosome 1 – dot chromosome

**Table 2.** Data on the position of rDNA on the chromosomes of species from genus *Drosophila* including previously published data.Radiation names according to Throckmorton (1975)

<sup>a</sup> This paper; <sup>b</sup> Sinibaldi and Cummings, 1981; <sup>c</sup> Hennig et al., 1975, 1982; <sup>d</sup> Templeton et al., 1985; <sup>e</sup> Knibb et al., 1989 ; <sup>f</sup> Bicudo, 1981; <sup>g</sup> Lohe and Roberts, 2000; <sup>h</sup> Roy et al., 2005; <sup>i</sup> Kaufmann, 1937; <sup>j</sup> Kikkawa, 1938; <sup>k</sup> Spear, 1974.

As a result, there is more variation in number of ribosomal DNA regions, as well as in the positions of these rDNA, on the Y chromosome than on the X chromosome. This is consistent with the heterochromatic portions of these chromosomes. The Y is almost exclusively heterochromatic while the heterochromatic portion of the X chromosome in *Drosophila* is restricted to the vicinities of the centromere. Hence, it should be easier for rearrangements to occur within the Y chromosome heterochromatin than on the X heterochromatin and consequently to have larger position variation for the rDNA.

In insects it is not possible to establish a general pattern of position and number of rDNA in the chromosomes. There are variable taxa and others are constant, such as the Diptera.

In Coleoptera this pattern varies among different tribes. In the tribes Carabini and Harpalini rDNA usually occurs in only one autosomal pair [De la Rúa et al., 1996; Martínez-Navarro et al., 2004]. However, the same is not observed in the tribes Cicindelini, Scaritini and Zabrini, which show high variation [Galián et al., 1995, 1999; Sánchez-Gea et al., 2000]. Sánchez-Gea et al. [2000] studied 19 taxa in Zabrini and detected quantitative and qualitative variation among related species, subspecies, populations, and even individuals. The number of chromosomes with rDNA varied from 2 to 12.

Also contrasting with the constancy of the rDNA position in *Drosophila* and Diptera, there is great variation in the rDNA chromosome position among grasshopper species. Cabrero and Camacho [2008] analyzed the position and number of rDNA loci by FISH in 49 grasshopper species, 47 from a single family (Acrididae). They found a mean haploid number of rDNA loci of 2.47; but there was high variation among species, with some of them having up to 9 or 10 loci. However, in a sample of 5 Neotropical grasshopper species, from the Acrididae family also, a smaller variation in rDNA was found and attributed to a lack of transposable elements [Loreto et al., 2008].

In *Drosophila* the relation between the constancy of the rDNA position and transposable elements has never been mentioned. Lohe and Roberts [2000] proposed a mechanism that could explain the constancy of the rDNA in the sexual chromosomes for the *melanogaster* group. They suggested that since the ribosomal DNA region is one of the factors involved in the pairing between the X and Y chromosomes in males, this may be, at least partially, responsible for the observed constancy. Among the few cases where rDNA was no longer in the sex chromosomes, a 240-bp intergenic spacer sequence of the rDNA was still conserved in those chromosomes in 2 species studied. Our current study shows that this persistence of the rDNA regions on X and Y chromosomes is not restricted to the *melanogaster* subgroup; it is a more general phenomenon that also occurs in other groups of the genus *Drosophila*.

In conclusion, the location of genes encoding ribosomal RNA, is highly conserved in the *tripunctata* radiation. If we consider the results from previous studies, this result can be generalized to the genus *Drosophila*. We can thus conclude that a nucleolus organizer region (NOR) on each sex chromosome is an ancestral character in the genus *Drosophila*. Moreover, there is little variation among species and this constancy deserves further studies.

#### Acknowledgements

It is a pleasure to acknowledge Klélia Aparecida de Carvalho and Maria Salete do Couto Campos for their technical help. Luciane M. Hatadani carefully maintained the Drosophila strains used in this paper and in other works of the Laboratory. Carlos Teixeira reviewed the English version of the manuscript. Dr. J. P.M. Camacho and an anonymous reviewer read carefully a previous version of the manuscript and gave thoughtful suggestions; their help is much appreciated. The administrators of Bosque dos Jequitibás, Serra do Japi, and Parque Nacional do Itatiaia as well as the owners of Colinas do Atibaia and Barreiro Rico allowed us to collect in these locations; their help is greatly appreciated. This work was supported by grants from: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX) - Unicamp.

References

- Ananina G, Peixoto AA, Souza WN, Klaczko LB: Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem Ins Oswaldo Cruz 97:691–694 (2002).
- Andronico F, De Lucchini S, Graziani F, Nardi I, Batistoni R, Barsacchi-Pilone G: Molecular organization of ribosomal RNA genes clustered at variable chromosomal sites in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). J Mol Biol 186:219–229 (1985).
- Ashburner M: *Drosophila*: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).
- Bächli G: The database on taxonomy of Drosophilidae, version 1.03. Taxodros (2008). Retrieved from http://taxodros.unizh.ch. 25/09/2008.

- Bicudo HM: Further observations on the nucleolar organizing activity in salivary gland cells of *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids. Biol Zentralbl 100:597–612 (1981).
- Busin CS, Andrade GV, Bertoldo J, Del Grande ML, Uetanabaro M, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of Zz/Zw sex chromosomes in *P. tocantins*. Genetica 133:119–127 (2008).
- Cabrero J, Camacho JPM: Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. Chromosome Res 16:595–607 (2008).
- Da Lage JL, Kergoat GJ, Maczkowiak F, Silvain JF, Cariou ML, Lachaise D: A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. J Zool Syst Evol Res 45: 47–63 (2007).
- De la Rúa P, Serrano J, Hewitt M, Galián J: Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). J Zool Syst Evol Res 34:95– 101 (1996).
- Dubcovsky J, Dvorak J: Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. Genetics 140:1367–1377 (1995).
- Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F: Ribosome assembly in eukaryotes. Gene 313:17–42 (2003).
- Frota-Pessoa O: Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). Arq Museu Paranaense 10:253–303 (1954).
- Galián J, Serrano J, de la Rúa P, Petitpierre E, Juan C: Localization and activity of rDNA genes in Tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). Heredity 74:524–530 (1995).
- Galián J, De la Rúa P, Serrano J, Juan C, Hewitt GM: Phylogenetic relationships in West Mediterranean Scaritina (Coleoptera: Carabidae) inferred from mitochondrial COI sequences and karyotype analysis. J Zool Syst Evol Res 37:85–92 (1999).
- Ganley ARD, Kobayashi T: Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res 17:184–191 (2007).
- Glover DM: Cloned segment of *Drosophila melanogaster* rDNA containing new types of sequence insertion. Proc Natl Acad Sci USA 74: 4932–4936 (1977).
- Goday C, Selivon D, Perondini ALP, Greciano PG, Ruiz MF: Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). Cytogenet Genome Res 114:70–76 (2006).
- Grimaldi DA: A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). Bull Am Mus Nat Hist 197:1-139 (1990).

- Halanych KM, Bacheller JD, Aguinaldo AM, Liva SM, Hillis DM, Lake JA: Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. Science 267:1641– 1643 (2005).
- Hatadani LM, McInerney JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB: Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). Mol Phylogenet Evol 51:595–600 (2009).
- Hennig W, Link B, Leoncini O: The location of the nucleolus organizer regions in *Drosophila hydei*. Chromosoma 51:57–63 (1975).
- Hennig W, Vogt P, Jacob G, Siegmund I: Nucleolus organizer regions in *Drosophila* species of the *repleta* group. Chromosoma 87:279–292 (1982).
- Hirai H, Hasegawa Y, Kawamoto Y, Tokita E: Tandem duplication of nucleolus organizer region (NOR) in the Japanese macaque, *Macaca fuscata fuscata*. Chromosome Res 6: 191–197 (1998).
- John B, Miklos GLG: The Eukaryote Genome in Development and Evolution (Allen and Unwin, London 1988).
- Kastritsis CD, Pasteur G, Quick J: Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediostriata* and *D. griseolineata*. Can J Genet Cytol 12:952–959 (1970).
- Kaufmann BP: Morphology of the chromosomes of *Drosophila ananassae*. Cytologia (Tokyo) Fujii Jubilee Vol:1043-1055 (1937).
- Kikkawa H: Studies on the Genetics and Cytology of *Drosophila ananassae*. Genetica 20: 458–516 (1938).
- Klaczko LB: Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. Genetica 126:43–55 (2006).
- Klaczko LB, Bitner-Mathe B: On the edge of a wing. Nature 346:321–321 (1990).
- Knibb W, Barker J, Oakeshott J: The genetics of abnormal abdomen, incomplete abdomen, and bobbed in *Drosophila buzzatii*. Genome 32:754–761 (1989).
- Lohe AR, Roberts PA: An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. Genetics 125:399–406 (1990).
- Lohe AR, Roberts PA: Evolution of DNA in heterochromatin: the *Drosophila melanogaster* sibling species subgroup as a resource. Genetica 109:125–130 (2000).
- Loreto V, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM, de Souza MJ: Comparative analysis of rDNA location in 5 Neotropical gomphocerine grasshopper species. Genetica 132:95– 101 (2008).
- Magnacca KN, O'Grady PM: Revision of the 'nudidrosophila' and 'ateledrosophila' species groups of Hawaiian *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae), with descriptions of twentytwo new species. Syst Entomol 33:395–428 (2008).

- Marchi A, Pili E: Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence in situ hybridization (FISH). Heredity 72:599–599 (1994).
- Martínez-Navarro EM, Serrano J, Galián J: Chromosome evolution in ground beetles: localization of the rDNA loci in the tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae). J Zool Syst Evol Research 42:38–43 (2004).
- Moore PB, Steitz TA: The involvement of RNA in ribosome function. Nature 418:229–235 (2002).
- Parise-Maltempi PP, Avancini RMP: C-banding and FISH in chromosomes of the blow flies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). Mem Ins Oswaldo Cruz 96:371–377 (2001).
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M, Loreto ÉLS: 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 (2005).
- Rohia H, Miller JR, Woods LC, Glover DM: Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *Drosophila melanogaster*. Nature 290: 749–753 (1981).
- Roy V, Monti-Dedieu L, Chaminade N, Siljak-Yakovlev S, Aulard S, et al: Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. Heredity 94:388–395 (2005).
- Saavedra CCR, Callegari-Jacques SM, Napp M, Valente VLS: A descriptive and analytical study of our neotropical Drosophilidae communities. J Zool Sys Evol Res 33:62–74 (1995).
- Sánchez-Gea J F, Serrano J, Galián J: Variability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence in situ hybridization. Genome 43:22–28 (2000).
- Shishido R, Sano Y, Fukui K: Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. Mol Gen Genet 263: 586–591 (2000).
- Sinibaldi RM, Cummings MR: Localization and characterization of rDNA in *Drosophila tumiditarsus*. Chromosoma 81:655–671 (1981).
- Spear B: The genes for ribosomal RNA in diploid and polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 48:159–179 (1974).
- Stage DE, Eickbush TH: Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 *Drosophila* species. Genome Res 17:1888 (2007).
- Stuart W, Bishop JG, Carson HL, Frank MB: Location of the 18/28S ribosomal RNA genes in two Hawaiian *Drosophila* species by monoclonal immunological identification of RNA: DNA hybrids in situ. Proc Natl Acad Sci USA 78:3751–3754 (1981).

- Templeton AR, Crease TJ, Shah F: The molecular through ecological genetics of abnormal abdomen in *Drosophila mercatorum*. I. Basic Genetics. Genetics 111:805–818 (1985).
- Throckmorton LH: The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. Handbook of Genetics 3:421–469 (1975).
- Tsuchiya D, Taga M: Application of fibre-FISH (fluorescence in situ hybridization) to filamentous fungi: visualization of the rRNA gene cluster of the ascomycete *Cochliobolus heterostrophus*. Microbiology-SGM 147: 1183–1187 (2001).
- Veiga-Menoncello ACP, Lima AP, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. Hereditas 139:189–198 (2003).
- Viegas-Péquignot E: In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes, in Willernson D (ed): In Situ Hybridization: A Practical Approach, pp 137–158 (Oxford University Press, Oxford 1992).
- Vilela CR: On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). Rev Bras Entomol 36:197–221 (1992).
- Vilela CR, Pereira AQR, Sene FM: Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil: II. The *Repleta* Group. Cienc Cult 35:66–70 (1983).
- Yotoko KSC, Medeiros HF, Solferini VN, Klaczko LB: A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. Mol Phylogenet Evol 28:614–619 (2003).

V.1. Artigo 2

Fotomapas, Polimorfismo de Inversões e Identificação dos Elementos de Muller dos Cromossomos Politênicos de Três Espécies do Grupo *tripunctata* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)

#### RESUMO

Cromossomos politênicos têm sido amplamente utilizados em análises genéticas de *Drosophila* e outros dípteros. Neste trabalho apresentamos o fotomapa de três espécies proximamente relacionadas do grupo *tripunctata* do subgênero *Drosophila* (*Drosophila mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata*). Incluindo a identificação dos elementos de Muller das três espécies e a apresentação do polimorfismo de inversões encontrado nas linhagens estudadas de *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

Os cromossomos que compõem os fotomapas foram apresentados divididos de acordo com a forma convencional estabelecida por Bridges, onde cada braço cromossômico foi dividido em 20 regiões, cada uma subdividida em três sub-regiões.

Foram também anotados nos fotomapas pontos de quebras, de arranjos de inversões cromossômicas, encontradas nas linhagens estudadas de *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

Para identificação dos elementos de Muller utilizamos sondas de genes de *Drosophila melanogaster* em hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) nos cromossomos politênicos das três espécies em questão. e as localizações dos genes também foram anotadas nos fotomapas apresentados.

Verificamos que os cromossomos politênicos de*D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata* são bem similares, sendo relativamente fácil determinar a homologia dos cromossomos menos polimórficos pela análise qualitativa do padrão de bandas.

Existe um padrão de polimorfismo de inversões entre os elementos de Muller nestas espécies: o elemento E é o mais polimórfico, com muitas inversões em cada espécie, e o elemento C é o segundo mais polimórfico; enquanto B e D são os menos polimórficos.

Pelo uso de marcadores moleculares verificou-se, anteriormente, que as espécies *D. mediopunctata* e *D. unipunctata* são filogeneticamente mais próximas que *D. roehrae.* No entanto, *D. unipunctata* apresenta uma conformação cariotípica singular, o que sugere uma rápida evolução cromossômica.

## INTRODUÇÃO

Os cromossomos politênicos são cromossomos gigantes, que ocorrem comunmente em algumas células de vários dípteros; os mais estudados são os oriundos de glândulas salivares de larvas. Estes cromossomos são formados por endoreplicação, ou seja, replicação do DNA sem a divisão celular. Porém, nos cromossomos politênicos apenas a eucromatina está claramente organizada e não é possível estudar porções heterocromáticas do genoma. A alta resolução apresentada pelopadrão de bandas nos cromossomos politênicos viabiliza e torna o material propício a estudos de rearranjos cromossômicos e determinação de homologias entre espécies (Powell, 1997).

O primeiro mapa de cromossomos politênicos em *Drosophila* foi feito para *D. melanogaster* (Painter, 1934)e desde então, os mapas de cromossomos politênicos tornaramse ferramentas importantes para o mapeamento gênico, para detecção de diversidade genética entre populações e para inferir filogenias entre espécies proximamente relacionadas (Dobzhansky & Sturtevant 1938; Ashburner & Lemeunier 1976, Krimbas & Powell, 1992; O'Grady *et al.*, 2001; Ananina *et al.*, 2004; Hoffmann e Rieseberg, 2008; Andreyenkova *et al.*, 2009). Cerca de 300 espécies diferentes do gênero *Drosophila* já tiveram seus cromossomos politênicos analisados (Ashburner 1992, Schaeffer *et al.*, 2008); porém a grande maioria das espécies é do subgênero *Sophophora*.

O numero haplóide de cromossomos em *Drosophila* varia de três a seis, mas virtualmente todas as espécies deste gênero possuem cinco braços de cromossomos e em muitas espécies há, além desses, um cromossomo pontual (Powell, 1997). O estudo pioneiro de Metz (1914), comparando cariótipos metafásicos no gênero *Drosophila*, combinado com os subseqüentes estudos genéticos comparativos (Muller, 1940) permitiram concluir que a integridade dos braços dos cromossomos é conservada em grande parte das espécies de *Drosophila*,. E deste modo, no início da década de 40, Muller (1940) e Sturtevant & Novitski (1941), propuseram que o cariótipo ancestral de *Drosophila* seria formado por cinco cromossomos grandes e um cromossomo pontual. Sendo assim os braços cromossômicos que as espécies hoje apresentam representariam os cromossomos ancestrais.

A proposta de Muller sugere que as inversões paracêntricas e as fusões são as ações que têm produzido a diversidade cariotípica deste gênero (Clayton & Guest, 1986, Hoffmann *et al.*, 2004); já as inversões pericêntricas (Segarra & Aguadé 1992) e translocações ou transposições de genes entre os elementos (Papaceit & Juan 1993; Ranz *et al.*, 2003) são bem mais raras. Foi, então, possível estabelecer um único sistema de nomenclatura comum para todo gênero, no qual nas diferentes espécies os braços cromossômicos correspondem aos seis elementos propostos por Muller (elementos A, B, C, D, E e F) (Patterson & Stone, 1952; Ashburner & Berendes, 1978; Throckmorton, 1982; Ranz *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2005; Bhutkar *et al.*, 2008; Schaeffer *et al.*, 2008).

Neste trabalho estudamos os cromossomos politênicos de três espécies proximamente relacionadas do grupo *tripunctata*, subgênero *Drosophila: D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata*.

O grupo tripunctata é composto por 79 espécies (Bächli *et al.*, 2009), sendo o segundo maior grupo neotropical em número de espécies, menor apenas que o grupo *repleta* (Vilela, 1992). Sua distribuição se estende desde o leste dos Estados Unidos e América Central até a América do Sul (Throckmorton, 1975).

O estudo de *D. mediopunctata* (e de espécies filogeneticamente próximas a ela) é interessante, pois esta espécie apresenta características que contrastam com as de outras espécies do gênero muito estudadas (Klaczko, 1995; 2006). Em particular, pode-se mencionar: seu ciclo de vida longo, longevidade maior, sua fecundidade relativamente mais baixa e também o fato de estar melhor adaptada a temperaturas mais baixas. Desta forma, a biologia peculiar da espécie pode vir a revelar aspectos não observados em outras espécies modelos mais estudadas, como *D. melanogaster*, por exemplo.

Apresentamos, neste trabalho, o fotomapa de *D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata*, e a identificação dos elementos de Muller para estas três espécies, utilizando a técnica de FISH. Também apresentamos o polimorfismo de inversões encontrado nas linhagens estudadas de *D. unipunctata* e *D. roehrae*.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

### Material biológico

As linhagens utilizadas neste trabalho (tabela 1) são provenientes de coletas realizadas conforme a metodologia descrita em Peixoto & Klaczko (1991) e Medeiros & Klaczko (1999), em diferentes locais do Brasil. As fêmeas do campo foram colocadas em tubos com meio de cultura para ovipor individualmente. Dessa forma, cada linhagem descendente de cada fêmea constituiu uma linhagem isofêmea. As linhagens foram identificadas quanto à espécie pelo edeago dos machos, que é a forma mais confiável para diferenciar as espécies do grupo *tripunctata* (Vilela, 1992). Estas linhagens foram mantidas em meio de cultura (10% farinha de trigo integral; 0,3% açúcar cristal; 0,3% fermento biológico seco; 0,3% leite em pó; 0,003% nipagin) em nosso laboratório durante a execução deste trabalho.

Tabela 1 – Origem e número de linhagens isofêmeas analisadas neste estudo, para confeccionar o fotomapa de *D. mediopunctata* e para confeccionar os fotomapas e analisar o polimorfismo de inversões em *D. unipunctata* e *D. roehrae*.

Espécie	Origem	Número de
		linhagens analisadas
D. mediopunctata	Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ)	2
	(Linhagens padrão ITC229 ET e ITD343L)	
D. unipunctata	Serra do Japi (Jundiaí, SP)	1
	Parque Ecológico Ms. Emílio José Salim	5
	(Campinas, SP)	
	Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ)	8
D. roehrae	Serra do Japi (Jundiaí, SP)	1
	Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ)	54
## Preparação dos fotomapas

## Cromossomos politênicos

As lâminas dos cromossomos politênicos foram preparadas a partir de larvas do terceiro estágio, utilizando o método descrito no trabalho de Ashburner (2005), com HCL 1 N e orceina lacto acética 2%.

## Elaboração dos fotomapas

Os cromossomos politênicos foram fotografados com fotomicroscópio Nikon E 800, sob aumento de 1000x. Os mapas foram elaborados manipulando fragmentos dos cromossomos fotografados, utilizando os programas: Adobe Photoshop e CorelDRAW. Os cromossomos foram apresentadosde acordo com a forma convencional estabelecida por Bridges (1935), onde cada braço cromossômico foi dividido em 20 regiões e cada uma delas subdividida em três. Deste modo o mapa total apresenta 300 regiões, sendo 100 regiões principais numeradas de 1 a 100 (20 regiões por cromossomo) e cada uma, destas regiões subdivididas em A, B e C. Para espécies que apresentaram o cromossomo pontual politenizado, foi acrescentada uma região principal a mais, que corresponde ao cromossomo pontual.

# Análise do polimorfismo de inversões cromossômicas

Pelo menos 4 indivíduos de cada linhagem isofêmea disponível de *D. unipunctata* e *D. roehrae* (tabela1) foram analisados. Os principais arranjos cromossômicos foram fotografados, também utilizando fotomicroscópio Nikon E 800, sob aumento de 1000x. Os pontos de quebra das inversões simples foram anotados no fotomapa apresentado.

#### Identificação dos elementos de Muller

#### Preparação dos cromossomos politênicos

Os cromossomos politênicos para serem submetidos à hibridação *in situ*, também foram preparados a partir de larvas do terceiro estágio utilizando protocolo adaptado de Ashbuner & Berendes, 1978. As larvas foram dissecadas em ácido acético 45% para retirada das glândulas salivares, que foram fixadas em metanol: ácido acético (3:1), e esmagadas em

ácido acético 60%. As lamínulas, previamente siliconizadas, foram retiradas com nitrogênio líquido e armazenadasa -19°C.

# Produção das sondas

Fragmentos de genes de *D. melanogaster* amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados como sonda para hibridação *in situ*. Os "primers" utilizados nas reações de PCR (Tabela 2) foram projetados para gerar fragmentos entre 900 e 1300 kb, utilizando o programa "primer 3", a partir das seqüências do genoma de *D. melanogaster* (http://flybase.bio.indiana.edu/); foram escolhidos "primers" cujo fragmento predito tem alta homologia com espécies com genoma disponível na rede. As reações de PCR foram preparadas nas seguintes proporções (volume total de 25 μl): 1,5mM MgCl2, 0.2 μM primer, 1 U taq.

As sondas foram marcadas com biotina utilizando o "Kit Bionick" (Gibco-nick translation) seguindo as instruções do fabricante.

# Hibridação in situ por fluorecência (FISH)

As lâminas dos cromossomos foram pré-tratadas com solução de 2xSSC a 70°C, desidratadas e submetidas à desnaturação em solução de formamida 70% a 70°C. As sondas foram desnaturadas sob ação da alta temperatura (100°C). As hibridações ocorreram "overnight" a 37 °C em câmera úmida;em seguida as lâminas foram lavadas em PBT (PBS 1x, Tween 20 0,1% e BSA 30% v/v) e, posteriormente, incubadas com anti-biotina (3:500 v/v em PBT) por 45 minutos a 37°C. Novamente, foram lavadas em PBT e incubadas com anti-goat IgG-FITC (1:100 v/v em PBT) a 37°C no escuro (modificado de Brianti *et al.*, 2009).

Os cromossomos foram corados com iodeto de propídeo  $(1-2 \ \mu g/ml)$  e analisados utilizando microscópio de fluorescência Olympus. As imagens foram capturadas utilizando câmera Olympus Q-color 3 e manipuladas nos programas Q capture e Adobe Photoshop para compor a Figura 6.

Tabela 2 - Genes escolhidos para serem utilizados como sondas com sua localização nos cromossomos de *D. melanogaster* e respectivos "*primers*" sintetizados para amplificação dos fragmentos usados como sondas.

Nome dos genes	Localização	Primers (5'- 3')		
Adh	2L	CAAAAACAAACCGTGTGTGC		
Alcohol dehydrogenase		ATCCAACCAGGAGTTGAACG		
Mhc	2L	CGTCAGGGTTTGATTGAGGT		
Myosin heavy chain		CACCAGGGCTATGGCTACAT		
Tor	2R	AAAACCGCACGAGGACATAC		
Target of rapamycin		AAACATGCCCTTTACGTTGC		
hsp27	3L	AACCTTCTCTGCAGGCAAAA		
Heat shock protein 27		TCAAAGGGAGCAATGAATCC		
hsp83	3L	GAAGAAGCGCAACAACATCA		
Heat shock protein 83		GAAGCGTCCTCTGTGTCCTC		
e	3R	CAGCGAAGGTGAACAGAACA		
Ebony		AAGGAGTTACGCTGGCTCAA		
hsp70	3R	CATCCCAAAAATCTGTAAAGC		
Heat shock protein 70		ACTGTGTTTCTGGGGGTTCAT		
ci	4	TGCGCGATCACTAGCATTAC		
cubitus interruptus		TCATCGCCTTATTCCGATTC		
SV	4	TTTCTGCGGAGCAAAAACT		
shaven		TGCAGTCAGCCAATGAAGAC		
w	Х	CTCATTAGCCACTCGCACAA		
White		GAAGACGTTTGCGGTATGGT		
у	Х	CAGTCCGAAACACCCAAACT		
yellow		GTGAGACTGCAACGACCAGA		

#### RESULTADOS

#### **Fotomapas**

Os fotomapas de *D. roehrae*, *D. unipunctata* e *D. mediopunctata* estão apresentados nas figuras 1, 2 e 3, respectivamente. Cada fotomapa apresenta o conjunto completo dos cromossomos politênicos de cada espécie, com as devidas divisões. Na parte superior dos cromossomos que compõem os fotomapas de *D. unipunctata* e *D. roehrae*, estão marcados os pontos de quebra dos arranjos de inversões simples observados nas linhagens analisadas destas espécies e adicionalmente mais alguns pontos de quebra não oriundos de arranjos simples. Além disso, os fotomapas também apresentam as localizações dos genes, geradas pelas hibridações positivas. Estas estão marcadas com uma seta na parte inferior dos cromossomos dos fotomapas.

As divisões e a nomenclatura dos cromossomos do fotomapa de *D. mediopunctata* foram feitas de acordo com as apresentadas por Ananina *et al.* (2002) no mapa dos cromossomos desta espécie.

Em *D. roehrae*, as divisões estão apresentadas seguindo o padrão estabelecido por Bridges (1935), como descrito na metodologia, e a nomenclatura cromossômica adotada foi baseada na homologia dos elementos cromossômicos entre esta espécie e *D. mediopunctata*.

Para o fotomapa de *D. unipunctata* foi utilizada a nomenclatura que já havia sido proposta por Kastritsis (1966), porém as divisões foram refeitas também adotando o método utilizado nas outras duas espécies abordadas neste trabalho, principalmente visando facilitar a posterior comparação do padrão de bandas.

## Polimorfismo de inversões

Para *D. unipunctata* e *D. roehrae* foram investigados polimorfismos de inversões com as linhagens disponíveis. As inversões encontradas estão apresentadas nas figuras 4 e 5, respectivamente. Os pontos de quebra dos arranjos de inversões simples, estão anotados nos respectivos fotomapas.

Foram marcados 9 pontos de quebra referentes a 4 inversões simples e dois pontos referentes a quebras de arranjos complexos, no elemento E de *D. roehrae*. Nesta mesma

espécie, também foram marcados 7 pontos de quebra no elemento C referentes a 4 inversões simples. E mais 2 pontos de quebra no elemento B e 2 no elemento D.

Para *D. unipunctata* foram marcados 10 pontos de quebra no elemento E. No elemento C foram marcados 6 pontos de quebra, também foram marcados 6 pontos no elemento B. E mais os dois pontos de quebra da inversão pericêntrica no elemento A.

Vale ressaltar que inversões complexas não tiveram todos os seus pontos de quebra anotados nos fotomapas pois será necessária uma análise posterior, mais cuidadosa (incluindo cruzamentos para verificação de heterozigotos), para elucidar os pontos de quebra destes arranjos cromossômicos com clareza. Os arranjos complexos, mais comumente visualizados, estão apresentados nas figuras 4 e 5 conforme a espécie.

### Identificação dos elementos de Muller

Para identificação dos elementos de Muller, utilizamos 11 sondas de genes de *D.* melanogaster (tabela 2) em hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) nos cromossomos politênicos das três espécies em questão. Apenas 6 destas sondas apresentaram sinal positivo de hibridação nas três espécies (tabela 3), o que foi suficiente para identificação dos elementos de Muller (tabela 4). As imagens analisadas são resultados da sobreposição de duas imagens utilizando dois diferentes filtros: um para revelar o sinal da hibridação (fluorocromo fluoresceina, excitado a  $\lambda = 494$  nm e com emissão a  $\lambda = 521$ nm) e outro para visualização da estrutura dos cromossomos corados com iodeto de propídeo (excitado à  $\lambda =$ 536 nm e com emissão a  $\lambda = 617$ nm) (figura 6).

# DISCUSSÃO

Estudos de filogenia molecular colocam *D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata* formando um clado de espécies altamente relacionadas, (Yotoko *et al.*, 2003; Robe *et al.*, 2005; Hatadani *et al.*, 2009; Laborda *et al.*, 2009), o que já tinha sido mencionado em estudos morfológicos destas espécies (Patterson, 1943; Pipkin & Heed, 1964) e em experimentos de hibridação de *D. mediopunctata* e *D. unipunctata*, onde do cruzamento destas duas espécies conseguiram-se híbridos (Patterson, 1957).







**Figura 2**. Fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. unipunctata* apresentado pontos de quebra de inversões cromossômicas e localização de genes de *D. melanogaster* indicados com setas. Os braços cromossômicos estão orientados com o centrômero a direita e o telômero a esquerda.



**Figura 3**. Fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. mediopunctata* apresentado localização de genes de *D. melanogaster* indicados com setas. Os cromossomos estão orientados com o centrômero a direita e o telômero a esquerda.

# Arranjos Elemento E



**Figura 4**. Arranjos de inversões cromossômicas mais comuns em *D. unipunctata*. Os arranjos simples estão numerados de acordo com os números utilizados na marcação dos pontos de quebras destas inversões nos fotomapas apresentados.

# Arranjos Elemento E



**Figura 5**. Arranjos de inversões cromossômicas mais comuns em *D. roehrae*. Os arranjos simples estão numerados de acordo com os números utilizados na marcação dos pontos de quebras destas inversões nos fotomapas apresentados.

# D. mediopunctata



**Figura 6**. Fotomicroscopias das hibridações *in situ* nos cromossomos de *D. mediopunctata, D. unipunctata* e *D. roehrae* com as sondas: A-Y (yellow), B-HSP70 (Heat shock protein 70), C-HSP27 (Heat shock protein 27), D-MHC (Myosin heavy chain), E-HSP83 (Heat shock protein 83), F-TOR (Target of rapamycin).

Tabela 3 - Localização dos genes no mapa citológico dos cromossomos das espécies estudadas e em *D. melanogaster*\*. Incluindo a referência do elemento de Muller entre parênteses.

Sonda	D. melanogaster	D. mediopunctata	D. unipunctata	D. roehrae
у	1A5 (A)	6C (A)	8B (A)	6C (A)
Mhc	36B1 (B)	83C (B)	84C (B)	86A (B)
tor	34A4 (C)	74B (C)	75A (C)	71C (C)
hsp83	63B11 (D)	57B (D)	57B (D)	57B (D)
hsp27	67B3 (D)	45C (D)	45C (D)	45C (D)
hsp70	87A2 (E)	25A (E)	25C (E)	28C (E)

\* (http://flybase.org/, consultado em 10/2009)

Tabela 4 – Homologia cromossômica entre as espécies analisadas e os elementos de Muller em *D. melanogaster* (Muller, 1940).

		Genes nos Elementos de Muller				
Espécies	А	В	С	D	Е	F
D. melanogaster	Х	2L	2R	3L	3R	4
D. mediopunctata	Х	5	4	<u>3</u>	2	pontual (?)
D. unipunctata	Х	2R	3R	<u>3L</u>	2L	pontual (?)
D. roehrae	Х	5	4	<u>3</u>	2	pontual (?)

Nos cromossomos sublinhados houve hibridação para 2 sondas

Apesar desta proximidade entre estas espécies, a configuração de seus cariótipos não é igual. *D. mediopunctata* e *D. roehrae* apresentam o cariótipo na conformação ancestral: 5 grandes cromossomos e um pontual, porém o cromossomo pontual de *D. roehrae* se politeniza, enquanto o de *D. mediopunctata* não.

*D. unipunctata*, por sua vez, mostra uma configuração cromossômica diferente da ancestral. Possui várias peculiaridades: duas fusões cêntricas (união dos elementos B+E e C+D), originando dois cromossomos metacêntricos; uma inversão pericêntrica (que é um fenômeno raro no gênero) no cromossomo X; e um pequeno par de cromossomos que aparecem quando são observados núcleos mitóticos, e que não se politenizam (Kastritsis, 1966; Brianti *et al.*, 2009). Além disso, os cromossomos pontuais se politenizam.

Casos similares a este, de espécies proximamente relacionadas com conformação cariotípica divergente, também já haviam sido observados, principalmente entre espécies do subgênero *Sophophora*, onde a diversidade cariotípica é maior (Clayton & Wheeler, 1975); já entre espécies do subgênero *Drosophila* estes casos são menos frequentes. Clayton & Guest, 1986 analisaram um total de 560 espécies do gênero *Drosophila*, quanto à conformação cariotípica. No subgênero *Sophophora* foram observadas 141 espécies encontrando (sempre mencionando o número haplóide): 5 espécies (3,5%) com 6 cromossomos, 24 espécies (17%) apresentando 5 cromossomos, 63 (44,7%) com 4 cromossomos e 49 espécies (34,7%) apresentando 3 cromossomos. No subgênero *Drosophila*, de um total de 419 espécies analisadas, 282 espécies (67,3%) apresentam o numero haplóide de 6 cromossomos, 54 (12,9%) mostraram 5 cromossomos, 72 espécies (17,1%) apresentaram 4 cromossomos. E apenas 9 espécies (2,1%) possuíam 3 cromossômica aparecem várias vezes independentemente na história evolutiva do gênero *Drosophila*, ocorrendo com maior frequência no subgênero *Sophophora*.

Deste modo, ao analisar a conformação cariotípica das três espécies aqui estudadas podemos dizer que *D. unipunctata* é singular quando comparada a *D. mediopunctata* e *D. roehrae,* apresentando mudanças na conformação cariotípica que são raras em espécies do subgênero *Drosophila*. Porém, quando observamos a filogenia baseada em análises moleculares de sequências de genes nucleares e mitocondriais (Yotoko *et al.*, 2003; Robe *et* 

*al.*, 2005; Hatadani *et al.*, 2009) ou ainda a análise de amplificação heteróloga de microssatélites de *D. mediopunctata* (Laborda *et al.*, 2009), *D. mediopunctata* e *D. unipunctata* estão mais proximamente relacionadas, sugerindo assim uma rápida evolução cariotípica em *D. unipunctata*. Este resultado aponta a origem, o significado e as implicações desta rápida mudança como importantes questões para análises futuras. Seria interessante um estudo mais detalhado abordando a evolução cromossômica entre estas espécies principalmente no caso de *D. unipunctata*, que apresentou alguns rearranjos pouco freqüentes entre as espécies do subgênero *Drosophila* (uma inversão pericêntrica, duas fusões cêntricas e um par extra de cromossomos).

Outro apontamento que merece ser feito é a respeito do par de cromossomos extras que aparecem nos cromossomos mitóticos desta espécie. Estes cromossomos não se politenizam, o que é um indício de que são compostos por heterocromatina. Mesmo os complexos de espécies homosequenciais para o padrão de bandas de seus cromossomos politênicos podem apresentar diferenças na heterocromatina (Carson *et al.*, 1967), porém é difícil estabelecer um sistema de estudo de heterocromatina nestes casos. Desta forma, esta espécie provavelmente apresenta uma diferenciação interessante em sua heterocromatina, em relação às espécies proximamente relacionadas a ela, *D. mediopunctata* e *D. roehrae*, fornecendo uma boa oportunidade de estudo para abordar evolução cromossômica e da heterocromatina. O mesmo também se pode dizer, observando os cromossomos pontuais destas espécies, uma vez que eles se politenizam em *D. unipunctata* e *D. roehrae*, mas não em *D. mediopunctata*. Este também é um sistema que merece ser estudado futuramente.

Quanto às inversões cromossômicas, *D. mediopunctata* é uma espécie que já foi bastante estudada. O polimorfismo de inversões cromossômicas nesta espécie foi descrito: 17 inversões no cromossomo 2 (elemento E), três inversões no cromossomo X (elemento A) e uma no cromossomo IV (elemento C). (Carvalho *et al.*, 1989; Klaczko *et al.*, 1990; Peixoto & Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2004). Este polimorfismo também já foi estudado, quanto ao desequilíbrio de ligação (Peixoto & Klaczko, 1991) e existência de cline altitudinal e uma oscilação temporal cíclica nas freqüências de inversões compatíveis com uma resposta adaptativa às alterações de temperatura no campo (Ananina *et al.*, 2004).

O mapa e o fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. mediopunctata* já haviam sido publicados por Kastritsis (1966) e posteriormente por Ananina *et al.*, 2002. Neste trabalho, apresentamos um novo fotomapa para esta espécie, o qual foi elaborado, utilizando como referência, o mapa de Ananina, *et al.* (2002). Neste caso, em *D. mediopunctata*, não contemplamos o polimorfismo de inversões uma vez que estes dados estão disponíveis no trabalho de Ananina, *et al.*, (2002).

*D. unipunctata* também teve seu mapa e fotomapa publicados por Kastritsis (1966) porém com baixa resolução. Kastritsis neste fotomapa apontou 12 pontos de quebra de inversões no cromossomo2L (elemento E), 12 pontos no cromossomo 3R (elemento C) e 2 pontos no cromossomo X (elemento A). Neste nosso trabalho, nós identificamos 10 pontos no elemento E, 6 no elemento C, 6 no elemento B e os mesmos 2 pontos encontrados por Kastritsis no elemento A. Deste modo o polimorfismo nos dois casos difere; apesar de detectarmos um menor polimorfismo, principalmente no elemento C, observamos polimorfismo no elemento B que anteriormente não tinha sido detectado. E esta diferença é razoável uma vez que Kastritsis (1966) utilizou em seu estudo amostras de moscas da Costa Rica e nós moscas brasileiras e, ainda, 50 anos se passaram, entre os estudos.

O fotomapa de *D. roehrae*, é apresentado pela primeira vez neste trabalho. Também mostramos pontos de quebras provenientes de arranjos de inversões encontradas em nossa amostra e assim como em *D. mediopunctata* e *D. unipunctata* detectamos um maior polimorfismo no elemento E (9 pontos de quebra), seguido do elemento C (7 pontos de quebra). Também observamos polimorfismo nos elementos B e D: em cada um destes elementos foram anotados dois pontos de quebra E houve uma inversão no cromossomo X (elemento A) que foi observada no início do trabalho mas não foi documentada para a marcação dos pontos de quebra no mapa o que colocaria dois pontos neste elemento.

Nem sempre os polimorfismos de diferentes espécies são mantidos pelos mesmos processos. Há casos de pares de espécies em que, apesar de próximas filogeneticamente, uma apresenta abundância de inversões paracêntricas em todos os cromossomos e a outra apresenta o polimorfismo de inversões concentrado em um único cromossomo, como por exemplo *Drosophila miranda* e *D. pseudoobscura* (Bartolome & Charlesworth, 2006). Também podemos citar como exemplo *D. melanogaster*, espécie onde já foram verificadas

mais de 500 diferentes inversões em contraposição a *D. simulans*, espécie proximamente relacionada, que apresenta apenas 14 inversões (Aulard *et al.*, 2004).

Nas espécies que analisamos, pode-se notar um padrão na distribuição do polimorfismo de inversões nos elementos, onde o elemento E é o mais polimórfico seguido pelo elemento C. Já o elemento D é o menos polimórfico, seguido do elemento B.

Ao comparar os genomas de mamíferos e camundongos, foi proposto um modelo que pressupõe que o genoma de mamíferos é um mosaico entre regiões frágeis, que podem corresponder a duplicações de segmentos ou regiões com uma concentração alta de elementos de transposição (transposons) ou com uma estrutura palindrômica (Pevner & Tesler, 2003; Murphy *et al.*, 2005); e regiões com baixa propensão a rearranjos.

O genoma de *Drosophila* é bastante diferente de mamíferos: a quantidade de DNA repetitivo é muito baixa e a fração de segmentos duplicados é insignificante (Celniker & Rubin, 2003). Porém estudos moleculares de regiões de ponto de quebra de inversões em *Drosophila* revelaram a presença de transposons em alguns casos (Cáceres *et al.*, 1999, 2001; Casals *et al.*, 2003; Delprat *et al.*, 2009), mas em outros não há evidências (Matzkin *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2005). Em *Drosophila*, também se tem atribuído a susceptibilidade de rearranjos em alguns pontos do genoma à presença de sequências repetitivas (Richards *et al.*, 2005), mas esta observação também não tem sido constante; existem casos onde não foram verificadas sequências repetitivas flanqueando os pontos de quebra dos rearranjos (Anderson *et al.*, 2005; Matzkin *et al.*, 2005). Finalmente, em alguns casos, tem-se notado a presença de duplicações gênicas acompanhando o rearranjo cromossômico (Matzkin *et al.*, 2005; Ranz *et al.*, 2007).

Geralmente o nível de polimorfismo está diretamente relacionado com o índice de fixação de inversões (González *et al.*, 2002; Ranz *et al.*, 2003). As diferenças de níveis de fixação de inversões, entre os diferentes elementos, são difíceis de serem explicadas admitindo que as inversões sejam neutras;pois até o momento não há nenhuma evidência empírica sugerindo que a taxa de surgimento de inversões seja diferente entre os elementos (Papaceit *et al.*, 2006). Além disso,não foi observada nenhuma diferença importante entre os elementos cromossômicos quanto a distribuição de elementos transponíveis ou seqüências repetitivas (Bhutkar *et al.*, 2008). Deste modo, tem sido proposto que as

inversões são geradas com taxas parecidas em todos os elementos, mas as diferenças são introduzidas por diferenças na intensidade da seleção purificadora (Papaceit *et al.*, 2006). Neste aspecto, o conteúdo gênico de cada cromossomo poderia estar definindo a intensidade de seleção. E estudos discutindo a distribuição do polimorfismo nos diferentes elementos no gênero *Drosophila* ainda são escassos, fragmentados e especulativos.

O padrão que observamos entre as três espécies analisadas, D. mediopunctata, D. unipunctata, D. roehrae, o elemento E apresentou maior polimorfismo seguido do elemento C, também foi verificado em outras espécies de Drosophila. Por exemplo, em D. montana, onde o maior índice de polimorfismo também foi notado no elemento E (Stone et al., 1960). Da mesma forma, nas espécies do grupo repleta aproximadamente 70% de todo polimorfismo de inversões estão no elemento E (Wasserman, 1992). Estudos que compararam taxas de fixação de inversões entre espécies também apontaram o elemento E como sendo o elemento que acumula maior quantidade de fixação de inversões, como no caso entre D. virilis e D. montana (Vieira et al., 1997a,b), entre D. repleta e D. buzzatii (Ranz et al., 2003), além de comparações entre outros dípteros como A. gambiae e A. funestus (Sharakhov et al., 2002), que também apresentaram maior taxa de fixação de inversões em um cromossomo que em grande parte é homologo ao elemento E de Muller. Na comparação entre D. repleta e D. melanogaster também foram reveladas diferenças no índice de fixação de inversões paracêntricas entre os elementos cromossômicos porém a taxa mais alta foi para o elemento A (cromossomo X) e a mais baixa para elemento B, com índices intermediários para os elementos D e E (González et al., 2002, 2006).

Deste modo, no que tange à distribuição do polimorfismo nas espécies aqui estudadas, ainda ficam as perguntas: A variação da distribuição do polimorfismo de inversões entre os elementos deve-se à ocorrência desigual de elementos de transposição ou sequências repetitivas, nos elementos de Muller? Esta diferença poderia ser explicada pela seleção positiva diferencial entre os elementos devido à disposição gênica entre os elementos? Seria a interação destes fatores que estariam determinando esta diferença?

Para finalizar, é valido mencionar que as comparações entre elementos das espécies estudadas tornaram-se confiáveis, pois identificamos os elementos pela localização dos genes de *D. melanogaster*. E sendo assim, podemos dizer que as identificações dos

elementos possibilitam comparações entre espécies proximamente relacionadas, além de permitir comparações com outras espécies menos relacionadas, tornando o estudo da evolução cromossômica deste grupo um modelo ainda mais atraente a ser pesquisado e instigante.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANANINA, G; PEIXOTO, AA; SOUZA, WN; KLACZKO, L B. 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; SILVA, LB; VALENTE, VLS; KLACZKO, LB. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in Drosophila mediopunctata: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. Genet. Mol. Biol. 27: 61-96.
- ANDERSON, AR; HOFFMANN, A A; MCKECHNIE, SW; UMINA P A; WEEKS AR., 2005 The latitudinal cline in the In(3R)Payne inversion polymorphism has shifted in the last 20 years in Australian Drosophila melanogaster populations. Mol. Ecol. 14: 851–858.
- ANDREYENKOVA, NG; KOKOZA, EB; SEMESHIN ,VF; BELYAEVA, ES; DEMAKOV, AS; PINDYURIN, AV; *et al.* 2009. Localization and characteristics of DNA underreplication zone in the 75C region of intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Chromosoma 118:747–761.
- ASHBURNER M & LEMEUNIER F. 1976. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus Drosophila (Sophophora). I. Inversion polymorphisms in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 193: 137–157.
- ASHBUNER, M; BERENDES, HD. 1978. Puffing of polytene chrornosomes, em The genetics and biology of Drosophila, 2B, ed Ashbuner, M; Wright, TRF. Academic Press, New York, pp 315-395

- ASHBURNER, M. 1992. Mapping insect genomes. In: Crampton J,Eggleston P (eds), Insect molecular science. Academic Press, London.
- ASHBURNER, M; GOLIC, KG;. HAWLEY, RS. 2005. Drosophila: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- AULARD, S; MONTI, L; CHAMINADE, N, LEMEUNIER F. 2004. Mitotic and Polytene Chromosomes: Comparisons Between *Drosophila Melanogaster* and *Drosophila Simulans*. Genetica 120: 137-150.
- BÄCHLI, G, 2009. TaxoDros: the database on taxonomy of Drosophilidae, version October 2009. http://taxodros.unizh.ch/.
- BARTOLOMÉ, C; CHARLESWORTH, B. 2006. Rates and patterns of chromosomal evolution in *Drosophila pseudoobscura* and *D. miranda*. Genetics 173: 779–791.
- BHUTKAR, A; SCHAEFFER, SW; RUSSO, SM; XU, M; SMITH, TF; et al. 2008. Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 Drosophila genomes. Genetics 179: 1657–1680.
- BRIANTI, MT; ANANINA, G; RECCO-PIMENTEL, SM; KLACZKO, LB. 2009. Comparative Analysis of the Chromosomal Positions of rDNA Genes in Species of the *tripunctata* Radiation of *Drosophila*. Cytog. Gen. Res.125:149-157.
- BRIDGES, CB. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 26: 60-64.
- CARSON, HL; CLAYTON, FE; STALKER, HD. 1967. Karyotypic stability and speciation in *Hawaiian Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 1280-1285.
- CARVALHO, AB; PEIXOTO, AA; KLACZKO, LB. 1989. Sex-Ratio in *Drosophila mediopunctata*. Heredity 62(2): 425-428.
- CELNIKER, S. E., AND G. M. RUBIN, 2003 The *Drosophila melanogaster* genome. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 4: 89–117.
- CÁCERES, M; RANZ, JM; BARBADILLA, A; LONG, M; RUIZ, A. 1999 Generatin of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. Science 285: 415–418.
- CÁCERES, M., M. PUIG AND A. RUIZ, 2001 Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. Genome Res. 11: 1353–1364.

- CASALS, F; CÁCERES, M; RUIZ, A. 2003. The foldback-like transposon Galileo is involved in the generation of two different atural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. Mol. Biol. Evol. 20: 674–685.
- CLAYTON, FE; GEST, WC. 1986. Overview of chromosomal evolution in the family Drosophilidae, em The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 3E, ed Ashburner, M; Carson, HL; Thomoson, JN. Academic Press, New York, pp 1-38.
- CLAYTON, FE; WHEELER MR. 1975. A catalog of *Drosophila* metaphase chromosome configurations, em Handbook os genetics, Vol. 3 Invertebrates of genetic Interest, ed King, RC. Plenum, New York, pp 471-512.
- DELPRAT, A; NEGRE, B; PUIG, M; RUIZ, A. 2009. The transposon galileo generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination. PLoS One.18(11):e7883.
- DOBZHANSKY, T; STURTEVANT, AH. 1938. Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 23: 28–64.
- GONZÁLEZ, J; RANZ, JM; RUIZ, A. 2002. Chromosomal elements evolve at different rates in the *Drosophila* genome. Genetics 161: 1137–1154.
- GONZÁLEZ, J; CASALS, F; RUIZ, A. 2006.Testing Chromosomal Phylogenies and Inversion Breakpoint Reuse in *Drosophila*. Genetics 175: 167–177.
- HATADANI, LM; MCINERNEY, JC; MEDEIROS, HF; JUNQUEIRA, ACM; AZEREDO-ESPIN, AML; KLACZKO, LB. 2009. Molecular Phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and Closely Related Species Groups (Diptera: Drosophilidae). Mol. Phyl. Evol. 3:595-600.
- HOFFMANN, AA; SGRÒ, CM; WEEKS, AR. 2004. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. TRENDS in Ecol. Evol. 19(9):482-488.
- HOFFMANN, AA; RIESEBERG, LH. 2008. Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 39:21-42.
- KASTRITSIS, CD. 1966. Cytological studies on some species of the *tripunctata* group of *Drosophila*. Univ Texas Publs Stud Genet 6615:413-474.

- KLACZKO, LB; OTTO, PA; PEIXOTO, AA. 1990. Allele Frequency Estimates When only Heterozygotes Can Be Recognized: Method of Estimation and Application. Heredity 64(2): 263-270.
- KLACZKO, LB. 1995. Population Genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: LEVINE 1995.
- KLACZKO, LB. 2006. Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. Genetica 126:43–55.
- KRIMBAS C, POWELL JR. 1992. *Drosophila* Inversion Polymorphism. Boca Raton, FL: CRC Press.
- LABORDA, PR; KLACZKO, LB; DE SOUZA AP. 2009. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. Conservation Genet Resour, published on line: 27 August 2009.
- MATZKIN, LM; MERRITT, THJS; ZHU, CT; EANES, W. 2005 The structure and population genetics of the breakpoints associated with the cosmopolitan chromosomal inversion In(3R)Payne in *Drosophila melanogaster*. Genetics 170: 1143–1152.
- MEDEIROS, HF; KLACZKO, LB. 1999. A weakly biased *Drosophila* trap. DIS 82: 100-102.
- METZ, C. 1914. Chromosome studies in the Diptera. I. Preliminary Survey of Five Different Types of Chromosome Groups in the Genus *Drosophila*. Journ. Exper. Zool. 17:50-61.
- MULLER, JH. 1940. Bearings of the *Drosophila* work on systematic, em New Systematics, ed Huxley. Clarendon Press, Oxford, pp 185-284.
- MURPHY, WJ; LARKIN, DM ;EVERTS-VAN DER WIND A; BOURQUE, G; TESLER G; et al., 2005 Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. Science 309: 613–617.
- O'GRADY, PM; BAKER, RH; DURANDO, CM; ETGES, WJ; DESALLE, R. 2001. Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. BMC Evol Biol. 1: 6.
- PAINTER, TS. 1934. A new method for the study of chromosomal aberrations and the plotting of chromosomal maps in *Drosophila melanogaster*. Genetics 19: 175–188.

- PAPACEIT, M; JUAN, E. 1993. Chromosomal homologies between *Drosophila lebanonensis* and *D. melanogaster* determined by *in situ* hybridization. Chromosoma 102: 361-368.
- PAPACEIT, M; AGUADÉ, M; SEGARRA, C. 2006. Chromosomal evolution of elements B and C in the *Sophophora* subgenus of *Drosophila*: evolutionary rate and polymorphism. Evolution 60(4): 768–781.
- PATTERSON, J.T. 1943 The Drosophilidae of the Southwest. Univ. Texas Publs 4313:7-216.
- PATTERSON, J; STONE, W. 1952. Evolution in the Genus *Drosophila*. New York: Macmillan Co.
- PATTERSON, JT. 1957. A study of interspecific hybridization between members of the *tripunctata* group of *Drosophila*. Univ. Texas Publs 5721:7-14.
- PEIXOTO AA, KLACZKO LB 1991. Linkage disequilibrium analysis of chromosomal nversion polymorphisms of *Drosophila*. Genetics 129: 773-777.
- PEVNER, P; TESLER, G. 2003. Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. Genome Res. 13:37–45.
- PIPKIN, SB; HEED, WB, 1964. Nine new menbrers of the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera: Drosophilidae). Pacific Insects 6 (2) : 256-273.
- POWELL, JR.1997. Progress and prospects in evolutionary biology, em The *Drosophila* model. Oxford University Press, New York.
- RANZ, JM; GONZÁLEZ, J; CASALS, F; RUIZ, A. 2003. Low occurrence of gene transposition events during the evolution of the genus *Drosophila*. Evolution 57(6):1325-35.
- RANZ, JM; MAURIN, D; CHAN, YS; GROTTHUSS, MV; HILLIER, LW; et al. 2007 Principles of genome evolution in the *Drosophila melanogaster* species group. PLoS Biol. 5: 1366–1381.
- RICHARDS, S; LIU, Y; BETTENCOURT, BR; HRADECKY, P; LETOVSKY, S; *et al.* 2005. Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene, and cis-element evolution. Genome Res. 15: 1–18.

- RANZ, JM; GONZÁLEZ, J; CASALS, F; RUIZ, A. 2003. Low occurrence of gene transposition events during the evolution of the genus *Drosophila*. Evolution 57:1325– 1335.
- RICHARDS, S; LIU, Y; BETTENCOURT, BR; LETOVSKY, PS; *et al.* 2005. Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene, and cis-element evolution. Genome Res. 15:1–18.
- ROBE, LJ; VALENTE, VL; BUDNIK, M; LORETO, EL. 2005.Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. Mol. Phylo. Evol. 36: 623–640.
- SHARAKHOV, IV; SERAZIN, AC; GRUSHKO, OG; DANA, A; LOBO, N; HILLENMEYER, ME; et al. 2002. Inversions and gene order shuffling in Anopheles gambiae and A. funestus. Science 298:182–185.
- SCHAEFFER, SW; BHUTKAR, A; MCALLISTER, BF; MATSUDA, M; MATZKIN LM *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.
- SEGARRA, C; AGUADE, M. (1992). Molecular organization of the X chromosome in different species of the *obscura* group of *Drosophila*. Genetics 130(3): 513-521.
- STONE, W; GUEST, SWC; WILSON, F D. 1960. The evolutionary implications of the cytological polymorphism and phylogeny of the *virilis* group of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 350–361.
- STURTEVANT, A.H., NOVITSKI, E. (1941). The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. Genetics 26: 517-541.
- THROCKMORTON, L H. 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*, em Handbook of Genetics, ed King, RC. Plenum, New York, pp 421-459.
- THROCKMORTON, LH. 1982. The virilis species group, em The Genetics and Biology of Drosophila. ed. Ashburner, M; Carson, HL; Thompson, JN. Jr. Academic Press, London, pp. 227–296.

VIEIRA, J; VIEIRA, CP; HARTL, DL; LOZOVSKAYA, ER. 1997a. A framework physical map of *Drosophila virilis* based on P1 clones: applications in genome evolution. Chromosoma 106:99–107.

- VILELA, C R. 1992. On the *tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae) Revta. Bras. Ent. 36: 197-221.
- WASSERMAN, M. 1992. Cytological evolution of the Drosophila replete species group, pp. 455–552 in Drosophila Inversion polymorphism, edited by C. B. Krimbas and J. R. Powell. CRC Press, Boca Raton, FL.
- YOTOKO, KSC; MEDEIROS, HF; SOLFERINI, VN; KLACZKO, LB. 2003. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. Molec. Phylog. Evol. 28: 614-619.

<sup>———. 1997</sup>b. Discordant rates of chromosome evolution in the *Drosophila virilis* species group. Genetics 147:223–230.

VI. Apêndice

Comparações qualitativas dos padrões de bandas dos elementos B e D entre as espécies *D. mediopunctata*, *D. unipunctata* e *D. roehrae*.

Como vimos anteriormente, os elementos B e D são os mais conservados e menos polimórficos em *D. mediopunctata*, *D. unipunctata* e *D. roehrae*. Desta maneira, realizamos uma comparação qualitativa prévia do padrão de bandas destes elementos entre as três espécies.

As comparações estão apresentadas nas figuras 1 e 2. Em cada uma das figuras apresentamos o fotomapa do respectivo elemento de cada uma das espécies, a ser comparado. Em todos os cromossomos apresentados também anotamos as informações das localizações dos genes de *D. melanogaster* visando a confirmação da homologia estabelecida pela análise do padrão de bandas.

Deste modo, o que observamos, tanto para a comparação do elemento B quanto do D entre as espécies, foi que estes elementos são quase homossequencias entre as espécies estudadas. Notamos apenas uma pequena inversão, entre *D. mediopunctata* e *D. unipunctata*, no elemento D ela foi também confirmada pela posição do gene MHC na hibridação. Para o elemento B, foi confirmadaa homologia em dois pequenos fragmentos, entre as espécies *D. mediopunctata* e *D. roehrae*. Estas regiões estão destacadas na figura.



**Figura 1**. Comparação do elemento D de *D. unipuncata* (UNI), *D. mediopunctata* (MPT) e *D. roehrae* (RO), mostrando a localização dos genes: Hsp27 (*Heat shock protein 27*) com setas cheias e Hsp83(*Heat shock protein 83*) com setas vazadas. Também estão destacadas com retângulo regiões onde não se conseguiu estabelecer homologia.





#### VII. CONCLUSÕES GERAIS

As conclusões gerais deste trabalho foram:

- A presença de uma NOR em cada cromossomo sexual é uma condição ancestral no gênero *Drosophila* e este caráter é bem conservado neste gênero.

- Os cromossomos politênicos das espécies *D. mediopunctata*, *D. roehrae* e *D. unipunctata* são bem similares, sendo relativamente fácil determinar a homologia dos cromossomos menos polimórficos pela análise qualitativa do padrão de bandas.

- Existe um padrão de distribuição do polimorfismo de inversões entre os elementos de Muller nestas espécies: o elemento E é o mais polimórfico, com muitas inversões em cada espécie, e o elemento C é o segundo mais polimórfico; enquanto D e B são os menos polimórficos.

- *D. unipunctata* apresenta uma conformação cariotípica singular, a despeito das espécies *D. mediopunctata* e *D. unipunctata* serem consideradas filogeneticamente mais próximas que *D. roehrae* pelo uso de marcadores moleculares em trabalhos prévios; o que sugere uma rápida evolução cromossômica.

Nosso trabalho gerou questões e com isso perspectivas para futuros pesquisas:

Qual o significado da constância da posição do rDNA nos cromossomos sexuais em *Drosophila*?

Qual o significado, origem e implicações da rápida mudança na conformação do cariótipo de *D. unipunctata*?

Qual a origem do par extra., de cromossomos que aparece nos núcleos mitóticos, de *D. unipunctata* mas não se politeniza?

Qual é a história evolutiva deste grupo de espécies, analisando os cromossomos politênicos?

Quais são os determinantes das diferenças no grau de polimorfismo entre os elementos? Por exemplo, haveria alguma relação com:

Distribuição diferencial de transposons ou de seqüências repetitivas? Seleção diferencial entre os elementos?

Diferença do conteúdo gênico entre os elementos?

57

### VIII. Bibliografia Geral

- ANANINA, G; PEIXOTO, AA; SOUZA, WN; KLACZKO, L B. 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; SILVA, LB; VALENTE, VLS; KLACZKO, LB. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. Genet. Mol. Biol. 27: 61-96.
- ANDREYENKOVA, NG; KOKOZA, EB; SEMESHIN ,VF; BELYAEVA, ES; DEMAKOV, AS; PINDYURIN, AV; *et al.* 2009. Localization and characteristics of DNA underreplication zone in the 75C region of intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Chromosoma 118:747–761.
- ASHBURNER, M. 1992. Mapping insect genomes. In: Crampton J,Eggleston P (eds), Insect molecular science. Academic Press, London
- ASHBUNER, M; BERENDES, HD. 1978. Puffing of polytene chrornosomes. In: Ashbuner M, Wright TRF (eds) The genetics and biology of *Drosophila*, 2B. Academic Press, New York, pp 31 5-395.
- ASHBURNER M & LEMEUNIER F. 1976. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus Drosophila (Sophophora). I. Inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 193: 137–157.
- ASHBURNER, M; GOLIC, KG;. HAWLEY, RS. 2005. Drosophila: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- BÂCHLI, G. 2009.The database on taxonomy of Drosophilidae, Database 2009/10; TaxoDros v1.03. http://www.taxodros.uzh.ch/search/bin/. 16/10/2009.
- BACHTROG, D; CHARLESWORTH, B. 2003. On the Genomic Location of the *exuperantial* Gene in *Drosophila miranda*: The Limits of *in Situ* Hybridization Experiments. Genetics, 164: 1237-1240.

- BARTOLOMÉ, C; CHARLESWORTH, B. 2006. Rates and patterns of chromosomal evolution in *Drosophila pseudoobscura* and *D. miranda*. Genetics, 173: 779-791.
- BELLER M; OLIVER B. 2006. One hundred years of high-throughput *Drosophila* research. Chromosome Res. 14:349–362.
- BHUTKAR, A; RUSSO, SM; SMITH, TF; GELBART, WM. 2007. Genome scale analysis of positionally relocated genes. Genome Res. 17: 1880–1887.
- BHUTKAR, A; SCHAEFFER, S W; RUSSO SM, XU, M; SMITH, FT; GELBART, WM. 2008. Chromosomal Rearrangement Inferred From Comparisons of 12 *Drosophila* Genomes. Genetics 179: 1657–1680.
- BICUDO, HEMC. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*. 1873. Genetica 44:520-552.
- BONDINAS, GP; LOUKAS, MG; GOULIELMOS, GN; SPERLICH, D. 2002. The actin loci in the genus Drosophila: establishment of chromosomal homologies among five nearctic species of the Drosophila obscura group by in situ hybridization. Chromosoma 111(4):256-66.
- BRIDGES, CB. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 26: 60-64.
- BUSIN, CS; ANDRADE, GV; BERTOLDO, J; DEL GRANDE, ML; UETANABARO, M; RECCO-PIMENTEL SM. 2008. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of Zz/Zw sex chromosomes in *P. tocantins*. Genetica 133: 119-27.
- CABRERO, J; CAMACHO, JPM. 2008. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. Chromosome Res. 16:595–607.
- CARSON, HL. 1987. Tracing ancestry with chromosomal sequences. TREE 2:203-207.
- CARSON, HL. 1992. Inversions in Hawaiian *Drosophila*. In: Krimbas CB, Powell JR, editors. *Drosophila* inversion polymorphism. Boca Raton (Florida): CRC Press. pp. 407–439.
- CARVALHO, AB; PEIXOTO, AA; KLACZKO, LB. 1989. Sex-Ratio in *Drosophila mediopunctata*. Heredity 62(2): 425-428.

CLARK A, GIBSON G, KAUFMAN T, MYERS E, O'GRADY P (2003). Proposal for *Drosophila* as a model system for comparative genomics.

www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/ SeqProposals/Drosophila.pdf.

- CLAYTON, FE; CARSON, HL; SATO, JE. 1972. Polytene chromosome relationships in Hawaiian species of *Drosophila*. Univ. Texas Publs. **7**(7213): 163–177.
- CLAYTON, FE; GEST, WC. 1986. Overview of chromosomal evolution in the family Drosophilidae, pp. 1-38 in The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 3E, edited by M. Ashburner, H.L. Carson and J.N. Thomoson. Academic Press, New York.
- CUENCA, JB; GALINDO, MI; SAURA, AO; SORSA, V; DE FRUTOS, R. 1998. Ultrastructure of regions containing homologous loci in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila subobscura*. Chromosoma 107: 113-126.
- DE LA RÚA, P J; HEWITT, M; GALIÁN, J. 1996. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). J. Zool. Syst. Evol. Res. 34: 95-101.
- DESALLE, R; GREGORY,TR; JOHNSTON, JS. 2005. Preparation of samples for comparative studies of arthropod chromosomes: Visualization, in situ hybridization, and genome size estimation. Methods Enzymol. 395:460-88.
- DOBZHANSKY, T; STURTEVANT, AH. 1938. Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 23: 28–64.
- DOBZHANSKY, T; PAVAN, C. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. Bolm Fac. Filos. Cienc. S. 36:7-72.
- DOBZHANSKY, T. 1949. Observations and experiments on natural selection in *Drosophila*. In Proc. Int. Congress. Genet., pp. 210–224.
- ENGELBRECHT, A; DOBIGNY, G; ROBINSON, TJ. 2006. Further insights into the ancestral murine karyotype: the contribution of the Otomys-Mus comparison using chromosome painting. Cytogenet Genome Res. 112(1-2):126-30.
- FROTA-PESSOA O. 1954. Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). Arquivo do Museu Paranaense, Curitiba 10: 253-330.

- GALIÁN, J; SERRANO, J; DE LA RÚA, P; PETITPIERRE, E; JUAN, C.
  1995.Localization and Activity of rDNA Genes in *Tiger beetles* (Coleoptera: Cicindelinae). Heredity 74: 524-530.
- GALIÁN, J; DE LA RÚA, P; SERRANO, J; JUAN, C; HEWITT, GM. 1999. Phylogenetic relationships in West Mediterranean Scaritina (Coleoptera : Carabidae) inferred from mitochondrial COI sequences and karyotype analysis. J. Zool. Syst. Evol. Res. 37: 85-92.
- GANLEY ARD, KOBAYASHI T. 2007. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res. 17: 184-91.
- GERBAULT-SERREAU, M; BONNET-GARNIER, A; RICHARD, F; DUTRILLAUX, B. 2004. Chromosome painting comparisons of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichine, Platyrrhini) with man and its phylogenetic position. Chromosome Res 12:691–701.
- GLOVER DM. 1977. Cloned segment of *Drosophila melanogaster* rDNA containing new types of sequence insertion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4932–4936.
- GODAY, C; SELIVON, D; PERONDINI, ALP; GRECIANO, PG; RUIZ, MF. 2006.
   Cytological Characterization of SexChromosomes and Ribosomal DNA Location in Anastrepha Species (Diptera, Tephritidae). Cytogenet Genome Res 114: 70-6.
- GONZÁLEZ, J; RANZ, JM; RUIZ, A. 2002. Chromosomal elements evolve at different rates in the *Drosophila* genome. Genetics 161: 1137–1154.
- GONZÁLEZ, J; CASALS, F; RUIZ, A. 2006.Testing Chromosomal Phylogenies and Inversion Breakpoint Reuse in *Drosophila*. Genetics 175: 167–177.
- GREGORY, TR; JOHNSTON, JS. 2008. Genome size diversity in the family Drosophilidae. Heredity 101(3):228-38.
- HALANYCH KM, BACHELLER JD, AGUINALDO AM, LIVA SM, HILLIS DM, LAKE JA. 2005. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. Science 267: 1641-1643.
- 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.

- HECKEL, DG. 1993. Comparative genetic likage mapping in insects. Annul. Rev. Entomol. 38: 381-408.
- HIRAI, H; HASEGAWA, Y; KAWAMOTO, Y; TOKITA, E. 1998. Tandem duplication of nucleolus organizer region (NOR) in the japanese macaque, *Macaca fuscata fuscata*. Chromosome Res. 6: 191-7.
- HODGES, WL; ZAMUDIO, KR. 2004. Horned lizard (*Phrynosoma*) phylogeny inferred from mitochondrial genes and morphological characters: understanding conflicts using multiple approaches. Mol. Phylogenet Evol. 31(3):961-71.
- HOFFMANN, AA; SGRO, CM; WEEKS, AR. 2004. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. Trends Ecol. Evol. 19:482–88.
- HOFFMANN, AA; RIESEBERG, LH. 2008. Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 39:21–42.
- JAENIKE, J; GRIMALDI DA; SLUDER, AE; GREENLEAF, AL. 1985. *agr-Amanitin* tolerance in mycophagous *Drosophila*. : Science 8;221(4606):165-167.
- JAENIKE J. 1986. Genetic complexity of host-selection behavior in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(7):2148-2151.
- JAENIKE J. 1987. Genetics of oviposition-site preference in *Drosophila tripunctata*. Heredity 59 (3):363-9.
- JOHN, B; MIKLOS, GLG. 1988. The Eukaryote Genome in Development and Evolution. (London: Allen and Unwin).
- KASTRITSIS, CD. 1966. Cytological studies on some species of the *tripunctata* group of *Drosophila*. Univ Texas Publs Stud Genet 6615:413-474.
- KASTRITSIS CD, PASTEUR G, QUICK J: 1970.Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediostriata* and *D. griseolineata*. Can. J. Genet. Cytol. 12: 952-9.
- KLACZKO, LB; BITNERMATHÉ, BC. 1990. On The Edge of a Wing. Nature (London) 346(2):321-321

- KLACZKO, LB; OTTO, PA; PEIXOTO, AA. 1990. Allele Frequency Estimates When only Heterozygotes Can Be Recognized: Method of Estimation and Application. Heredity 64(2): 263-270.
- KLACZKO LB. 1995. Population Genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: LEVINE 1995.
- KLACZKO, LB. 2006. Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. Genetica 126: 43-55.
- KOCH, MA; KIEFER, M. 2005. Genome evolution among cruciferous plants: a lecture from the comparison of the genetic maps of three diploid species—*Capsella rubella*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, and *A. thaliana*.<sup>-</sup> American J. Botany 92:761-767.
- KRIMBAS, CB; M. LOUKAS. 1984. Evolution of the obscura group Drosophila species. I. Salivary chromosomes and quantitative characters in D. subobscura and two closely related species. Heredity 53:469-482.
- LEMEUNIER, F; DAVID, JR; TSACAS, L. 1986. The *melanogaster* species group. In Ashburner, M, HL Carson & JN Thompson, eds. The genetics and biology of Drosophila. Vol. 3e. Academic Press, London, pp. 148–256.
- LERCHER, MJ; BLUMENTHAL, T; HURST, LD. 2003. Coexpression of neighboring genes in *Caenorhabditis elegans* is mostly due to operons and duplicate genes. Genome Res. 13: 238–243.
- LORETO, V; CABRERO, J; LÓPEZ-LEÓN, MD; CAMACHO, JPM; DE SOUZA, MJ. 2008. Comparative analysis of rDNA location in five Neotropical gomphocerine grasshopper species. Genetica 132: 95-101.
- MARCHI, A; PILI, E.1994. Ribosomal RNA Genes in Mosquitoes: Localization by Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH). Heredity 72: 599-599.
- MARKOW, TA; O'GRADY, PM. 2007. *Drosophila* Biology in the Genomic Age. Genetics 177: 1269–1276
- MARTÍNEZ-NAVARRO, EM; SERRANO, J; GALIÁN, J.2004. Chromosome evolution in ground beetles: localization of the rDNA loci in the tribe *Harpalini* (Coleoptera, Carabidae). J. Zool. Syst. Evol. Research 42 38–43.

- MCDANIEL R, HOSTERT EE & SEAGER RD. 1995. Acclimation and adaptive behavior of *Drosophila robusta* and *D. tripunctata* adults in response to combined temperature and desiccation stress. Amer. Mid. Natur. 133:52-59.
- MEIER, R; WIEGMANN, BM. 2002. A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. Mol Phylogenet Evol. 25(3):393-407.
- MICHAILOVA, P; KRASTANOV, B; HANKELN, T; SCHMIDT, E; KRAEMER, C. 2009. In situ localization of the evolutionary conserved Cpy/Cty gene in the subfamily *Chironominae* (Chironomidae, Diptera): establishment of chromosomal homologies. J. Zool. Syst. Evol. Res. 47(3): 298 301.
- MULLER, JH. 1940. Bearings of the *Drosophila* work on systematic, em New Systematics, ed Huxley. Clarendon Press, Oxford, pp 185-284.
- NAVARRO, A; BARTON, NH. 2003. Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: A new twist on chromosomal speciation. Evol. Int. J. Org. Evol. 57: 447–459.
- NEAR, TJ; PESAVENTO, JJ; CHENG, CH. 2003. Mitochondrial DNA, morphology, and the phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidei: Channichthyidae). Mol. Phylogenet Evol. 28(1):87-98.
- NIE, W; O'BRIEN, PC; FU, B; WANG, J; SU, W; FERGUSON-SMITH, MA; ROBINSON, TJ; YANG, F. 2006. Chromosome painting between human and lorisiform prosimians: evidence for the HSA 7/16 synteny in the primate ancestral karyotype. Am. J. Phys. Anthropol.129(2):250-9.
- O'GRADY, PM; BAKER, RH; DURANDO, CM; ETGES, WJ; DESALLE, R. 2001. Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. BMC Evol. Biol. 1: 6.
- DE OLIVEIRA, EH; HABERMANN, FA; LACERDA, O; SBALQUEIRO, IJ; WIENBERG, J; MULLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). Chromosoma. 2005 Nov;114(5):338-43.
- OTTO, SP; BARTON, NH. 2001. Selection for recombination in small populations. Evol. Int. J. Org. Evol. 55: 1921–1931.
- PAINTER, TS. 1934. A new method for the study of chromosomal aberrations and the plotting of chromosomal maps in *Drosophila melanogaster*. Genetics 19: 175–188.
- PAPACEIT, M; JUAN, E. 1993. Chromosomal homologies between *Drosophila lebanonensis* and *D. melanogaster* determined by *in situ* hybridization. Chromosoma 102: 361-368.
- PARDUE, ML; GALL, JG, 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64 (2): 600–604.
- PARDUE, ML; GERBI, SA; ECKHARDT, RA; GALL, JG. 1970. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. Chromosoma 29: 268-290.
- PAREDES, S; MAGGERT, KA. 2009. Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. PNAS 106(42): 17829-17834.
- PATTERSON, J.T. 1943 The Drosophilidae of the Southwest. Univ. Texas Publs 4313:7-216.
- PATTERSON, J; STONE, W. 1952. Evolution in the Genus *Drosophila*. New York: Macmillan Co.
- PEIXOTO AA, KLACZKO LB 1991. Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. Genetics 129: 773-777.
- PIPKIN, SB; HEED, WB, 1964. Nine new members of the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera: Drosophilidae). Pacific Insects 6 (2) : 256-273.
- POLANCO, C; GONZALEZ, AI; DE LA FUENTE; DOVER, GA. 1998. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. Genetics; 149 (1):243-56.
- POWELL, JR.1997. Progress and prospects in evolutionary biology, em The *Drosophila* model. Oxford University Press, New York.
- RANZ, JM; CASALS, F; RUIZ, A. 2001. How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. Genome Res. 11(2): 230-239.

- RANZ, JM; GONZÁLEZ, J; CASALS, F; RUIZ, A. 2003. Low occurrence of gene transpositions envents during the evolution of the genus *Drosophila*. Evolution, 57(6): 1325–1335.
- RICHARDS, S; LIU, Y; BETTENCOURT, BR; HRADECKY, P; LETOVSKY, S; NIELSEN, R; *et al.* 2005. Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: Chromosomal, gene, and *cis*-element evolution. Genome Res. 15(1):1-18.
- ROBE, LJ; VALENTE, VL; BUDNIK, M; LORETO EL. 2005.Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. Mol.Phylo. Evol. 36: 623–640.
- ROCHA, F; MEDEIROS, HF; KLACZKO, LB. 2009. The Reaction Norm for Abdominal Pigmentation and its Curve *Drosophila mediopunctata* Depend on the Mean Phenotypic Value. Evolution 63: 280-287.
- ROHDE, C; GARCIA, AC; VALIATI, VH; VALENTE, VL. 2006. Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. chromosomal arm IIR (Muller's element B). Genetica 126(1-2):77-88.
- ROY, V; MONTI-DEDIEU, L; CHAMINADE, N; SILJAK-YAKOVLEV, S; AULARD, S; LEMEUNIER, F; *et al.* 2005. Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. Heredity 94: 388– 95.
- REMSEN, J; O'GRADY, P. 2002. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. Mol Phylogenet Evol. 24(2):249-64.
- SÁNCHEZ-GEA, J F; SERRANO, J; GALIÁN, J. 2000. Variability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence in situ hybridization. Genome 43, 22–28.
- SANTOS M. 2009. Recombination Load in a Chromosomal Inversion Polymorphism of *Drosophila subobscura*. Genetics 181(2): 803-809.

- SAURA, AO; CUENCA, JB; HEINO, TI; DE FRUTOS, R; SORSA, V. 2002. The polytene dot chromosome of *Drosophila*: *D. melanogaster* and *D. subobscura*. Chromosoma 111(4):273-83.
- SCHAEFFER, SW; BHUTKAR, A; MCALLISTER, BF; MATSUDA, M; MATZKIN, LM; O'GRADY, PM; *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.
- SCHLÖTTERER, C & TAUTZ, D. 1994. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNAarrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. Curr. Biol. 4:777–83.
- SCHULZE, SR; KATHLEEN, BF; FITZPATRICK, A; MARCHETTI, M; PIMPINELLI, S; HONDA, BM. 2006. Heterochromatic genes in *Drosophila*: a comparative analysis of two genes. *Genetics*: Published Articles Ahead of Print, published on April 30, as 10.1534/genetics.106.056069.
- SEAGER,R. 1991: A simple model of the climatology and variability of the low level wind field in the tropics. J. Climate, 4, 164-179
- SENE FM, VAL FC, VILELA CR, PEREIRA MAQR. 1980. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. Papéis Avuls. Zool. S. Paulo 33, 315-326.
- SINGH, M; KUMAR, R; NAGPURE, NS; KUSHWAHA, B; MANI, I; LAKRA, WS. 2009. Extensive NOR site polymorphism in geographically isolated populations of Golden mahseer, Tor putitora. Genome 52(9): 783-789.
- SPELLMAN, PT; RUBIN, GM. 2002. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. J. Biol. 1: 5. SHISHIDO R, SANO Y, FUKUI K. 2000. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. Mol. Gen. Genet. 263: 586-91.
- STAGE DE, EICKBUSH TH. 2007. Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 Drosophila species. Genome Res 17: 1888.
- STALKER, HD. 1972. Intergroup phylogenies in *Drosophila* as determined by comparisons of salivary banding patterns. Genetics 70: 457-474.

- STEINEMAN, UM; PINSKER, W; SPERLICH, D. 1984. Chromosome homologies within the *Drosophila obscura* group probed by *in situ* hybridization. Chromosoma 91: 46-53.
- STURTEVANT, AH; BEADLE, GW. 1936. The relations of inversions in the X chromosome of *Drosophila melanogaster* to crossing over and disjunction. Genetics 2(1): 554-604.
- STURTEVANT, AH; DOBZHANSKY, TH. 1936. Inversions in the third chromosome of wild races of *Drosophila pseudoobscura* and their use in the study of the history of the species. Proc. nat. Acad, Sci. 22:448-450.
- STURTEVANT, A H; NOVITSKI E. 1941. The homologies of chromosome elements in the genus *Drosophila*. Genetics 26: 517-541.
- SWANSON, CP; MERZ, T; YOUNG, WJ. 1981. Cytogenetics: The chromosome in division, inheritance and evolution. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
- TAMURA K, SUBRAMANIAN S, KUMAR S (2004) Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. Mol Biol Evol 21: 36–44.
- THROCKMORTON, LH. 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. Handbook of Genetics 3: 421-69 (1975).
- THROCKMORTON, LH. 1982. The virilis species group, pp. 227–296 in in The Genetics and Biology of Drosophila. Edited by M. Ashburner, H.L. Carson & J.N. Thompson Jr. Academic Press, London.
- TRIFONOV, VA; STANYON, R; NESTERENKO, AI; FU, B; PERELMAN, PL; O'BRIEN, PCM. 2007. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in *Perissodactyla*. Chromosome Res. 16:89–107.
- VEIGA-MENONCELLO ACP, LIMA AP, RECCO-PIMENTEL SM. 2003. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura - Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. Hereditas 139: 189-98.
- VELTSOS, P; KELLER, I; NICHOLS, RA. 2009. Geographically localised bursts of ribosomal DNA mobility in the grasshopper Podisma pedestris. Heredity 103(1): 54-61.

- VILELA CR. 1992. On the *Drosophila tripunctata* Species Group (diptera, Drosophilidae). Revta Bras Entomol 36: 197-221.
- WASSERMAN, M. 1982. Evolution of the repleta group, pp. 61– 139. In The Genetics and Biology of *Drosophila*. Edited by M. Ashburner, H.L. Carson &J.N. Thompson Jr. Academic Press, London.
- WASSERMAN, M. 1992. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group, pp. 455–552 in *Drosophila* Inversion Polymorphism, edited by C. B. Krimbas. CRC Press, Boca Raton, FL.
- WHITING, JH JR; PLILEY, MD; FARMER, JL; JEFFERY, DE. 1989. In situ hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. Genetics 122 (1):99-109.
- YANG, F; GRAPHODATSKY, AS; LI, T; FU, B; DOBIGNY, G; WANG, J; PERELMAN, PL; SERDUKOVA, NA; SU, W; O'BRIEN, PC; WANG, Y; FERGUSON-SMITH, MA; VOLOBOUEV, V; NIE, W. 2006. Comparative genome maps of the pangolin, hedgehog, sloth, anteater and human revealed by cross-species chromosome painting: further insight into the ancestral karyotype and genome evolution of eutherian mammals. Chromosome Res. 2006;14(3):283-96.
- YOON, JS; RESCH, K; WHEELER, MR. 1972. Intergeneric chromosomal homology in the family Drosophilidae. Genetics 71: 447-480.
- YOTOKO, K; MEDEIROS, HF; SOLFERINI, VN; KLACZKO, LB. 2003. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. Mol. Phyl. Evol. 28: 614-619.