

SÉRGIO ROBERTO DE SOUZA LEÃO DA COSTA CAMPOS

**Homologia entre os cromossomos politênicos dos gêneros
Drosophila e *Zaprionus*: fotomapa e mapeamento gênico
por hibridização *in situ* em *Z. indianus***

Recife

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Sérgio Roberto de Souza Leão da Costa Campos

Homologia entre os cromossomos politênicos dos gêneros
***Drosophila* e *Zaprionus*: fotomapa e mapeamento gênico**
por hibridização *in situ* em *Z. indianus*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco
para a obtenção do título de Mestre em
Genética.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira dos Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Tania Tassinari Rieger

Recife
2005

Campos, Sérgio Roberto de Souza Leão da Costa
Homologia entre os cromossomos politênicos dos
gêneros *Drosophila* e *Zaprionus* : fotomapa e
mapeamento gênico por hibridização *in situ* em *Z.
indianus*. – Recife : O Autor, 2005.
82 folhas. : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Genética, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Genética – Citogenética animal. 2.
Cromossomos politênicos – *Zaprionus indianus* –
Construção de fotomapa. 3. Hibridização *in situ* –
Mapeamento genético – Genes de choque térmico e
genes de desenvolvimento. 4. Espécie e gênero -
Comparação. I. Título.

575
591.38

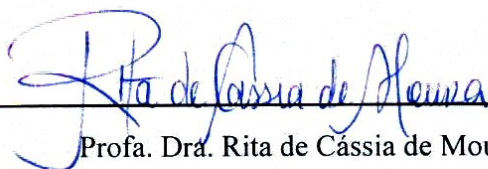
CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-027

**Homologia entre os cromossomos politênicos dos gêneros
Drosophila e *Zaprionus*: fotomapa e mapeamento gênico
por hibridização *in situ* em *Z. indianus***

Sérgio Roberto de Souza Leão da Costa Campos

Dissertação aprovada por:



Profa. Drá. Rita de Cássia de Moura

Depto. de Biologia, UPE

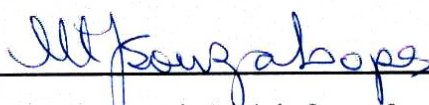
(Titular Externo)



Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Depto. de Biologia, UFRPE

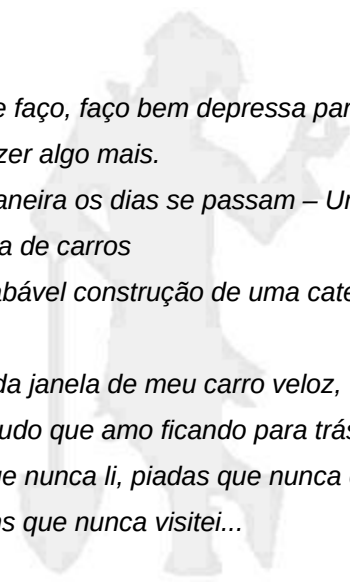
(Titular Externo)



Profa. Dra. Maria José de Souza Lopes

Depto. de Genética, UFPE

(Titular Interno)



*Tudo que faço, faço bem depressa para que
possa fazer algo mais.
Desta maneira os dias se passam – Uma mistura
de corrida de carros
e a inacabável construção de uma catedral
gótica.
Através da janela de meu carro veloz,
Eu vejo tudo que amo ficando para trás:
Livros que nunca li, piadas que nunca contei,
paisagens que nunca visitei...*

Stephen Dobyns, Pursuit.

**Aos meus pais e minha irmã, pelo
apoio dado durante todos os momentos
nesta etapa.**

AGRADECIMENTOS

Eu não poderia começar meus agradecimentos aqui se antes não contasse rapidamente uma história. Ela começa logo no início do ano 2000, quando fui ao Departamento de Genética e me ofereci para estagiar com o Dr. José Ferreira e a Dra. Tania Rieger. Foi justamente nessa mesma época que os mesmos realizaram a primeira coleta na Bahia de uma desconhecida mosquinha de faixas prateadas e me confiaram aos cuidados esse drosofilídeo que sequer conhecíamos o nome ainda.

Nessa época, os trabalhos com *Drosophila* ainda se realizavam no Laboratório de Microorganismos e lá conheci Anne, Pierre, Leo e Hélio, colegas que se tornaram amigos e responsáveis pelo ótimo convívio ao longo daquele primeiro ano. Com o passar do tempo, fomos crescendo. Ísis, Sandra, João Paulo e alguns outros se juntaram ao grupo e logo foi construída nossa primeira “sala das moscas” no Laboratório.

Passados alguns anos, companheiros se foram, outros surgiram brevemente e meu tempo de graduado se foi, encerrando-se com a primeira etapa de um ciclo. Segui novo rumo e ingressei no Mestrado dando continuidade aos trabalhos que iniciei na minha monografia. No meio desse tempo, mais uma vez acompanhei o crescimento da *Drosophila* com a mudança para o seu próprio espaço, agora como parte do Laboratório de Genética Animal. No último ano, vi a chegada dos mais novos drosofilistas que tive o prazer de ajudar: Patrícia, Nara, Kelma, Williamis, junto com as “gafanhotólogas”, Bárbara e Thatiana. E, até mesmo próximo à conclusão de meus trabalhos aqui, fico ainda feliz em saber que mais gente está entrando para dar continuidade à história que vi bem de perto no começo.

Para que eu pudesse terminar o meu trabalho e estar aqui escrevendo essa história, tenho que agradecer aos meus dois orientadores, Dr. José Ferreira e Dra. Tania Rieger, pela confiança irrestrita que desde sempre depositaram em mim, mesmo quando muitas vezes eu me achasse muito novo e inexperiente para tal, pela orientação durante esses anos e pela compreensão e ajuda durante as dificuldades que tive durante o Mestrado.

Devo essa história também aos meus companheiros de laboratório citados acima, que por tantas vezes dividiram comigo momentos tão divertidos, o que me faz insistir com aqueles que agora chegam sobre quão importante é o bom convívio e o trabalho em equipe. O mesmo vale para Zizi, Francisca, Cirlene, Romildo, Marco e os demais funcionários do Departamento que sempre me foram tão prestativos.

Agradeço também toda a disponibilidade oferecida pela Dra. Maria José Lopes e Dra. Neide Santos do Laboratório de Genética Animal e ao Dr. Marcos Moraes Jr do

Laboratório de Microorganismos, não só durante o meu Mestrado, mas para a conclusão de meu curso como Bacharel. Também devo ressaltar aqui a carinhosa hospitalidade oferecida pela Dra. Vera Valente da UFRGS e pela Dra. Marlúcia Martins do Museu Goeldi durante as viagens que realizei ao longo do curso.

Parte de tudo isso que conto a vocês aqui, eu devo aos meus amigos mais próximos, personagens igualmente fundamentais na minha vida. Guga e Sócrates sempre foram os aliados de todas horas com quem dividi fraternalmente minhas experiências e assim será não importa onde estejamos. Cláudia, minha amiga de infância, conseguiu superar a alegria da minha aprovação no Mestrado, quando trouxe ao mundo a minha afilhada, a pequena Milena, naquele dia de dezembro. Leonardo é o grande amigo que levo para fora do Laboratório, que tem toda a minha confiança e, certamente, a quem devo muito. Cíntia é a amiguinha que terá como missão sempre me ensinar a não desistir. Cleiton e Fábio são os primeiros que resgatarão boas memórias de velhos tempos sempre quando nos encontrarmos. Já com Débora, minha amiga cada vez mais nipônica, sei que continuarei brincando e implicando como sempre foi, indiferente à diferença de fuso horário. Alguns outros que não estão aqui, certamente serão sempre lembrados.

Paralelo a essa história, eu também deixo aqui meu muito obrigado a dois queridos amigos distantes, Paulo Maruca e Priscila Henriques, que são verdadeiros “deuses” de seu mundo e que escolhi para representar muitos outros que não caberiam aqui nesse espaço. A esses todos eu agradeço porque me fizeram encontrar um “x” que faltava.

Por fim, agradecerei essa história sempre aos meus pais, José Roberto e Lúcia, e à minha irmã, Beta, a quem dediquei esse trabalho e toda minha grande família pelo apoio que sempre deram às minhas decisões desde que ingressei no curso e pela força, auxílio e carinho que precisei durante esses anos. Sem eles, nada disso seria feito.

E aqui, mais uma vez, eu chego no limiar de mais um novo ciclo, olhando para trás já com saudade e agradecendo com um sorriso a todos que foram citados aqui nessa história. E seja qual for o caminho que seguirei, levarei a lembrança de todos na bagagem.

Sérgio Roberto Campos

*Um bom Viajante não tem planos fixos e nem intenção de chegar a algum lugar
Lao Tzu (870-490ac)*

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas	10
RESUMO	11
I. INTRODUÇÃO	12
II. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Ordem Díptera.....	16
2.2. Família Drosophilidae.....	17
2.3. Gênero <i>Zaprionus</i>	18
2.4. Cromossomos Politênicos.....	22
2.5. Evolução de Drosofilídeos.....	23
2.6. Hibridização <i>in situ</i> em Drosofilídeos.	27
2.7. Genes de resposta a estresses.....	28
2.8. Genes de desenvolvimento em drosofilídeos.....	31
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
IV. ARTIGO.....	45
RESUMO.....	48
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	51
Resultados.....	53
Discussão.....	61
Referências Bibliográficas.....	68
V. CONCLUSÕES	73
VI. ABSTRACT	76
VII. ANEXO.....	78

LISTA DE FIGURAS

II. Revisão da Literatura

Figura 1	19
Fêmea de <i>Zaprionus indianus</i> : vista lateral (A) e dorsal (B) com destaque para as faixas branco-prateadas limitadas por faixas escuras mais estreitas. Detalhe do fêmur anterior (C) e (D) com espinhos complexos característicos.	
Figura 2	21
Aspectos da infestação de frutos de figo por <i>Zaprionus indianus</i> : polpa do fruto sadio (A); ovo (B); larvas no ostíolo do fruto (C, D); polpa danificada pelas larvas da mosca-do-figo (E, F); Fonte: STEIN e cols (1999).	
Figura 3	26
Filogenia da família Drosophilidae proposta por (A) Throckmorton (1975), (B) Grimaldi (1990) e (C) Kwiatowski e Ayala (1999). Notar a posição do gênero <i>Zaprionus</i> em cada árvore.	

IV. Artigo

Figura 1	55
Fotomapa dos cromossomos politênicos de <i>Zaprionus indianus</i> , baseado na subdivisão de seções de Gupta e Kumar (1987). Os centrômeros são mostrados à direita.	
Figura 2	57
Hibridização (seta) da sonda do gene <i>Hsr-ω</i> na seção 32C do cromossomo V de <i>Zaprionus indianus</i> .	
Figura 3	58
Hibridizações (setas) da sonda do gene <i>Ubi</i> nos cromossomos politênicos de <i>Zaprionus indianus</i> : (A) na seção 10C do cromossomo II e (B) na seção 17A do cromossomo III.	
Figura 4	59
Hibridização (seta) da sonda do gene <i>Br-C</i> na seção 1D do cromossomo X de <i>Zaprionus indianus</i> .	
Figura 5	60
Hibridizações (setas) da sonda do gene <i>Dpp</i> nos cromossomos politênicos de <i>Zaprionus indianus</i> : em (A) podem ser observadas hibridizações na seção 32A (seta 1) do cromossomo V, e na região 2BC (seta 2) do cromossomo X; (B) hibridização na mesma seção 2BC do cromossomo X em outro núcleo; também foram observadas marcas no cromossomo III, nas seções 16D (C) e 17B (D).	

LISTA DE TABELAS

Tabela I	56
Frequência de localização dos genes <i>Br-C</i> , <i>Dpp</i> , <i>Hsr-ω</i> e <i>Ubi</i> nos cromossomos politênicos de <i>Zaprionus indianus</i> . N = total de núcleos politênicos com marcação identificada	
Tabela II	66
Correspondência entre os elementos politênicos de várias espécies de drosofilídeos, baseada nos dados de localização de genes por hibridização <i>in situ</i> . São indicados o braço ou cromossomo e, entre parênteses, a seção mapeada.	
Tabela III	67
Correspondência entre os elementos de Muller (1940) com os cromossomos politênicos de várias espécies de drosofilídeos	

**Homologia entre os cromossomos politênicos dos gêneros *Drosophila* e *Zaprionus*:
fotomapa e mapeamento gênico por hibridização *in situ* em *Z. indianus***

Sérgio Roberto de Souza Leão da Costa Campos

RESUMO

O drosofilídeo *Zaprionus indianus* invadiu recentemente o Brasil e seu comportamento de praga aumentou o interesse pela sua caracterização genética. A descrição do cariótipo mitótico e um mapa desenhado em câmara clara do complemento politênico foram publicados, porém não foi determinada homologia entre os cromossomos dos gêneros *Zaprionus* e *Drosophila*. Neste trabalho foi construído um fotomapa dos cromossomos politênicos com boa resolução, permitindo o mapeamento de genes por hibridização *in situ*. A marcação do gene *Hsr- ω* ocorreu na subseção 32C do cromossomo **V**, apontando correlação com o elemento **E** de Muller e com o braço **3R** de *D. melanogaster*, sugerido anteriormente pela localização do gene *Hsp70*. O gene *Ubi* marcou consistentemente nas subseções 17A do cromossomo **III** e 10C do cromossomo **II**. Provavelmente a marca em 17A representa a localização do gene da poliubiquitina, apoiando a homologia do cromossomo **III** com o elemento **D**, correspondente ao braço **3L** de *D. melanogaster*, anteriormente sugerida pela localização do gene *Hsp83*. O gene *Br-C* foi localizado na subseção 1D, próxima ao telômero do cromossomo **X**, indicando sua homologia com o elemento **A**. A sonda do gene *Dpp* marcou com maior frequência na subseção 32A do cromossomo **V** e com menor frequência em outras seções, mas em nenhum caso correspondendo ao elemento **B** esperado. Este resultado permite sugerir a ocorrência de um rearranjo complexo envolvendo o gene *Dpp* em *Zaprionus*, e as marcações secundárias apontariam outros genes relacionados da família TGF- β .

I. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No final da década de 90, espécimes da mosca africana *Zaprionus indianus* foram encontradas pela primeira vez na América, manifestando um comportamento incomum entre os demais drosofilídeos, ao atacar frutos ainda em estado de maturação, tornando-os impróprios para o consumo. Esta atividade de praga estimulou os estudos para sua caracterização genética, visando entender seu comportamento e determinar suas relações evolutivas com outros drosofilídeos. Nos primeiros estudos realizados, o gênero *Zaprionus* foi relacionado com o grupo *immingrans* do gênero *Drosophila*, devido ao compartilhamento de listras branco-prateadas no mesonotum. Contudo, essa proximidade foi contestada devido à grande diferença verificada entre os seus cariótipos. O posicionamento do gênero *Zaprionus* na família Drosophilidae ainda é incerto, pois análises filogenéticas posteriores, baseadas tanto em caracteres morfológicos como moleculares, permanecem contraditórias.

O primeiro estudo citogenético em *Z. indianus* mostrou que o cariótipo mitótico consiste de cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um sexto par pontual, uma característica que parece ser comum a todo o gênero. Também foi confeccionado um mapa em desenho em câmara clara dos cromossomos politênicos, composto por cinco longos cromossomos, correspondentes aos pares acrocêntricos, e por um pequeno cromossomo, correspondente ao par pontual. Existem fotomapas desenvolvidos para duas espécies do gênero, *Z. inermis* Collart e *Z. tuberculatus* Malloch, tendo sido realizado para esta última também o primeiro trabalho de mapeamento de genes do gênero, permitindo inferir a homologia dos seus cromossomos com os elementos de Muller. Até o momento, entretanto, não havia sido apresentada a provável correlação dos cromossomos de *Z. indianus* com os elementos de Muller e com os braços cromossômicos de *D. melanogaster*.

Em nossos trabalhos iniciais, foram localizados por hibridização *in situ* os primeiros genes em cromossomos politênicos de *Z. indianus*, permitindo assim estabelecer a comparação com os elementos mullerianos e com os cromossomos de *D. melanogaster*. Com a localização dos locos de dois genes de resposta ao estresse, *Hsp70* e *Hsp83*, foi possível correlacionar os cromossomos **III** e **V** de *Z. indianus* com os braços cromossômicos **3R** e **3L** de *D. melanogaster* e com os elementos mullerianos **E** e **D**, respectivamente. Contudo, para uma maior compreensão da evolução do cariótipo de *Z. indianus* e da homologia com os demais elementos mullerianos, é necessário o

mapeamento *in situ* de mais genes conservados entre os drosofilídeos nos cromossomos politênicos de *Z. indianus*. Esta abordagem permitirá inferir a existência de sintenia entre os elementos e indicar os rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução da espécie.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consistiu na caracterização citogenética do drosofilídeo invasor *Zaprionus indianus*, visando estender a comparação de seu cariótipo com o de *Drosophila melanogaster*. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- 1 – A construção de um fotomapa de melhor resolução que permita identificar a localização de genes hibridizados *in situ*
- 2 – Mapeamento dos genes de resposta ao estresse *Hsr-ômega* e poliubiquitina (*Ubi*) e dos genes de desenvolvimento *Broad Complex (Br-C)* e *decapentaplegic (Dpp)*.
- 3 – Determinação dos elementos mullerianos em *Z. indianus* através das localizações dos genes mapeados, possibilitando assim uma abordagem evolutiva ao compará-los com gênero *Drosophila*.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ordem Diptera

Dentro da classe Insecta, a ordem Diptera é uma das mais estudadas, tanto por constituir um dos maiores e mais especializados grupos, como também pela intensa relação com o homem. Esta ordem compreende 130 famílias e aproximadamente 125.000 espécies taxonomicamente descritas e encontradas na maior parte do planeta. Como característica determinante possui um único par de asas membranosas funcionais, sendo o segundo par modificado em órgãos de equilíbrio, chamados halteres ou balancins. Raras espécies desta ordem são ápteras, reconhecidas como dípteros através dos caracteres das peças bucais e do tórax. Geralmente o aparelho bucal é sugador, em forma de uma probóscide, que pode ser modificada para perfuração. Possuem o protórax e o metatórax pequenos, que se fusionam ao mesotórax. O tarso comumente é composto de cinco segmentos e o sistema traqueal é variável, sendo frequentemente anfipnêustico. São insetos de metamorfose completa, sendo a maioria das larvas ápodas e vermiformes, com cabeça reduzida e retrátil, e as pupas comumente imóveis (Richards e Davies, 1977; Buzzi, 2002).

Os dípteros adultos geralmente vivem isolados, sendo a maioria das espécies diurnas, possuindo variada dieta alimentar, que se estende de néctar a fungos (Buzzi, 2002). Um número considerável de dípteros são predadores ou hematófagos, sendo vetores da maioria das doenças virulentas. Muitas dessas espécies ganharam importância médica como transmissores dos agentes patogênicos da malária, febre amarela, filariose, doença do sono e leishmaniose (Service, 1996; Marcondes, 2001). Os dípteros também estão entre os insetos que mais causam prejuízos à agricultura mundial, tornando-se pragas conhecidas, como as moscas-das-frutas pertencentes ao gênero *Anastrepha*, a mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata*, a mosca-da-carambola *Batrocera carambolae*, a mosca-do-sorgo *Stenodiplosis sorghicolae* e a mosca-do-botão-floral *Silba pendula* (Gallo et al., 1988; Malavasi e Zucchi, 2000; Vilela et al., 2001).

Em suas primeiras classificações, a ordem Diptera foi subdividida em apenas duas subordens, Nematocera e Brachycera, diferenciadas basicamente pelo número de segmentos das antenas. Mais tarde, uma outra classificação colocou os dípteros em três

subordens: na subordem Nematocera, composta na sua maioria por espécies da família Culicidae, encontram-se os dípteros mais ancestrais, que exibem caracteres morfológicos excepcionais, como antena muito segmentada e larvas com cabeça bem diferenciada do corpo; a subordem Brachycera é composta de dípteros evolutivamente intermediários, com antenas muito variadas e larvas com cabeça pouco desenvolvida, usualmente retrátil; as espécies da subordem Cyclorrhapha, mais recentes, têm antena geralmente com três segmentos, com arista normalmente em posição dorsal e larvas com cabeça não diferenciada do resto do corpo, incluindo as principais famílias de moscas, Muscidae, Scaptophagidae e Drosophilidae (Richards e Davies, 1977; Buzzi, 2002). Nos últimos anos, estudos filogenéticos que combinaram dados fósseis com marcadores moleculares levaram à proposição de retorno à divisão tradicional dos dípteros em duas subordens, colocando Brachycera como uma subordem monofilética, dentro da qual se encontra Cyclorrhapha, numa posição muito mais derivada (Wiegmann et al., 2003).

2.2. Família Drosophilidae

A família Drosophilidae está entre as mais largamente estudadas da ordem Diptera e de maior interesse nas áreas de genética, desenvolvimento e evolução (Reis e Ebert, 1996; Fortini e Bonini, 2000). Comumente chamadas de moscas-das-frutas, elas são espécies de pequeno porte, medindo cerca de 2,5-3,0 mm de comprimento, geralmente com olhos vermelhos brilhantes e asas pequenas hialinas, sendo poucas as espécies com manchas ou veias enfumaçadas (Wheeler, 1981). Seu corpo pode variar possuindo de cores claras a escuras, ou até mesmo apresentando ornamentações como as espécies do gênero *Zaprionus* e os drosofilídeos havaianos. Algumas espécies possuem dimorfismo sexual claro, com variações de tamanho, presença de pentes sexuais e distinta coloração do corpo (Grimaldi, 1990).

A maioria dos drosofilídeos alimentam-se de leveduras e, portanto, são comumente encontrados sobrevoando frutos caídos, seiva corrente ou mesmo barris de sidra ou vinho, atraídos por produtos em estado de fermentação. Poucas espécies possuem hábitos alimentares diferentes, como as do gênero *Scaptomyza* que se alimentam de folhas e as do gênero *Acletoxenus*, cujas larvas são carnívoras (Richards e Davies, 1977).

A família Drosophilidae possui uma ampla distribuição tanto em regiões temperadas como tropicais, conquistando os mais diversos ecossistemas, sendo algumas espécies consideradas endêmicas, enquanto outras são cosmopolitas, quase sempre acompanhando a dispersão do homem (Shorrocks, 1972; Vilela e Pereira, 1992; Martins, 1995). Foram catalogadas aproximadamente 2.800 espécies de drosofilídeos, sendo que cerca de 1.700 destas pertencem ao principal gênero, *Drosophila* Fallen (Wheeler, 1986).

Mais de 20 gêneros de drosofilídeos estão presentes na América, mostrando uma fauna complexa, provavelmente associada às mudanças de clima e vegetação que promoveram a especiação (Sene et al., 1980; Val et al., 1981). Na região Neotropical, o gênero *Drosophila* engloba mais de 275 espécies, das quais destacam-se os grupos *willistoni* e *saltans*, que sofreram grande irradiação. Além das espécies locais, foram registradas cerca de 14 espécies invasoras nos trópicos, incluindo *Scaptomyza pallida*, *Dettopsomyia formosa* e onze espécies do gênero *Drosophila*, incluindo *D. melanogaster* e *D. simulans* (Val et al., 1981), já consideradas cosmopolitas, e *D. malerkotliana* e *Zaprionus indianus* (Santos et al., 2003).

2.3. Gênero *Zaprionus*

Comumente encontrado na região Afrotropical, o gênero *Zaprionus* é subdividido em dois sub-gêneros, *Anaprionus* e *Zaprionus sensu stricto*, e contém 56 espécies (Tsacas e Chassagnard, 1990). É caracterizado por ter as cerdas do mesonotum arranjadas em arcos distintos e faixas longitudinais branco-prateadas na região dorsal da cabeça e tórax (Coquillett, 1901). A espécie *Zaprionus indianus* descrita por Gupta (1970) é a mosca mais comum dentro de seu gênero, sendo facilmente identificada pelas suas quatro faixas brancas estreitas e demarcadas por linhas negras paralelas que se estendem da cabeça até o final do escutelo e mesonotum (Figura 1). São moscas de abdômen claro, com fêmures das patas anteriores possuindo espinhos complexos longos com uma segunda ponta pequena acoplada à base e, numa análise mais minuciosa, observa-se que a borda da genitália masculina tem a extremidade não denteada e acoplada ao corpo do distifalus (Tsacas e Chassagnard, 1990; Chassagnard e Tsacas, 1993). Eventualmente, esta espécie é encontrada na literatura incorretamente identificada como *Z. inermis* Séguy ou *Z. paravittiger* Godbole e Vaidya ou como sinonímia de *Z. collarti* Tsacas (Tsacas, 1985).

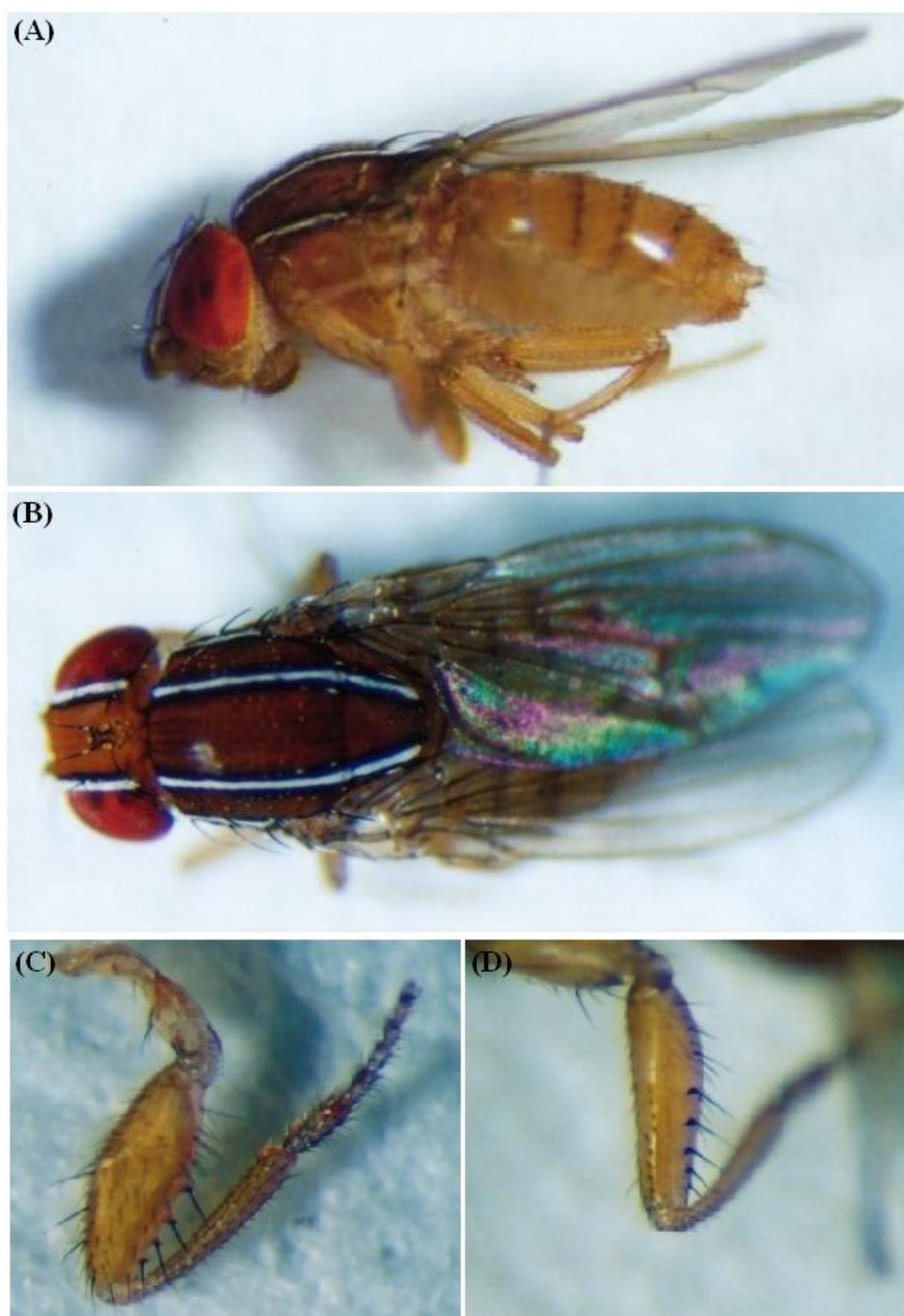


Figura 1. Fêmea de *Zaprionus indianus*: vista lateral (A) e dorsal (B) com destaque para as faixas branco-prateadas limitadas por faixas escuras mais estreitas. Detalhe do fêmur anterior (C) e (D) com espinhos complexos característicos (Fotos do autor).

A espécie *Z.indianus* parece ter sido a única de seu gênero a escapar da sua região de origem. Atualmente, ela está se espalhando rapidamente por áreas tropicais, sendo encontrada na Índia, Arábia Saudita e em ilhas dos oceanos Índico e Atlântico, e recentemente invadiu a região Paleártica e o Brasil (Chassagnard e Kraaijeveld, 1991; Vilela, 1999; Tídon et al., 2003; Santos et al., 2003; Silva et al., 2005). Trata-se de uma espécie polífaga, com capacidade de se desenvolver em diversos frutos de diferentes origens geográficas, facilitando assim sua expansão. Além disto, o ciclo reprodutivo relativamente rápido em ambientes de temperatura elevada e o aumento do comércio internacional de frutas são apontados como os prováveis fatores para o sucesso da invasão e dispersão da espécie pelo mundo (Vilela et al., 2001).

Em sua invasão no Brasil, foi observada uma grande quantidade de *Z. indianus* alimentando-se e fazendo posturas nos ostíolos de frutos em início do estado de maturação, assumindo um comportamento de praga incomum entre drosofilídeos (Figura 2). Além da pequena massa de ovos colocados no ostíolo, os adultos depositam bactérias e leveduras que propiciam a fonte de alimento para as larvas e desencadeiam o início do processo de decomposição prematuro que se propaga para o interior dos frutos, tornando-os impróprios para o consumo (Stein et al., 1999; Vilela et al., 2001). Esse processo fermentativo associado com a infecção de frutos por estas moscas foi atribuído à ação de uma única levedura em particular, *Candida tropicalis*, indicando uma relação muito estreita com a espécie introduzida *Z. indianus* (Gomes et al., 2003). Aparentemente, a colonização parecia depender principalmente de frutos cultivados, mas Santos et al. (2003) demonstraram que *Z. indianus* também utiliza recursos naturais, tendo sido encontrada colonizando frutos de espécies nativas como umbu (*Spondias tuberosa*), siriguela (*Spondias purpurea*) e genipapo (*Genipa americana*), que podem servir como reservatórios naturais da espécie, o que provavelmente dificultará o controle de suas populações. Esta possibilidade é potencialmente mais danosa em regiões de fruticultura como o Vale do Rio São Francisco (Estados de Pernambuco e Bahia), onde estão estabelecidos vários agronegócios voltados para a fruticultura de exportação.

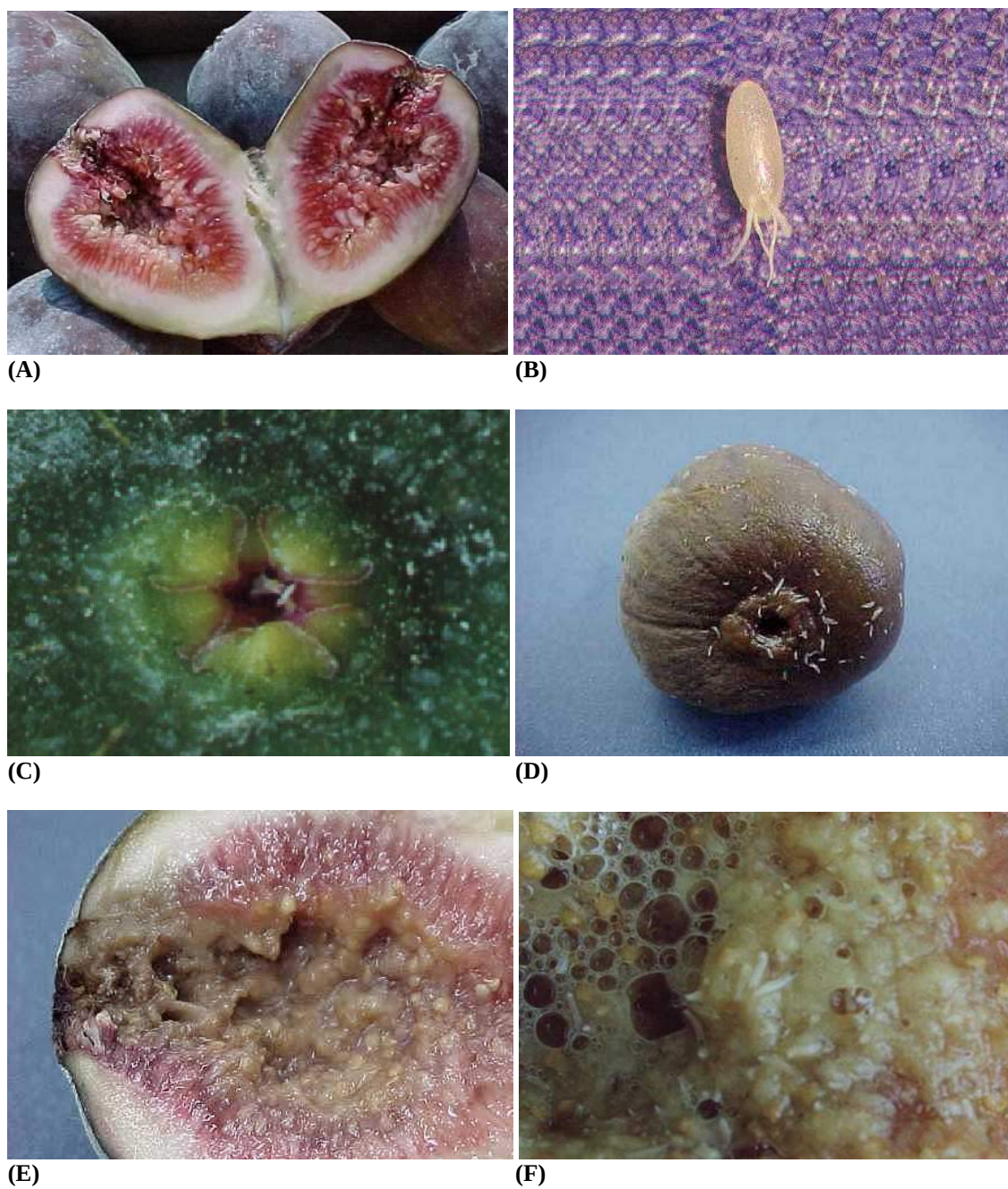


Figura 2. Aspectos da infestação de frutos de figo por *Zaprionus indianus*: polpa do fruto sadio (A); ovo (B); larvas no ostíolo do fruto (C, D); polpa danificada pelas larvas da mosca-do-figo (E, F); Fonte: Stein et al. (1999).

O cariótipo de *Z. indianus* foi caracterizado por Gupta e Kumar (1987) em populações da Índia, sendo definido o número diplóide $2n=12$, consistindo de 5 pares acrocêntricos e 1 par de minicromossomos. Foi verificado que a região proximal do cromossomo **X** (um dos maiores acrocêntricos) e o par de minicromossomos estão envolvidos na organização do nucléolo. Além disso, foi produzido em câmara clara um mapa dos cromossomos politênicos, com baixa resolução, e identificada uma única inversão paracêntrica no cromossomo **II**. Esta reduzida variação genética, no entanto, deve ser apenas aparente, uma vez que a espécie possui variabilidade isoenzimática similar à de outros drosofilídeos (Yadav e Parkash, 1993).

O estudo dos cromossomos politênicos no gênero *Zaprionus* tem sido considerado difícil, devido à alta afinidade do citoplasma pelos corantes, alto estado de enovelamento e baixo grau de politenização cromossômica, além de relativa fragilidade dos braços cromossômicos, que costumam facilmente se fragmentar (Hartmann-Goldstein, 1961; Hatch e Jeffery, 1992). Estudos dos complementos politênicos de outras espécies de *Zaprionus* demonstraram que o padrão de cinco cromossomos acrocêntricos longos e um sexto de pequeno tamanho parece ser uma característica comum ao gênero (Sciandra et al., 1973; Tsacas et al., 1977; Su et al., 1992; Hatch e Jeffery, 1992).

2.4 Cromossomos politênicos

Em células de alguns tecidos de dipteros e de outros organismos são encontrados cromossomos gigantes facilmente vistos em microscopia óptica e formados a partir de vários ciclos endomitóticos durante a intérfase. Esses cromossomos interfásicos, denominados politênicos, são constituídos de várias fitas de cromatina idênticas e alinhadas lado a lado, formando um bandejamento natural, produzido pelo pareamento dos cromômeros paralelos das cromátides em sinapse. Este bandejamento oferece uma série de marcas estruturais relevantes e constantes, que possibilitam o mapeamento cromossômico. O padrão de bandas de coloração mais escura e mais clara está relacionado diretamente com a condensação da cromatina e a espessura do cromossomo refere-se basicamente ao número de endomitoses que o núcleo sofreu. Durante algumas fases de desenvolvimento, a politenização acarreta o aumento do tamanho celular, resultando na expansão de alguns órgãos desses insetos. Cromossomos com alto nível de politenia também foram encontrados em tecidos de quatro ordens distintas de insetos

(Diptera, Collembola, Lepidoptera e Orthoptera), no protozoário *Infusoria* e em certos tecidos de mamíferos e também em células de algumas angiospermas (revisão em Zhimulev, 1996).

O aparecimento de alargamentos, denominados pufes, em certos pontos dos cromossomos politênicos logo foi relacionado com a atividade gênica. Os pufes são o resultado da descondensação das fibrilas da cromatina em sítios específicos, para que ocorra a transcrição do gene ou genes localizados naquele trecho. Esse padrão de pufes difere em tecidos distintos do mesmo indivíduo e em diferentes estágios do desenvolvimento, mas é extremamente constante para um tecido no mesmo estágio de desenvolvimento. Muitos pufes podem ser induzidos experimentalmente por diversos agentes, como o hormônio ecdisona, a exposição a altas temperaturas, etanol e tantos outros (Ashburner, 1989, 1990; Zhimulev, 1996, Rieger, 1999).

Desde sua descoberta por Balbiani em 1881, sempre houve um grande interesse no estudo dos cromossomos politênicos e, a partir de 1930, eles revelaram um grande potencial para o mapeamento gênico, construção de mapas citológicos e comparações evolutivas. Foi através de microdeleções de cromômeros e reconhecendo a perda da função de genes que se obteve os dez primeiros genes mapeados de *Drosophila*. Antes mesmo das modernas técnicas de seqüenciamento genômico, a *D. melanogaster* se destacava como o organismo eucarionte superior com mapa de função gênica mais conhecido (Hartl et al., 1992; Lindsley e Zimm, 1992). Com o advento das novas técnicas e uso de marcadores moleculares, o mapeamento dos cromossomos politênicos oferece uma incomparável resolução, ao permitir combinar aspectos moleculares e cromossômicos na localização de genes. O genoma completo de *D. melanogaster* teve seu seqüenciamento finalizado em 1998 (Adams et al., 2000), o que facilita a comparação e o estabelecimento das relações evolutivas dos elementos cromossômicos (grupos de ligação) entre as diversas espécies de drosofilídeos.

2.5 Evolução de drosofilídeos

Por ser bem conhecida tanto morfológicamente como geneticamente, a família Drosophilidae apresenta-se como o melhor modelo de estudos para aplicar os conceitos de homologia e homoplasia, essenciais para a filogenia, a ferramenta primordial para os estudos evolutivos (DeSalle e Grimaldi, 1991).

A morfologia ainda hoje é um dos principais caracteres fenotípicos usados na construção das árvores filogenéticas, por ser de fácil observação e capaz de fornecer informações explícitas e raramente ambíguas em drosofilídeos. Apesar do estudo de caracteres morfológicos ter-se iniciado há dezenas de anos, novas análises são ainda responsáveis por associar grupos anteriormente separados. Throckmorton (1975) montou um dos primeiros esquemas de relações filogenéticas entre os drosofilídeos, baseado em caracteres morfológicos e distribuição geográfica, mostrando a formação de vários grupos parafiléticos (Figura 3). Entre as conclusões de seu estudo, pode ser destaca a disposição na árvore filogenética, em que o gênero *Zaprionus* seria clado irmão do grupo *immigrans* do subgênero *Drosophila*, mais próximos evolutivamente do que são os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* entre si. Mais tarde, Grimaldi (1990), após extensiva análise de caracteres morfológicos e usando métodos cladísticos, propôs uma nova classificação da família Drosophilidae, divergindo em muitos aspectos da hipótese anterior. Foi proposto que a família Drosophilidae fosse reposicionada na superfamília Ephydroidea, eliminando a superfamília Drosophiloidea, que ainda é aceito atualmente. A nova árvore filogenética foi proposta com base nas relações monofiléticas entre os grupos, onde os gêneros *Zaprionus*, *Scaptomyza* e *Idiomyia* (drosófilas havaianas) teriam divergido antes do surgimento dos subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* (Figura 3). No entanto, estudos posteriores de filogenia molecular (Thomas e Hunt, 1993; Kwiatowski e Ayala, 1999; Tatarenkov et al., 1999) parecem concordar com a hipótese proposta inicialmente por Throckmorton (1975).

Uma das árvores filogenéticas moleculares com maior confiabilidade estatística foi a construída usando seqüências do gene de Álcool desidrogenase (*Adh*), que possui divergência de seqüências apropriadas para o estudo de filogenia em drosofilídeos (Thomas e Hunt, 1993). Neste trabalho, foi evidenciado que o subgênero *Sophophora* foi o primeiro a se diferenciar dentre os drosofilídeos e se dispõe como clado irmão do grupo que origina o gênero *Zaprionus*, ao mesmo tempo que o subgênero *Drosophila* está como grupo irmão das espécies do gênero *Scaptomyza* e *Idiomyia* (espécies havaianas de drosófila). Segundo Thomas e Hunt (1993) e Russo et al. (1995), esta árvore filogenética coloca *Zaprionus* como parte da mesma irradiação “*imigrans-Hirtodrosophila*”, como proposto primeiramente por Throckmorton (1975) e diferente da proposta de Grimaldi (1990). A construção de outras árvores filogenéticas baseadas em seqüências de Dopa descarboxilase (*Ddc*) (Tatarenkov et al., 1999) e de *Adh*, Superóxido dismutase (*Sod*) e Glicerol-3-fosfato-deshidrogenase (*Gpdh*) (Kwiatowski e

Ayala, 1999), fortaleceram a idéia de que o sub-gênero *Sophophora* separou-se prematuramente do gênero *Drosophila*, sendo grupo irmão de *Zaprionus* e de outros considerados como gêneros distintos (Figura 3).

O estudo de cromossomos de drosofilídeos, principalmente dos cromossomos politênicos, também pode servir para estabelecer relações filogenéticas entre os diversos grupos. Um dos métodos mais utilizados é a comparação do padrão de bandas, no qual é possível perceber uma grande homologia do bandejamento entre espécies do mesmo grupo e detectar rearranjos como inversões paracêntricas, enquanto que apenas poucas seções podem ser comparadas entre grupos diferentes (Stalker, 1971). No gênero formado apenas por drosofilídeos havaianos endêmicos das ilhas do Pacífico, as diferenças presentes nos cariótipos metafásicos e nos pontos de inversão dos cromossomos politênicos, permitiram compreender a irradiação destas espécies dentro das ilhas (Yoon e Richardson, 1976). Através de técnicas de hibridização *in situ*, sondas específicas para elementos cromossômicos podem ser usadas para estabelecer homologias entre cromossomos de diferentes espécies, além de identificar rearranjos que podem ter acontecido entre as espécies (Steinemann et al, 1984, Whiting et al., 1989).

O gênero *Zaprionus* em muitos estudos morfológicos anteriores foi considerado intimamente relacionado ao grupo *immigrans* do gênero *Drosophila* (Throckmorton, 1975). Todavia, a configuração de cariótipo mais ancestral comumente encontrada em espécies do gênero *Zaprionus*, com cinco pares de acrocêntricos e um par de cromossomos pontuais, parece se contrapor ao complemento cromossômico das espécies do grupo *immigrans*, composto por um par metacêntrico, um par acrocêntrico e dois pares telocêntricos (Pasteur, 1978).

Mesmo com o advento das técnicas moleculares, a análise citogenética de drosofilídeos ainda pode revelar caracteres cruciais para estabelecer relações filogenéticas. Em um estudo realizado por O'Grady (2001), com quatro diferentes grupos de espécies do gênero *Drosophila*, foram combinados os dados citogenéticos obtidos através do estudo de inversões com os estudos moleculares. Estas análises mostraram grandes similaridades, reafirmando assim a importância de ambos os tipos de estudo para o entendimento da evolução dos drosofilídeos.

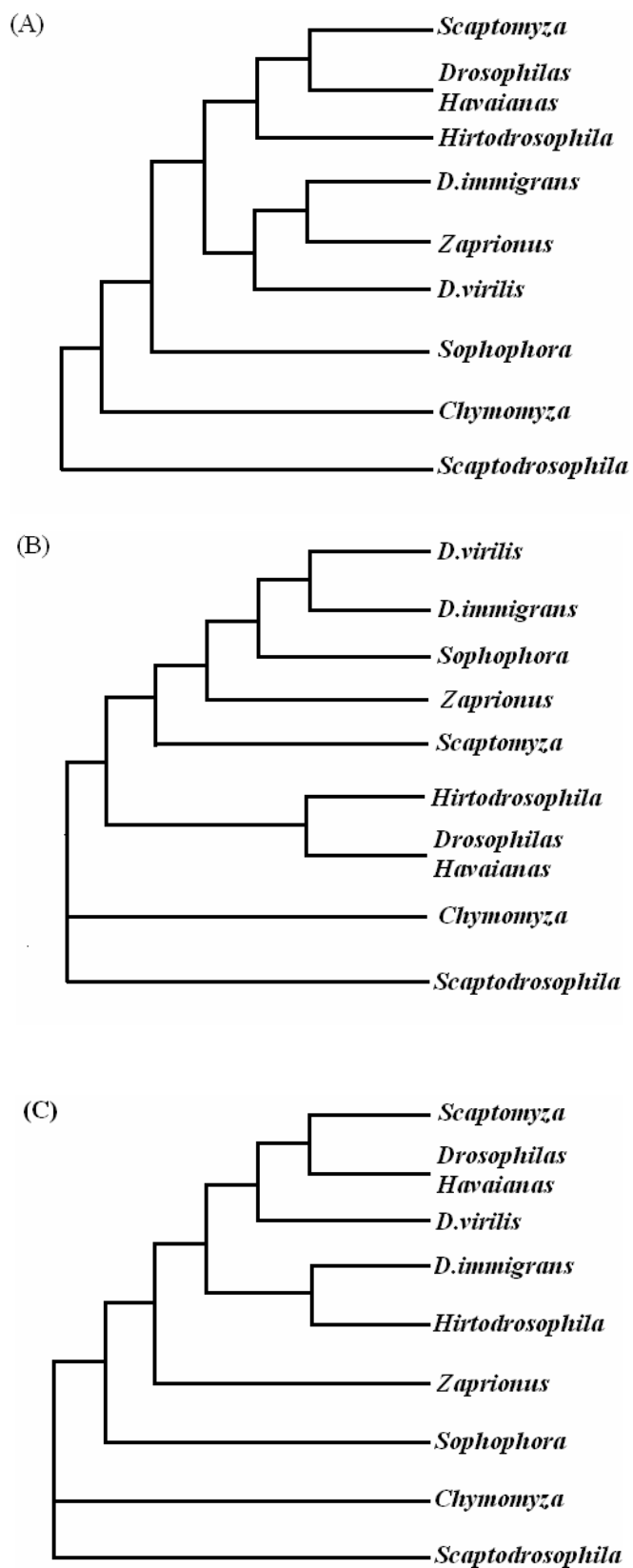


Figura 3. Filogenia da família Drosophilidae proposta por (A) Throckmorton (1975), (B) Grimaldi (1990) e (C) Kwiatowski e Ayala (1999). Notar a posição do gênero *Zaprionus* em cada árvore.

2.6 Hibridização *in situ* em drosofilídeos

A associação da biologia molecular com a citogenética deu origem a uma nova técnica de bandejamento com maior resolução e capaz de detectar segmentos específicos de DNA, através do uso de uma sonda que contenha a mesma sequência complementar de nucleotídeos. Essa sonda, que pode ser de DNA ou RNA, deve necessariamente conter uma molécula de identificação para que, posteriormente, possa ser revelada e mostre um sinal claro para sua detecção (Wilkinson, 1998).

Inicialmente marcadas com isótopos radioativos, as sondas de hibridização tinham a vantagem de serem bastante precisas para a marcação de pontos pequenos, porém a técnica consumia bastante tempo de exposição e revelação, além de representar um risco para a saúde dos pesquisadores. Atualmente, as técnicas de hibridização costumam utilizar uma marcação indireta e não-isotópica, onde geralmente uma molécula é acoplada a um dos quatro nucleotídeos da sonda para posteriormente ser ligada a uma enzima ou a fluorocromos para detecção. Entre as enzimas mais utilizadas nessa técnica estão a fosfatase alcalina e a peroxidase. Os fluorocromos mais utilizados são a rodamina, fluoresceína-isotiocianato e o vermelho-texas (Wilkinson, 1998).

Em cromossomos politênicos, a hibridização *in situ* tem sido utilizada para análise da localização de genes, organização espacial das sequências no núcleo, determinação do número de cópias de sequências específicas e para comparações taxonômicas evolutivas. Para a localização de sequências únicas podem ser utilizadas sequências clonadas de genes conservados de espécies próximas ou podem ser obtidas sondas por transcrição reversa de RNAm, produzindo cDNA, através de amplificação da sequência por PCR, desde que se conheçam as sequências que flanqueiam o DNA alvo (Lara, 2002).

Vários trabalhos com hibridização *in situ* foram realizados na família Drosophilidae, onde sondas das partes mais conservadas de genes de *D. melanogaster* foram utilizadas para sua localização em espécies pertencentes aos grupos *obscura* (Segarra et al., 1995; Segarra et al., 1996), *virilis* (Vieira et al., 1997; Evgen'ev et al., 2004), *repleta* (Ranz et al., 1997; Ruiz et al., 1997), *willistoni* (Bonorino et al., 1993; Rhode et al., 1995; Rieger, 1999) e ao subgrupo *montium* (Drosopoulou, 1996). Em conjunto com a análise do padrão de bandas, a hibridização *in situ* foi fundamental não só para estabelecer homologia entre os complementos politênicos, como também foi capaz de estimar o número de inversões paracêntricas ou mesmo detectar raras

inversões pericêntricas responsáveis pela mudança entre os cariótipos durante a evolução dessas espécies (Segarra e Aguadé, 1992; Ranz et al., 2001; González, et al., 2002)

Ainda na família Drosophilidae, a técnica de hibridização *in situ* foi utilizada para estabelecer a correlação entre cromossomos politênicos de espécies de diferentes gêneros, como *D. melanogaster* e *Zaprionus tuberculatus*, permitindo estabelecer algumas homologias entre seus cromossomos (Su et al., 1992). Anteriormente, foram mapeados os locos de dois genes de resposta ao estresse, *Hsp70* e *Hsp83*, em *Z. indianus* (Campos, 2003). Este mapeamento permitiu correlacionar os cromossomos **III** e **V** desta espécie com os cromossomos **D** e **E**, de *Z. tuberculatus* e com os braços cromossômicos **3L** e **3R** de *D. melanogaster*, respectivamente.

2.7 Genes de resposta a estresses

Inicialmente, as proteínas de respostas ao estresse, chamadas hsp, foram definidas como proteínas induzidas pelo aumento brusco de temperatura, todavia foi comprovado que elas também são induzidas por metais pesados como cobre, cádmio, zinco, selênio e outros agentes como arsênico e etanol, puromicina e reoxigenação após hipoxia (Zhimulev e Grafodtsakaya, 1974; Hightower, 1993; Santos, 1996). Estas respostas fisiológicas a estresses são similares em organismos procariontes e eucariontes, de maneira que as proteínas hsp estão entre as mais conservadas evolutivamente, tanto em estrutura como em função (Lee e Delinger, 1991). As proteínas de resposta ao choque térmico são agrupadas pelo seu peso molecular, sendo assim definidas as famílias HSP90, HSP70, HSP60 e HSP20, conhecida também como sHSP (proteínas de choque térmico de pequeno tamanho), que inclui a ubiquitina (Nover e Scharf, 1991). Dentro destas famílias, existem genes induzidos (*Hsp*) e outros constitutivos (*Hsc*), que são expressos em baixo nível durante diversas fases do desenvolvimento do organismo, funcionando como proteínas reguladoras durante etapas críticas da diferenciação celular e do desenvolvimento (Arrigo e Tanguay, 1991; Rieger, 1999). Muitas destas proteínas têm também função de chaperonas, envolvendo-se no enovelamento de peptídeos e no direcionamento intracelular destas proteínas (Caplan, 1999). São as responsáveis pela termotolerância adquirida em células, como também pela tolerância cruzada a metais pesados e agentes oxidantes (Hightower, 1993; Santos,

1996). A indução de hsp também pode ajudar na prevenção de danos a tecidos, injúrias neuronais, tratamento de tumores e conferem proteção celular aos órgãos destinados ao congelamento (Jindal, 1996; Kiang e Tsokos, 1998; Karunanithi et al, 1999; Santoro, 2000).

A família gênica HSP70 está entre as mais conservadas evolutivamente, havendo uma alta similaridade entre os eucariontes. Mesmo em espécies tão diferentes, genes pertencentes a essa mesma família como *DnaK* de *Escherichia coli* e *Hsp70* de *Drosophila* chegam a possuir cerca de 50% de homologia (Bardwell e Craig, 1984; Kiang e Tsokos, 1998). O gene *Hsp70* possui uma alta conservação na porção N-terminal em todos os eucariontes estudados e uma menor conservação dos 150 resíduos de aminoácidos da porção C-terminal (Nover e Scharf, 1991).

A *hsp70* é a mais abundante entre as proteínas de choque térmico e é apontada como sendo responsável pelo mecanismo de sensibilidade à temperatura, como um termômetro celular, que regula a expressão das demais proteínas de choque térmico (Craig e Gross, 1991). Além das funções de chaperonas e de proteção celular, tem forte interação com os receptores de hormônios esteróides, inativando as proteínas receptoras desses hormônios quando há um aumento de sua concentração nas células (Lockshin e Wadewitz, 1986; Tsai e O'malley, 1991; Welch, 1993). A expressão do gene *Hsp70* também aumenta durante o envelhecimento e em resposta ao estresse oxidativo. Esse aumento determina um efeito benéfico na função celular e na sobrevivência do organismo, prevenindo a agregação de proteínas e facilitando a entrada de proteínas danificadas em vias proteolíticas (Wheeler et al., 1999; Yenari et al., 1999).

Em *D. melanogaster* foram identificadas cinco cópias idênticas dos genes indutíveis *Hsp70* e sete constitutivos *Hsc70*, com graus de homologia para a porção 5' variando de 75% a 100% (Lindquist e Craig, 1988; Pardue et al., 1992). Os cinco genes *Hsp70* estão localizados em duas diferentes seções do braço **3R**, sendo dois locos em 87A7 e três locos em 87C1, sendo que a última possui maior atividade após choque térmico (Livak et al., 1978; Hotchstrasser, 1987). Em *Z. indianus*, o gene *Hsp70* foi localizado na seção 34B do cromossomo **V**, onde também pode estar duplicado (Campos, 2003).

Os membros da família gênica HSP90 têm como principais representantes os locos *Hsp90* de humanos e leveduras, *Hsp80* em plantas, *Hsp83* e *Hsr- ω* em *Drosophila*, possuindo grande importância no complexo de chaperonas, na dissociação dos receptores esteróides e outras funções de proteção e manutenção celular (Pardue et

al., 1990; Csermely et al., 1998). Em *Drosophila*, são os maiores transcritos de choque térmico, sendo expressos constitutivamente. O mRNA de *Hsp83* encontra-se no citoplasma pronto para a tradução após o choque térmico, sendo o gene apenas moderadamente ativado, enquanto o gene *Hsr- ω* tem sua transcrição reduzida após choque térmico (Holmgren et al., 1981; Pauli et al., 1992; Pardue et al., 1992; Vazquez et al., 1993).

Os transcritos de *Hsp83* demonstraram ser induzidos durante o desenvolvimento dos ovários de *Drosophila*, encontrados em grande abundância em células nutridoras, ao contrário do que ocorre em células epiteliais. Têm grande importância na ação da ecdisona durante a embriogênese (Arrigo e Tanguay, 1991) e no tamponamento de variação morfológica críptica (Rutherford e Lindquist, 1998). Em *D. melanogaster*, o gene *Hsp83* encontra-se no braço **3L**, na seção 63B11 (Holmgren et al., 1981), correlacionando-se com o cromossomo **III** de *Z. indianus*, onde duas marcações significativas foram detectadas nas seções 17C e 18B (Campos, 2003).

O gene *Hsr- ω* tem sido encontrado na seção 93D do braço **3R** *D. melanogaster* e possui uma grande importância evolutiva, visto que todas as espécies do gênero estudadas possuem uma cópia deste loco (Lakhotia e Singh, 1982; Pardue et al., 1990). O *Hsr- ω* gera três transcritos distintos, dois localizados no núcleo, chamados de ômega-nuclear e ômega-pré-citoplasmático, e um no citoplasma, denominado de ômega-citoplasmático, que provavelmente atuam na coordenação das atividades nuclear e citoplasmática. A importância destes transcritos para o desenvolvimento da termotolerância foi demonstrada por Pardue et al. (1990) e McKechnie et al. (1998).

A menor família entre as HSPs é a da ubiquitina, uma proteína altamente conservada de apenas 76 resíduos de aminoácidos que por longo tempo não foi identificada por seu pequeno tamanho (Lindquist e Craig, 1988; Nover e Scharf, 1991). Em *D. melanogaster*, esse gene está localizado na seção 63F do braço **3L** e caracteriza-se por não ser diretamente estimulada pelo aumento de temperatura, mas sim pelos pulsos de ecdisona (Izquierdo et al., 1984; Arribas et al., 1986). A ubiquitina atua como marcador das proteínas para a sua posterior degradação e também está envolvida em processos de reparação de danos no DNA e na sinalização para a endocitose (Hershko e Ciechanover, 1992; Craig et al., 1993; Hochstrasser, 1996).

2.8 Genes de desenvolvimento em drosofilídeos

Uma das características essenciais da embriogênese dos organismos é a indução embriogênica, responsável por sinais produzidos por um conjunto de células que acarretam mudanças do padrão de desenvolvimento de outras. Esses eventos indutíveis acontecem várias vezes durante a formação do embrião e envolvem diferentes níveis de complexidade. Durante a evolução, esses sistemas de comunicação intracelular foram conservados e essas moléculas sinalizadoras fazem parte de famílias extensas e altamente conservadas de proteínas relacionadas aos fatores de crescimento como FGF e EGF, produtos do gene *Wnt* e TGF- β (Hogan et al., 1994).

Uma das primeiras famílias de fatores de sinalização que se mostrou conservada tanto em estrutura como no processo de regulação, análogo em diferentes filos, foi *hedgehog*. O gene *hedgehog* (*hh*) age como um sinal localizado que organiza o padrão de cada segmento, regulando em parte a expressão de um outro gene sinalizador, *wingless* (*wg*). Um outro gene desta família, *sonic hedgehog* (*shh*) é expresso no desenvolvimento da notocorda, sendo o provável responsável pela indução neste tecido. Esses dois genes, *hh* e *shh*, têm atividade intimamente relacionada com a expressão de membros da família TGF- β , os genes *decapentaplegic* (*dpp*) e *BMP-4* (Fietz et al., 1994).

Os 40 membros da família TGF- β dirigem quase todos os aspectos dos processos celulares, incluindo o desenvolvimento embrionário inicial, crescimento, diferenciação, motilidade e apoptose celular em *Drosophila* (Yue e Mulder, 2001). Um dos genes mais estudados da família TGF- β é o *decapentaplegic* (*dpp*). Ele é requerido para interações célula a célula durante muitos processos morfogênicos diferentes, destacando-se o padrão dorso-ventral do blastoderma do embrião, o padrão proximal-distal dos discos imaginais e a morfogênese do intestino (Hogan et al., 1994).

Na morfogênese do intestino do embrião da *Drosophila*, a proteína *dpp* é sintetizada pelas células do mesoderma visceral e interage localmente com células epiteliais adjacentes do intestino embrionário para influenciar a sua diferenciação. No mesoderma, o gene *dpp* é ativado diretamente pelo produto do gene *Ultrabithorax* (*Ubx*) e, de modo inverso, o gene *abdominal-A* (*abd-A*) inibe a expressão de *dpp*, interferindo em sua ligação com o *Ubx*. No endoderma, o *dpp* leva à ativação do gene *labial* (Masucci e Hoffmann, 1993; Staehling-Hampton e Hoffmann, 1994).

Em mamíferos e *Xenopus*, encontram-se outros membros da família TGF- β , chamadas de proteínas morfogenéticas ósseas (*Bmp-4*, *Bone morphogenetic protein*), que inicialmente foram identificadas como indutoras da formação de ossos e cartilagens. As *Bmp-4* são análogas às proteínas codificadas pelo gene *dpp* de *Drosophila* e conservam características estruturais e as mesmas funções na regulação do crescimento, diferenciação e apoptose das células de vários tecidos e órgãos, principalmente no mesoderma posteroventral durante a gastrulação (Kawabata et al., 1998).

Os primeiros estudos sobre a ação de hormônios agindo diretamente no núcleo foram realizados em cromossomos politênicos de *Chironomus tentans*, que sob ação de ecdisteróides iniciam uma cascata de ativação gênica e o aparecimento de um padrão de pufes característicos (Thummel, 2002). Entre os hormônios esteróides envolvidos na metamorfose de insetos, a 20-hidroxiecdisona, referida geralmente como ecdisona, é a única entre as diversas isoformas existentes que parece fisiologicamente ativa (Talbot et al., 1993).

Assim como os demais hormônios esteróides, a ecdisona penetra em suas células-alvo e liga-se com alta afinidade às proteínas receptoras, que por sua vez são fatores de transcrição. Esses receptores ligam-se aos elementos de resposta aos esteróides (SREs) localizados em *cis* e estimulam a atividade dos genes específicos (Tsai e O'Malley, 1991; Talbot et al., 1993; Hall, 1999). Esses receptores nucleares possuem uma sequência de 66 a 68 aminoácidos definidos como o domínio DNA-ligante, que incluem duas regiões de “dedos de zinco” responsáveis pelo reconhecimento e ligação do receptor a um SRE e outras regiões como a “P-Box” e “D-Box”, que conferem especificidade do receptor a um SRE particular. A regulação das respostas à ecdisona é bastante conservada entre os insetos, sendo identificados homólogos de receptores de ecdisona em várias espécies. Estruturalmente, esses homólogos são virtualmente idênticos aos receptores de ecdisona de *Drosophila* em seu domínio DNA-ligante. Um homólogo de um receptor de esteróide comum em insetos também foi encontrado em mamíferos, mas não era ativado por ecdisteróides (Henrich e Brown, 1995).

Um modelo para a regulação da expressão gênica pela 20-hidroxiecdisona foi proposto por Ashburner et al. (1974). Neste modelo, a ecdisona se liga ao seu receptor específico, induzindo diretamente a expressão de uma pequena porção de genes regulatórios precoces. As proteínas produzidas por esses genes reprimem sua própria expressão ao mesmo tempo que induzem uma porção maior de genes alvos tardios. Foi

idealizado que esses genes tardios funcionariam como efetores que direta ou indiretamente controlam as respostas biológicas adequadas aos pulsos de ecdisona. Esses genes de pufes tardios podem ainda ser subdivididos em precoces-tardios, que são rapidamente induzidos e requerem contínua presença de ecdisona para sua atividade, e em tardios-tardios, que são induzidos tempos depois com a abstinência de ecdisona (Thummel, 2002).

O gene *Broad Complex (Br-C)* possui uma importante função no controle da cascata transcricional que origina os pufes precoces e tardios e na progressão da metamorfose. O gene *Br-C* localiza-se no limiar do pufe precoce 2B3-5 do cromossomo X de *D. melanogaster* (Belyaeva et al., 1980; Bayer et al., 1996). Esse gene mede mais de 80kb e codifica uma família de quatro classes de isoformas protéicas, definidas como Z1, Z2, Z3 e Z4, que compartilham um domínio comum amino-terminal bastante conservado, não só em dípteros, mas também em outros holometábolos, como lepidópteros (Di Bello et al. 1991; Zhou et al., 1998). Essas proteínas exercem o controle da regulação transcricional de outros genes de intermuda e de pufes tardios e ligam-se diretamente a mais de 300 sítios de ligação relacionados à resposta à ecdisona em cromossomos politênicos de *D. melanogaster* (Gonzy et al., 2002).

As funções do *Br-C* são definidas por mutações que compreendem três grupos de alelos: *br* (*broad*), *rbp* (*reduced bristle on palpus*) e *2Bc*, que correspondem respectivamente à perda das isoformas Z1, Z2 e Z3 (Belyaeva et al., 1980; Kiss et al., 1988; Gonzy et al., 2002). Cada um dos três grupos é necessário para a progressão normal da metamorfose e são os indutores de alguns dos genes precoces e tardios (Guay e Guild, 1991). O *rbp* é essencial para a transcrição de quatro genes de intermuda, *Sgs-3*, *Sgs-4*, *Sgs-5* e do gene *VII* na região 71E e também é responsável pela transcrição de seis outros genes da região 71E de pufe tardio (Guay e Guild, 1991; Di Bello et al., 1991).

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers Y-HC, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Miklos GLG, Abril JF, Agbayani A, Na H-J, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, De Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei M-H, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshre A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacle JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RDC, Scheeler F, Shen H, Shue BC, N-Kiamos IS, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirska R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang Z-Y, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh R-F, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM and Venter JC. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287:2185-2195.
- Arribas C, Sampedro J and Izquierdo M (1986) The ubiquitin genes in *Drosophila melanogaster*: transcription and polymorphism. Biochem Biophys Acta 868:119-127.

- Arrigo AP and Tanguay RM (1991) Expression of heat shock proteins during development in *Drosophila*. In: HIGHTOWER L and NOVER L (eds) Heat shock and development. Springer-Verlag, Berlin. pp 106–119.
- Ashburner M (1989) The *melanogaster* species group. In: Ashburner M (ed) *Drosophila*: a laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: pp 1161-1166.
- Ashburner M (1990) Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell*, 61:1–3.
- Ashburner M, Chihara C, Meltzer P and Richards G (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Quant Biol* 38:665–662.
- Bardwell JC and Craig EA (1984) Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:848–852.
- Bayer CA, Holley B and Fristrom JM (1996) A switch in *Broad-Complex* zinc-finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev Biol* 177:1-14.
- Belyaeva ES, Aizenzon MG, Semeshin VF, Kiss II, Koczka K, Baritcheva EM, Gorelova TV and Zhimulev IF (1980) Cytogenetic analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 81:281–306.
- Bonorino CB, Pereira M, Alonso CEV, Valente VLS and Abdllhay E (1993) *In situ* mapping of the *Hsp70* locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Rev Brasil Genet* 16:561–571.
- Buzzi ZJ (2002) Entomologia Didática. 4ª ed. Editora UFPR, Curitiba, 347 pp.
- Campos SRC (2003) Fotomapa dos cromossomos politênicos e localização dos genes *Hsp70* e *Hsp83* de *Zaprionus indianus*. Monografia de Bacharelado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Caplan AJ (1999) *Hsp90*'s secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol* 9:262-268.
- Chassagnard MT and Kraaijeveld AR (1991) The occurrence of *Zaprionus sensu stricto* in the Palearctic region (Diptera: Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr (N.S.)* 27:495–496.
- Chassagnard MT and Tsacas L (1993) Le sous-genre *Zaprionus* S. Str. Definition de groupes d'espèces et revision du sous-groupe vittiger (Diptera: Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr (N.S.)* 29:173–194.
- Coquillett DW (1901) New Diptera from Southern Africa. *Proc US National Museum* 24:27-32.

- Craig EA and Gross CA (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem 16:135–139.
- Craig EA, Gambil BD and Nelson RJ (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol Rev 57:402–414.
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z and Nardai, G (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. Pharmacol Ther 79:129–168.
- DeSalle R and Grimaldi DA (1991) Morphological and molecular systematics of the Drosophilidae. Annu Rev Ecol Syst 22:447–475.
- Di Bello PR, Withers DA, Bayer CA, Friston JW and Guild GM (1991) The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics 129:385–397.
- Drosopoulou E, Konstantopoulou I and Scouras ZG (1996) The heat shock genes in the *Drosophila montium* subgroup: chromosomal localization and evolutionary implications. Chromosoma 105:104–110.
- Evgen'ev MB, Zatsepina OG, Garbuz D, Lernman DN, Velikodvorskaya V, Zelentsova E and Feder ME (2004) Evolution and arrangement of the *hsp70* gene cluster in two closely related species of *virilis* group of *Drosophila*. Chromosoma 113:223-232.
- Fietz MJ, Concordet J, Barbosa R, Johnson R, Krauss S, McMahon AP, Tabin C and Ingham PW (1994) The *hedgehog* gene family in *Drosophila* and vertebrate development. In: Akam M, Holland P, Ingham P, Wray G. The evolution of developmental mechanisms. The Company of Biologists Limited, Cambridge, pp 43-51.
- Fortini ME and Bonini NM (2000) Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*. Trends Genet 16:161–167.
- Gallo D, Nakano O, Neto SS, Carvalho RPL, Batista GC, Filho EB, Parra JRP, Zuchi RA, Alves SB and Vendramin JD (1988) Manual de entomologia agrícola. 2^a. ed. Editora Agronômica “Ceres” Ltda, São Paulo. 649 pp.
- Gomes LH, Echeverrigaray S, Conti JH, Lourenço MVM and DUARTE KMR (2003) Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Dip.: Drosophilidae). Braz J Microbiol 34:5-7.
- Gonzales J, Ranz JM and Ruiz A (2002) Chromosomal elements evolve at different rates in the *Drosophila* genome. Genetics 161:1137-1154.
- Gonzy G, Pokholkova GV, Peronnet F, Mugat B, Demakova OV, Kotlikova IV, Lepesant JA and Zhimulev IF (2002) Isolation and characterization of novel mutations of the

- broad-complex*, a key regulatory gene of ecdysone induction in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem Mol Biol 32:121–132.
- Grimaldi DA (1990) A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). Bull Am Mus Nat Hist 197:1-139.
- Guay PS and Guild GM (1991) The ecdysone-induced puffing cascade in *Drosophila* salivary glands: a *broad-complex* early genes regulates intermolt and late gene transcription. Genetics 129:169–175.
- Gupta JP (1970) Description of a new species of *Phorticella zaprionus* (Drosophilidae) from India. Proc Indian Nat Science Acad 36:62–70.
- Gupta JP and Kumar A (1987) Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae): Nuclear organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. Genetica 74:19–25.
- Hall BL (1999) Nuclear receptors and the hormonal regulation of *Drosophila* metamorphosis. Am Zool 39:714-721.
- Hartl DL, Ajioka JW, Cai H, Lohe AR, Lozovskaya ER, Smoller DA and Duncan IW (1992) Towards a *Drosophila* genome map. Trends Genet 8:70-75.
- Hartmann-Goldstein IJ (1961) Enhanced differentiation of *Zaprionus* chromosomes by prestaining acid hydrolysis. Stain Technology 36:309-312.
- Hatch K and Jeffery DE (1992) Salivary gland chromosome map of *Zaprionus inermis*. J Hered 83:311-315.
- Henrich VC and Brown NE (1995). Insect nuclear receptors: a developmental and comparative perspective. Insect Biochem Mol Biol 25:881-889.
- Hershko A and Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. Annu Rev Biochem 62:349-384.
- Hightower LE (1993) A brief perspective on heat-shock response and stress proteins. Marine Environ Res 35:79-83.
- Hochstrasser M (1987) Chromosome structure in four wild-type polytene tissues of *Drosophila melanogaster*. The 87A and 87C heat shock loci are induced unequally in the midgut in a manner dependent on growth temperature. Chromosoma 95:197–208.
- Hochstrasser M (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. Annu Rev Genet 30:405–439.
- Hogan BLM, Blessing M, Winnier GE, Suzuki N and Jones M (1994) Growth factors in development: the role of TGF- β related polypeptide signaling molecules in

- embryogenesis. In: Akam M, Holland P, Ingham P and Wray G (eds) The evolution of developmental mechanisms. The Company of Biologists Limited, Cambridge, pp 53-60.
- Holmgren R, Corces V, Morimoto R, Blackman R and Meselson M (1981) Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3775–3778.
- Izquierdo M, Arribas C, Galcerán J and Cabrera VM (1984) Characterization of a *Drosophila* repeat mapping at the early-ecdysone puff 63F and present in many eucayotic genomes. *Biochem Biophys Acta* 783:114–121.
- Jindal S (1996) Heat shock proteins: applications in health and disease. *Trends Biotech* 14:17–20.
- Karunanithi S, Barclay JW, Robertson RM, Brown IR and Atwood HL (1999) Neuroprotection at *Drosophila* synapses conferred by prior heat shock. *J. Neurosci* 19:4360–4369.
- Kawabata M, Imamura T and Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:49–61.
- Kiang GJ and Tsokos GC (1998) Heat shock protein 70kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183–201.
- Kiss L, Beaton AH, Tardiff J, Fristrom D and Fristrom JW (1988) Interactions and developmental effects of mutations in the *Broad-Complex* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118:247-259.
- Kwiatowski J and Ayala FJ (1999) Phylogeny of *Drosophila* and related Genera: conflict between molecular and anatomical analyses. *Mol Phyl Evol* 13:319–328.
- Lakhotia SC and Singh AK (1982) Conservation of the 93D puff of *Drosophila melanogaster* in different species of *Drosophila*. *Chromosoma* 80:265–278.
- Lara FJS (2002) Hibridação de ácidos nucléicos. Holos Editora, Ribeirão Preto, 142 pp.
- Lee RLJ and Denlinger DL (1991) Insects at low temperature. Chapman and Hall, New York. 513 pp.
- Lindquist S and Craig EA (1988) The heat-shock response. *Annu Rev Genet* 22:631–677.
- Lindsley DL and Zimm GG (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Livak KJ, Freund R, Schweber M, Wensink PC and Meselson M (1978) Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 11:5613–5617.

- Lockshin EA and Wadewitz AG (1986) Programmed cell death and aging. In: Collatz KG and Sohal RS (eds) *Insect Aging*, Springer-Verlag, Berlin. pp 106-116.
- Malavasi A e Zucchi RA (2000) *Moscas-das-frutas de interesse econômico no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado*. Holos Editora Ltda, Ribeirão Preto, 320 pp.
- Marcondes CB (2001) *Entomologia médica e veterinária*. Ed. Atheneu, São Paulo, 432 pp.
- Martins M (1985) Influência da modificação do habitat sobre a diversidade e abundância de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) em uma floresta tropical da Amazônica Central, Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 185 pp.
- Masucci JD and Hoffmann FM (1993) Identification of two tegions from the *Drosophila decapentaplegic* gene required for embryonic midgut development and larval viability. *Develop Biol* 159:276–287.
- McKechnie SW, Halford MM, McColl G and Hoffmann AA (1998) Both allelic variation and expression of nuclear and cytoplasmic transcripts of *Hsr-omega* are closely associated with thermal phenotype in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2423–2428.
- Nover L and Scharf KD (1991) Heat shock proteins. In: Nover L (ed) *Heat shock response*. CRC Press, Boca Raton, pp 5-40.
- O’Grady PM, Baker RH, Durando CM, Etges WJ and DeSalle R (2001) Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. *BMC Evol Biol* 1:1-6.
- Pauli D, Arrigo AP and Tissieres A (1992) Heat shock response in *Drosophila*. *Experientia* 48:623–628.
- Pardue ML, Bendena WG, Fini ME, Garbe JC, Hogan NC and Traverse KL (1990) *Hsr-omega*, a novel gene encoded by *Drosophila* heat shock puff. *Biol Bull* 179:77–86.
- Pardue ML, Ballinger DG and Hogan NC (1992) The heat shock response. Cells coping with transient stress. *Annals New York Acad Sci* 663:125–138.
- Pasteur G (1978) Affinities of *Zaprionus* and cromosomal evolution. *Dros Inf Serv* 53:121.
- Ranz JM, Segarra C and Ruiz A (1997) Chromosomal homology and molecular organization of Muller’s elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. *Genetics* 145:281–295.
- Ranz JM, Casals FC and Ruiz, A (2001) How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. *Genome Research* 11:230–239.

- Reis RJS and Ebert RH (1996) Genetics of aging: current animal models. *Experimental Gerontology* 31:69–81.
- Richards OW and Davies RG (1977) IMMS' General textbook of entomology. 10th Edition. v. II. 418 pp.
- Rieger TT (1999) Mapeamento por hibridação *in situ* e expressão no desenvolvimento de genes de resposta a estresse e ao hormônio ecdisona em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre. 138p.
- Rhode C, Abdelhay E, Pinto Jr H, Schrank A and Valente VLS (1995) Analysis and *in situ* mapping of the *Adh* locus of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Cytobios* 81:37–47.
- Ruiz A, Ranz JM, Cáceres M, Segarra C, Navarro A and Barbadilla A (1997) Chromosomal evolution and comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. *Braz J Genet* 20:553–565.
- Russo CAM, Takezaki N and Nei M (1995) Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol Biol Evol* 12:391–404.
- Rutherford SL and Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396:336–342.
- Santoro MG (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59:55–63.
- Santos JF (1996) Resposta dos mutantes *psa* de *Saccharomyces cerevisiae* à combinação de choque térmico com agentes mutagênicos. Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba, 109 pp.
- Santos JF, Rieger TT, Campos SRC, Silva SVO, Félix PT and Nascimento ACC (2003) Colonization of Northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. *Dros Inf Serv* 86:92–95.
- Sciandra RJ, Abdel-Hameed F and Bennett J (1973) Chromosome complement of *Zaprionus multistriatus*. *J Hered* 64:31–34.
- Segarra C and Aguadé M (1992) Molecular organization of the X chromosome in different species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Genetics* 130:513–521.
- Segarra C, Lozovskaya ER, Ribó G, Aguadé M and Hartl DL (1995) P1 clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Chromosoma* 104:129–136.
- Segarra C, Ribó G and Aguadé M (1996) Differentiation of Muller's chromosomal elements D and E in the *obscura* group of *Drosophila*. *Genetics* 144:139–146.

- Sene FM, Val FC, Vilela CR and Pereira (1980) Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morfoclimatic domains of Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 33:315–326.
- Service MW (1996) Medical entomology for students. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, UK, 267 pp.
- Shorrock B (1972) Invertebrate Types: *Drosophila*. Ginn & Company Limited., London, 144pp.
- Silva NM, Fantinel CC, Valente VLS and Valiati VH (2005) Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, Southern of Brazil. *Neotropical Entomology* 34:363-374.
- Staehling-Hampton K and Hoffmann FM (1994) Ectopic decapentaplegic in the *Drosophila* midgut alters the expression of five homeotic genes, *dpp*, and *wingless*, causing specific morphological defects. *Develop Biol* 164:502-512.
- Stalker HD (1971) Intergroup phylogenies in *Drosophila* as determined by comparisons of salivary banding patterns. *Genetics* 70:457-474.
- Stein CP, Teixeira EP e Novo JPS (1999) Mosca do figo – *Zaprionus indianus*. Disponível em: <<http://www.iac.br/~centif/artigos/zaprionus>>.
- Steinemann M, Pinsker W and Sperlich D (1984) Chromosome homologies within the *Drosophila obscura* group probed by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 91:46-53.
- Su Y, Herrick K, Farmer JL and Jeffery DE (1992) *Zaprionus tuberculatus*: Chromosome map and gene mapping by DNA *in situ* hybridization. *J Hered* 83:229-304.
- Talbot WS, Swyryd EA and Hogness DS (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73:1323–1337.
- Tatarenkov A, Kwiatowski J, Skarecky D, Barrio E and Ayala F. J (1999) On the evolution of *dopa decarboxylase* (*Ddc*) and *Drosophila* systematic. *J Mol Evol* 48:445–462
- Thomas RH and Hunt JA (1993) Phylogenetic relationships in *Drosophila*: a conflict between molecular and morphological data. *Mol Biol Evol* 10:362–374.
- Throckmorton LH (1975) The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: KING RC (ed) *Hand book of Genetics*, Plenum Press, New York, pp 421-469.
- Thummel CS (2002). Ecdysone-regulated puff genes. *Insect Biochem Mol Biol* 32:113-120

- Tidon R, Leite DF, and Leão BFD (2003) Impact of the colonization of *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 2 years after the invasion. *Biological Conservation* 112:299-305.
- Tsacas L (1985) *Zaprionus indianus* Gupta, 1970, Nouveau nom pour le plus commun des *Zaprionus* africains (Diptera, Drosophilidae). *Annls Soc Entomol Fr (N.S)* 21:343-344.
- Tsacas L and Chassagnard MT (1990) Les espèces du genre *Zaprionus* à femurs antérieurs spinuleux (Diptera: Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr (N.S.)* 26:461–487.
- Tsacas L, David J, Allemand R, Pasteur G, Chassagnard MT and Derridj S (1977) Biologie évolutive du genre *Zaprionus* recherches sur le complexe spécifique de *Z. tuberculatus* (Diptera: Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr (N.S.)* 13:391–415.
- Tsai MJ and O'Malley BW (1991) Mechanisms of regulation of gene transcription by steroid receptors. In: Cohen P and Foulkes JG (eds), *The hormonal control regulation of gene transcription*. Elsevier Science Publishers, pp 101-116.
- Val FC, Vilela CR and Marques MD (1981) Drosophilidae of the Neotropical region. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson Jr. JN. (eds), *The genetics and biology of Drosophila*. 3 ed, Academic Press, New York, pp 29-59.
- Vazquez J, Pauli D and Tissières A (1993) Transcriptional regulation in *Drosophila* during heat shock: a nuclear run-on analysis. *Chromosoma* 102:233–248.
- Vieira J, Vieira CP, Hartl DL and Lozovskaya ER (1997) A framework physical map of *Drosophila virilis* based on P1 clones: applications in genome evolution. *Chromosoma* 106:99-107.
- Vilela CR (1999) Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Dros Inf Serv* 82:37-39.
- Vilela CR and Pereira MAQR (1992) Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). *Rev Brasil Entomol* 36:475-482,
- Vilela EF, Zucchi RA e Cantor F (2001) Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil. *Holos Editora Ltda, Ribeirão Preto*, pp. 48-51.
- Welch WJ (1993) How cells respond to stress. *Scientific American* 268:34-41.
- Wheeler MR (1981) The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: ASHBURNER M, Carson HL and Thompson Jr. JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol.3a, Academic Press, New York, pp 1-97.

- Wheeler MR (1986) Additions to the catalogs of world's drosophilidae. In: ASHBURNER M, Carson HL and Thompson Jr. JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol.3c, Academic Press, New York, pp 395-409.
- Wheeler JC, King V and Tower J (1999) Sequence requirements for upregulated expression of *Drosophila Hsp70* transgenes during aging. *Neurobiol Aging* 20:545–553.
- Whiting Jr JH, Pliley MD, Farmer JL and Jeffery DE (1989) *In situ* hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. *Chromosoma* 122:99-109.
- Wiegmann BM, Yeates DK, Thorne JL and Kishino H (2003) Time flies: a new molecular time-scale for fly evolution without a clock. *Systematic Biology* 52:745-756.
- Wilkinson DG (1998) The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG (ed) *In situ* hybridization: a practical approach 2a. ed. Oxford University Press, New York, 1998, pp 1-21.
- Yadav JP and Parkash R (1993) Latitudinal variability in natural populations of *Zaprionus indianus* from India. *Biochemical Genetics* 31:295–306.
- Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM and Steinberg GK (1999) The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molec Med Today* 5:525-531.
- Yoon JS and Richardson RH (1976) Evolution of Hawaiian Drosophilidae. II Patterns and rates of chromosome evolution in a *Antopocerus* phylogeny. *Genetics* 83:827–843.
- Yue J and Mulder KM (2001) Transforming growth factor- β signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Therap* 91:1–34.
- Zhimulev IF and Grafodatskaya VE (1974). A simple method of induction of anaerobiosis puffs in *Drosophila melanogaster*. *Dros Inf Serv* 41:96.
- Zhimulev IF (1996) Morphology and structure of polytene chromosomes. I. General remarks. In: Hall JC, Dunlap JC (eds) *Advances in Genetics*, v 34, Academic Press, San Diego, pp 497.
- Zhou B, Hiruma K, Shinoda T and Riddiford LM (1998) Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of Broad Complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biology* 203:233–244.

IV. ARTIGO

**Homologia entre os elementos cromossômicos dos gêneros
Drosophila e *Zaprionus* inferida por mapeamento gênico
através de hibridização *in situ* em *Z. indianus***

Sérgio Roberto Costa Campos, Tania Tassinari Rieger e José Ferreira dos Santos

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Genetical Research* (ISSN 0016-6723),
publicado pela Cambridge University Press (Cambridge, Inglaterra)

Homologia entre os elementos cromossômicos dos gêneros *Drosophila* e *Zaprionus* inferida por mapeamento gênico através de hibridização *in situ* em *Z. indianus*

Sérgio Roberto Costa Campos, Tania Tassinari Rieger e José Ferreira dos Santos ¹

¹ Laboratório de Genética Animal, Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, 50732-970, Recife (PE), Brasil. Autor para correspondência: TTR, e-mail rieger@ufpe.br.

Título corrido: Mapa politênico e localização gênica em *Zaprionus indianus*

Palavras-chave: Cromossomos politênicos, Mapeamento gênico, Filogenia cromossômica, Drosofilídeos, *Zaprionus indianus*

RESUMO

Os primeiros estudos citogenéticos em *Zaprionus indianus* permitiram a produção de um mapa por desenho em câmara clara de seu complemento politênico, mas até o momento nenhuma homologia de seus cromossomos com os elementos de *Drosophila* foi determinada. Neste trabalho, foi construído um fotomapa dos cromossomos politênicos com resolução suficiente para a determinação de pontos de quebra de inversões e da localização de marcações por hibridização *in situ*. Também foram mapeados os genes *Hsr- ω* , *Ubi*, *Br-C* e *Dpp*. Junto com outros genes anteriormente hibridizados, foi possível inferir as primeiras relações de homologia entre os cromossomos de *Z. indianus* e os braços cromossômicos de *Drosophila melanogaster*. O gene *Hsr- ω* apresentou a marcação mais significativa no cromossomo **V**, onde também está localizado o gene *Hsp70*, correlacionando-o ao elemento **E** de Muller e ao braço **3R** de *Drosophila melanogaster*. O gene *Ubi* apresentou duas marcações consistentes, sendo uma delas no cromossomo **III**, no qual também está localizado o gene *Hsp83*, relacionando-o ao elemento **D** e ao cromossomo **3L** de *D. melanogaster*. A segunda marcação de *Ubi* foi no cromossomo **II** e provavelmente está relacionada a um dos locos de genes de ubiquitina fusionada, presente em outros drosofilídeos. A marca mais significativa do gene *Br-C* foi localizada nas seções próximas ao telômero do cromossomo **X**, relacionando-o ao elemento **A** e ao cromossomo **X** de *D. melanogaster*. O gene *Dpp* apareceu marcado com maior frequência no cromossomo **V** que já havia sido correlacionado ao elemento **E** e, em menor frequência, nos cromossomos **X** (elemento **A**) e **III** (elemento **D**). Nenhum destes sinais de *Dpp* corresponde ao elemento **B** de Muller, como seria esperado no caso de conservação de homologia cromossômica. Estas marcas de *Dpp* apontam para a ocorrência de um rearranjo cromossômico complexo entre *Zaprionus* e as espécies do gênero *Drosophila*, sendo que as marcações secundárias podem indicar a presença de outros genes da família TGF, à qual pertence o gene *Dpp*.

INTRODUÇÃO

A família Drosophilidae está entre uma das mais diversas e mais amplamente distribuídas da ordem Diptera, consistindo de cerca de 2500 espécies que se destacam pelo uso nos estudos de ecologia, genética, desenvolvimento e evolução (Wheller, 1981, 1986). Mesmo sendo amplamente estudados, muitos trabalhos de filogenia e taxonomia de drosofilídeos se mostraram bastante controversos. Árvores filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos e moleculares às vezes são contraditórias e a disposição de grupos fora do gênero *Drosophila* podem se mostrar mais próximos do que alguns subgêneros (Thomas e Hunt, 1993; Kwiatowski e Ayala, 1999).

Dentro da família Drosophilidae, o gênero *Zaprionus* tem recentemente se destacado pela invasão da sua espécie mais comum, *Zaprionus indianus*, que se distribuiu por toda a região Neotropical nos últimos seis anos (Vilela, 1999). Em sua invasão no Brasil, *Z. indianus* assumiu um comportamento nunca antes observado entre drosofilídeos, atacando frutos em início do estado de maturação, tornando-os impróprios para o consumo e causando prejuízos na comercialização de figos e outros frutos cultivados na região Sudeste (Vilela et al, 2001). Ao migrar para a região Nordeste, espécimes de *Z. indianus* foram encontrados colonizando frutos nativos, representando uma ameaça para regiões produtoras de frutos como o Vale do Rio São Francisco (Santos et al, 2003)

O gênero *Zaprionus*, que consiste atualmente de 56 espécies, foi inicialmente relacionado ao grupo *immigrans* do gênero *Drosophila*, por apresentarem faixas branco-prateadas no mesonotum (Throckmorton, 1975). Essa relação foi posteriormente contestada, uma vez que todas as espécies do gênero *Zaprionus* estudadas possuem uma configuração de cariótipo considerada mais ancestral, com cinco pares de acrocêntricos e um par de cromossomos pontuais, em contraposição à composição de um par metacêntrico, um par acrocêntrico e dois pares telocêntricos presentes no grupo *immigrans* (Pasteur, 1978).

Após nova análise de caracteres morfológicos, Grimaldi (1990) propôs uma nova classificação da família Drosophilidae, baseada em relações monofiléticas entre os grupos e colocou o gênero *Zaprionus* divergindo antes do surgimento do gênero *Drosophila*. Contudo, estudos posteriores baseados nas seqüências moleculares dos genes da Dopa decarboxilase (*Ddc*) (Tatarenkov et al, 1999), da Álcool desidrogenase (*Adh*), Superóxido dismutase (*Sod*) e Glicerol-3-fosfato-deshidrogenase (*Gpdh*)

(Kwiatowski & Ayala, 1999), apoiaram a idéia de que o subgênero *Sophophora* separou-se prematuramente da família e apontou o gênero *Zaprionus* como um grupo mais próximo do grupo *immingrans* e outros considerados como gêneros distintos, como proposto por Throckmorton (1975).

Estudos anteriores de cromossomos politênicos em *Zaprionus* mostraram que o padrão de cinco cromossomos longos e um sexto mais curto correlacionados com os cinco pares de acrocêntricos e o par de cromossomo pontual é característica comum a todo o gênero (Sciandra et al, 1973; Tsacas et al, 1977; Su et al, 1992; Hatch e Jeffery, 1992). O primeiro mapa por desenho em câmara clara do complemento politênico de *Z. indianus* foi confeccionado e publicado juntamente com a localização das regiões organizadoras do nucléolo no cromossomo **X** e no par pontual, além da identificação de uma inversão paracêntrica no cromossomo **II** (Gupta e Kumar, 1987). Também existem fotomapas construídos para *Z. inermis* (Hatch e Jeffery, 1992) e para *Z. tuberculatus* (Su et al, 1992). Neste último trabalho, foram mapeados os primeiros genes por hibridização *in situ* no gênero *Zaprionus*, permitindo estabelecer a correlação dos cromossomos politênicos de *Z. tuberculatus* com os de *D. melanogaster*. Em *Z. indianus*, dois genes de resposta ao estresse foram localizados nos cromossomos politênicos, possibilitando pela primeira vez uma comparação entre o complemento dessa espécie com os de outros drosofilídeos (Campos, 2003). A localização do gene *Hsp83* no cromossomo **III** e de *Hsp70* no cromossomo **V** de *Z. indianus* apontou uma possível homologia com os cromossomos **D** e **E** de *Z. tuberculatus* e com os braços cromossômicos **3L** e **3R** de *D. melanogaster*, respectivamente.

Neste trabalho, um fotomapa com boa resolução dos cromossomos politênicos de *Z. indianus* foi confeccionado, para possibilitar a localização de regiões marcadas por hibridização *in situ*, que poderá ser usado também para definir mais precisamente pontos de quebra de inversões. Também foram utilizadas quatro sondas, obtidas a partir do genoma de *D. melanogaster*, para localizar os genes *Hsr- ω* , *Ubiquitina (Ubi)*, *Broad-Complex (Br-C)* e *Decapentaplegic (Dpp)* nos cromossomos politênicos de *Z. indianus*. O mapeamento destes genes tornou possível sugerir a provável homologia cromossômica entre espécies dos gêneros *Zaprionus* e *Drosophila*, visando esclarecer as relações evolutivas entre os drosofilídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação e manutenção dos estoques de moscas

Para este trabalho foi utilizada a linhagem VVI de *Zaprionus indianus* Gupta 1970 de Vila Velha (Itamaracá, PE, 07° 41' 15" S, 34° 48' 45" W), estabelecida desde 2001 no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética da UFPE (Campos, 2003). As espécimes foram capturadas com iscas de banana em vidros cilíndricos com capacidade para 150 ml e pelo recolhimento de frutos em estado de fermentação, com a presença de ovos e larvas de drosofilídeos. O drosofilídeo coletado foi identificado de acordo com as chaves dicotômicas de Tsacas e Chassagnard (1990) e Chassagnard e Tsacas (1993). Os estoques das população coletada são mantidos em tubos de vidro com capacidade para 100ml, contendo meio de cultura estéril, preparado com 100g de farinha de milho, 50g de banana madura, 30g de fermento biológico e 10g de fungicida Nipagin diluído em 10ml de álcool, cozidos em 800 ml de água.

Construção do fotomapa

Para a construção do fotomapa dos cromossomos politênicos de *Z. indianus*, foram confeccionadas lâminas de glândulas salivares de larvas de terceiro estágio. As glândulas salivares foram dissecadas em soro fisiológico, tratadas por hidrólise ácida com HCl 1N por 30 segundos (Hartmann-Goldstein, 1961; Gupta e Kumar 1987) e depois fixadas em solução de ácido acético, água e ácido láctico, na proporção de 3:2:1. O material foi corado com orceína lacto-acética a 1%, como proposto por Ashburner (1967) e, em seguida, esmagado por pressão sobre a lamínula.

Amplificação e marcação dos plasmídios

Os plasmídios com os genes *Hsr- ω* (Rysek et al, 1987), *Ubi* (Izquierdo et al, 1984), *Br-C* (Chao e Guild, 1986) e *Dpp* (St Johnston et al, 1990), clonados do genoma de *D. melanogaster*, foram amplificados na bactéria *Escherichia coli* DH5 α , cultivada em meio LB com o antibiótico ampicilina (100 μ g/ml), seguido por extração em larga escala por lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Para a utilização como sonda, o DNA

plasmidial foi marcado com biotina utilizando o sistema BioNick DNA (GIBCO/BRL, Paisley, Escócia).

Hibridização *in situ*

As lâminas de cromossomos politênicos de *Z. indianus* foram preparadas de acordo com a técnica de hibridação *in situ* de Engels et al. (1986). A hibridização *in situ* foi realizada em tampão contendo formamida a 50% a 37° C por 40 horas, usando 500 ng de sonda marcada para cada lâmina. A revelação utilizou estreptoavidina/fosfatase alcalina (SAP), azul de nitro tetrazólio (NBT) e fosfatase intestinal fetal bovina (BCIP), todos da GIBCO/BRL (Paisley, Escócia). As lâminas foram contra-coradas com uma solução de orceína-lactoacética 1% diluída 1:10 em ácido acético 45% e água destilada e posteriormente montadas com Entellan (Merck). Para o mapeamento cromossômico de cada gene, foram hibridizadas quatro lâminas, excetuando-se o gene *Dpp* para o qual foram hibridizadas e analisadas seis lâminas.

Análise Microscópica

O material foi analisado em microscópio sob contraste de fase para determinar o local e o número de marcações nos cromossomos politênicos das lâminas hibridizadas. Os cromossomos marcados por hibridização *in situ* e os melhores núcleos das lâminas construídas para o fotomapa foram fotografados através de câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73 programada para uma resolução de 3.2 mp, acoplada ao Fotomicroscópio Leitz Orthotoplan com objetiva de aumento de 100X.

RESULTADOS

Construção do fotomapa

O fotomapa dos cromossomos politênicos de *Zaprionus indianus* está representado na Figura 1. O complemento é constituído por cinco longos cromossomos eucromáticos, que correspondem aos pares acrocêntricos **I** (cromossomo **X**) ao **V**, e um pequeno cromossomo **VI**, correspondente ao par de minicromossomos. Baseado nas principais marcas de reconhecimento do primeiro mapa desenhado em câmara clara para a espécie (Gupta e Kumar, 1987), foram distribuídas 38 seções e 152 subseções neste fotomapa.

O cromossomo **X** (par **I** nas fêmeas) é facilmente individualizado em machos por ser mais fino e claro, devido à sua condição de hemizigoto. Algumas marcas detalhadas no mapa desenhado por Gupta e Kumar (1987) foram identificadas neste cromossomo, tais como a sua característica ponta aberta, a estrutura em forma de bulbo com duas bandas fortes na sessão 6A e um outro bulbo na 3A, que parece ter forte tendência a se romper em nosso material.

O cromossomo **II** é um dos menores acrocêntricos, de tamanho similar ao cromossomo **III**. Poucas marcas são reconhecíveis neste cromossomo, mas ele pode ser identificado por possuir uma ponta suavemente arredondada seguida por duas bandas fortes na seção inicial 9A.

O cromossomo **III** é o de mais fácil identificação, pois sua ponta delgada apresenta um conjunto de quatro faixas marcantes nas subseções 16A-B, seguidas por um pufe no final da subseção 16B e de outras quatro faixas na subseção 16C e por um bulbo característico na subseção 16D. Outra marca evidente no mapa de Gupta e Kumar (1987) é a estrutura em forma de bulbo na seção 19C, também presente em nossas preparações, freqüentemente em forma de um grande pufe delimitado por bandas fortes.

No cromossomo **IV**, foi observada uma diferença entre a ponta relatada como pontiaguda por Gupta e Kumar (1987) e a observada em nossas preparações, que é notadamente aberta e reta, sem puffes e com bandas evidentes. Um outro ponto marcador é o bulbo claro formado entre bandas mais escuras, na subseção 24B.

O cromossomo **V** é reconhecido por ter uma ponta em forma de fuso, com duas regiões de bandas claras (ou puffes) separadas por duas bandas fortes na subseção 31B.

Ao longo de várias seções foi possível encontrar outras formas de bulbos, como aqueles claramente presentes nas subseções 33B e 35B.

O cromossomo **VI** é o menor elemento politênico, composto por uma única seção e subdividido em quatro subseções, consistindo de quatro faixas escuras, sendo a mais larga aquela próxima à base.

Localização dos genes por hibridização *in situ*

Para o mapeamento cromossômico do gene *Hsr- ω* , foram analisados 21 núcleos politênicos que apresentaram sinais de hibridização (Tabela I). Destes, 15 núcleos apresentaram sinais na seção 32C do braço **V** (Figura 2), representando 71,4% dos núcleos analisados. Outra marca na seção 9CD apresentou uma menor frequência, consistindo de 9,5% dos núcleos analisados.

Na análise das lâminas marcadas com a sonda de *Ubi*, foram selecionados 31 núcleos politênicos (Tabela I). Nestas lâminas, houve marcação significativa em duas regiões dos cromossomos de *Z. indianus*. A marca na seção 10C do cromossomo **II** (Figura 3.A) foi detectada em 13 núcleos, o que representa 41,9% do total. A outra marca, na seção 17A do cromossomo **III** (Figura 3.B) foi observada em 12 núcleos, representando 38,7% dos núcleos marcados analisados.

Para a análise da hibridização do gene *Br-C*, foram selecionados 33 núcleos politênicos com sinais de hibridização (Tabela I). Apenas a seção 1D do cromossomo **X** (Figura 4) apresentou marcação significativa, aparecendo em 16 núcleos marcados e representando 48,5% do total. Com uma frequência menor, a região 32C do cromossomo **V** apareceu marcada em 9 núcleos, representando 27,7% do total.

Das lâminas hibridizadas com sonda do gene *Dpp*, foram analisados 36 núcleos politênicos com marcas (Tabela I). Uma única seção na região 32A do cromossomo **V** (Figura 5A) obteve marcação significativa de 33,3%, aparecendo em doze núcleos analisados. Outras marcas de *Dpp* apareceram com frequências menores nas seções 16D (Figura 5C) e 17B (Figura 5D) do cromossomo **III** e 2BC do cromossomo **X** (Figura 5A e 5B).

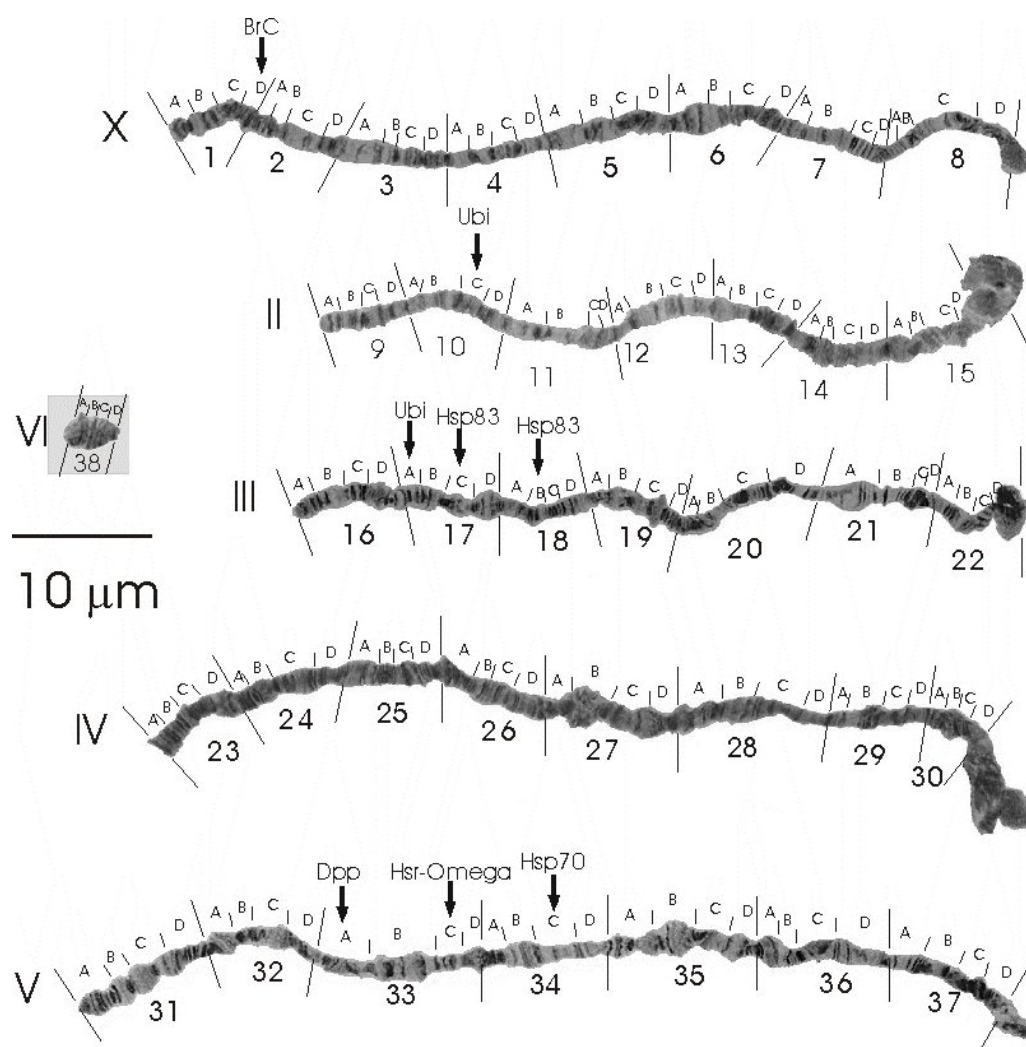


Figura 1. Fotomapa dos cromossomos politênicos de *Zaprinous indianus*, baseado na divisão de seções de Gupta e Kumar (1987). Os centrômeros são mostrados à direita.

Figura 1. Fotomapa dos cromossomos politênicos de *Zaprinous indianus*, baseado na divisão de seções de Gupta e Kumar (1987). Arquivo de figura ampliada no formato JPG encontrada em anexo.

Tabela I. Frequência de localização dos genes *Br-C*, *Dpp*, *Hsr- ω* e *Ubi* nos cromossomos politênicos de *Zaprionus indianus*. N = total de núcleos politênicos com marcação identificada.

Gene	Cromossomo	Seção	Frequência
Hsr-Omega (<i>Hsr-ω</i>)			
N = 21	V	32C	71,4%
	II	9CD	09,5%
Ubiquitinina (<i>Ubi</i>)			
N = 31	II	10C	41,9%
	III	17 ^a	38,7%
Broad complex (<i>Br-C</i>)			
N = 33	X	1D	48,5%
	V	32C	27,7%
Decapentaplegic (<i>Dpp</i>)			
N = 36	V	32 ^a	33,3%
	X	2BC	16,6%
	III	16D	16,6%
	III	17B	11,1%



Figura 2. Hibridização (seta) da sonda do gene *Hsr- ω* na seção 32C do cromossomo **V** de *Zaprionus indianus*.

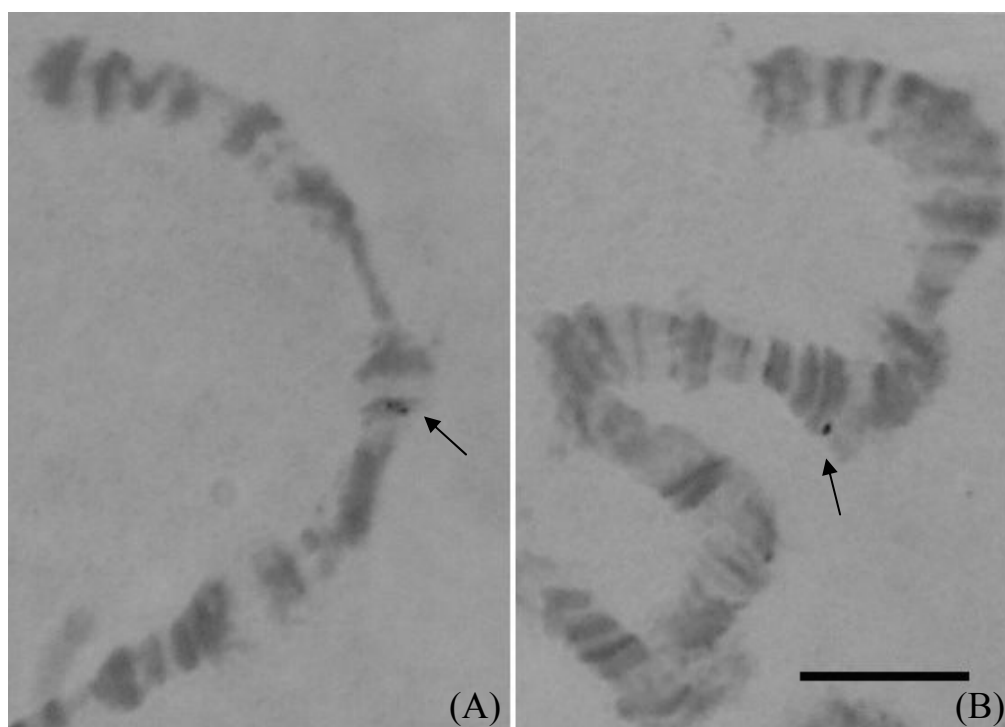


Figura 3. Hibridizações (setas) da sonda do gene *Ubi* nos cromossomos politênicos de *Zaprionus indianus*: (A) na seção 10C do cromossomo **II** e (B) na seção 17A do cromossomo **III**.

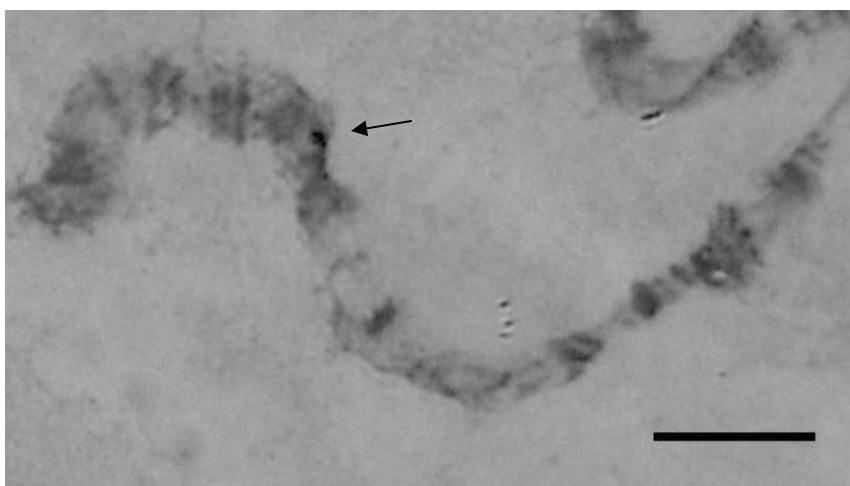


Figura 4. Hibridização (seta) da sonda do gene *Br-C* na seção 1D do cromossomo **X** de *Zaprionus indianus*.

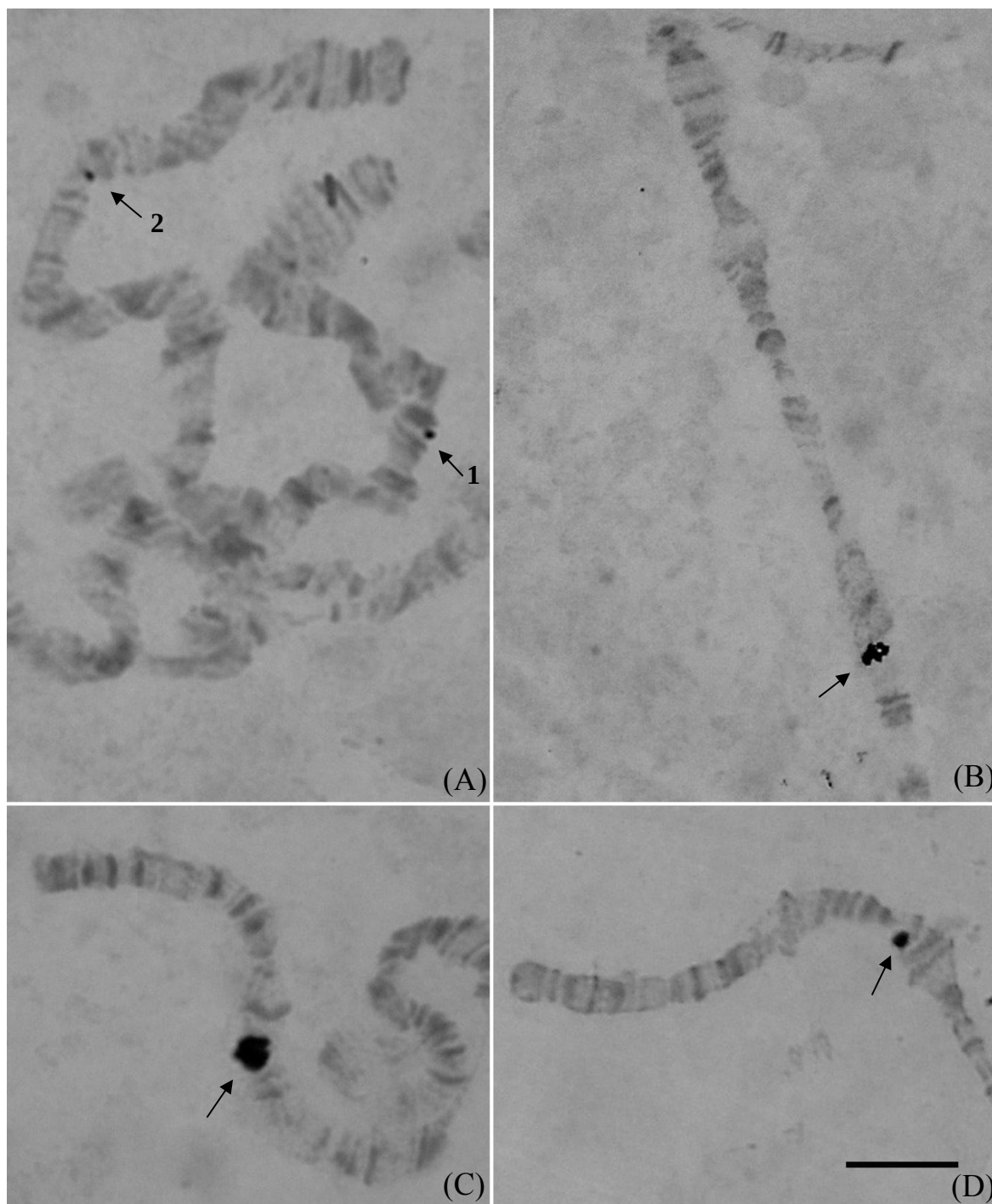


Figura 5. Hibridizações (setas) da sonda do gene *Dpp* nos cromossomos politênicos de *Zaprionus indianus*: em (A) podem ser observadas hibridizações na seção 32A (seta 1) do cromossomo V, e na região 2BC (seta 2) do cromossomo X; (B) hibridização na mesma seção 2BC do cromossomo X em outro núcleo; também foram observadas marcas no cromossomo III, nas seções 16D (C) e 17B (D).

DISCUSSÃO

Construção do fotomapa

Os cromossomos politênicos do gênero *Zaprionus* têm sido relatados na literatura como sendo difíceis de serem estudados, devido ao seu alto estado de enovelamento, alta afinidade do citoplasma pelos corantes dos cromossomos e baixo grau de politenização (Hartmann-Goldstein, 1961; Gupta e Kumar, 1987). Outra dificuldade refere-se à relativa fragilidade destes cromossomos, que costumam facilmente se fragmentar (Hatch e Jeffery, 1992). Mesmo diante dessas dificuldades, algumas espécies do gênero tiveram o complemento cromossômico estudado, como *Z. multistriatus* (Sciandra et al, 1973), *Z. sepsoides* (Tsacas et al, 1977) e *Z. indianus* (Gupta e Kumar, 1987), tendo sido confeccionados fotomapas para *Z. inermis* (Hatch e Jeffery, 1992) e *Z. tuberculatus* (Su et al, 1992). Considerando esses estudos, o padrão de cinco braços longos e um sexto mais curto parece ser uma característica comum a todas as espécies do gênero. Um fotomapa foi construído neste trabalho para utilização como mapa de referência para *Z. indianus*, apresentando todos os elementos politênicos da espécie.

Diversas dificuldades surgiram ao tentar utilizar o mapa desenhado em câmara clara por Gupta e Kumar (1987) para *Z. indianus* na comparação com os cromossomos politênicos obtidos da linhagem estudada neste trabalho. Foi difícil diferenciar os diversos elementos politênicos, tanto pelas diferenças de ativação de bandas quanto pela baixa resolução do mapa desenhado. Por estes motivos foi imprescindível construir um fotomapa com resolução adequada a partir do material obtido de populações locais, o que permitiu o reconhecimento dos elementos e divisão das seções e subseções, de maneira a possibilitar a determinação da localização de genes após hibridização *in situ*. O máximo esforço foi realizado para distribuir as seções e subseções exatamente como no mapa desenhado por Gupta e Kumar (1987), que facilitará a utilização deste fotomapa por outros grupos de pesquisa, para a definição de pontos de quebra de inversões ou ativação gênica diferencial durante o desenvolvimento larval. Contudo, algumas divergências podem ter permanecido, devido justamente às dificuldades provocadas pela baixa resolução da reprodução em pequeno tamanho do mapa publicado, que não permitiu reconhecer todas as bandas em cada seção, pelo menos no material coletado.

Localização dos genes por hibridização *in situ*

Uma comparação dos cromossomos politênicos entre espécies dos gêneros *Drosophila* e *Zaprionus* realizada por Su et al (1992) permitiu estabelecer homologia entre os cromossomos de *D. melanogaster* e *Z. tuberculatus*. Na segunda espécie do gênero em que os elementos foram correlacionados, *Z. indianus*, a localização de dois genes altamente conservados, *Hsp70* e *Hsp83*, mostrou homologia entre os cromossomos **V** e **III**, respectivamente, com os braços **3R** e **3L** de *D. melanogaster* (Campos, 2003), mas outros genes precisavam ser mapeados para confirmar os dados obtidos e permitir a correlação dos demais elementos.

A localização do gene *Hsr- ω* na região 32C do cromossomo **V** de *Z. indianus* confirma sua relação com o braço **3R** de *D. melanogaster*, correspondente ao elemento **E** de Muller, apontada anteriormente pelo mapeamento do gene *Hsp70*, presente nesses mesmos elementos (Campos, 2003). Uma vez que o braço **3R** corresponde ao cromossomo **E** de *Z. tuberculatus* (Su et al, 1992), inferimos que este corresponda ao cromossomo **V** de *Z. indianus*. Em seis espécies do subgrupo *montium* (grupo *melanogaster*) o homólogo de *Hsr- ω* foi localizado no mesmo elemento cromossômico, correspondente ao braço **3R** de *D. melanogaster* (Drosopoulo et al, 1996). A conservação da posição do gene *Hsr- ω* no elemento **E** de Muller entre os drosofilídeos também permitiu estabelecer homologias entre cromossomos de outras espécies do gênero *Drosophila*, como em *D. willistoni*, em que o gene foi localizado na seção 94A do cromossomo **III** (Rieger, 1999) e em *D. hydei*, presente na seção 48B do cromossomo **2** (Garbe e Pardue, 1986; Ryseck et al, 1987).

A marcação da subseção 17A do cromossomo **III** de *Z. indianus* pela sonda do gene *Ubi* corrobora sua homologia com o braço **3L** de *D. melanogaster*, anteriormente indicada pela localização do gene *Hsp83* no mesmo cromossomo (Campos, 2003). Uma segunda marcação significativa de *Ubi* na seção 10C do braço **II**, com frequência similar, aponta a possível existência de um loco homólogo também nesta seção. Marcações duplas deste gene *Ubi* também foram detectadas em diferentes braços cromossômicos, correspondentes aos elementos B e D, em duas espécies do grupo *willistoni*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* (Rieger, 1999). Em algumas linhagens de *D. melanogaster*, o loco de poliubiquitina, além da localização na seção 63F do braço **3L**, aparece também na região 5F do cromossomo **X** (Izquierdo, 1994). A segunda

marcação de ubiquitina em *Z. indianus* também poderia ser explicada pela existência de um gene codificador de uma proteína fusionada com um monômero de ubiquitina. Em *D. melanogaster*, existem locos na região 97A do braço **3R** e na região 31E do braço **2L** que codificam proteínas ribossomais fundidas a ubiquitina (Izquierdo, 1994), tornando possíveis de serem localizados pelas sondas de hibridização *in situ*. Com sondas produzidas a partir dessas ubiquitinas fusionadas, foram realizadas hibridizações em duas espécies do grupo *repleta*, tendo sido observada a presença de três marcações adicionais, além da região B1d do braço cromossômico **4** de *D. repleta* e *D. buzzati*, que corresponde ao sítio de poliubiquitina da região 63E de *D. melanogaster* (Ranz et al, 1997). Considerando as evidências da literatura, a segunda marcação de ubiquitina no cromossomo II de *Z. indianus* indica sua possível homologia com o elemento B de Muller.

A marcação mais significativa do gene *Br-C*, localizada na seção 1D do cromossomo **X** de *Z. indianus*, demonstra a correlação com o cromossomo **X** de *D. melanogaster*, onde este gene está presente na seção 2B5 (Chao e Guild, 1986). Anteriormente, o maior cromossomo do complemento de *Z. indianus* foi identificado como o cromossomo sexual, devido à sua tonalidade mais fraca em indivíduos machos, característica comum na maioria das espécies de drosofilídeos (Gupta e Kumar, 1987). A localização do gene *Br-C* no cromossomo **X** de *Z. indianus* aponta uma conservação dos genes fixados entre essas espécies em braços homólogos, como observado também em *D. willistoni*, onde a sonda deste gene hibridizou a seção 16A do braço cromossômico **XL** (Rieger, 1999). Os genes *Br-C*, *dor* e *swi*, que juntos formam um agrupamento na região 2B3-8 de *D. melanogaster*, foram hibridizados em espécies do grupo *virilis*, *repleta* e *obscura*. A maioria das espécies apresentou sinais de hibridização na região telomérica do cromossomo **X**, enquanto que *D. kanekoi* (grupo *virilis*) e *D. pseudobscura* (grupo *obscura*) apresentaram marcações na região distal e proximal do cromossomo **X**, respectivamente. Somente uma das espécies *D. hydei*, do grupo *repleta*, apresentou mais de doze sítios marcados em diferentes cromossomos, o que levantou a possibilidade de repetições da região 2B em algumas espécies (Kokoza et al, 1992).

A hibridização mais significativa do gene *Dpp* em *Z. indianus* foi localizada na subseção 32A do cromossomo **V**, correspondente ao braço **IIIR** de *D. melanogaster*, de acordo com o mapeamento dos genes *Hsr- ω* e *Hsp70* discutido acima. No entanto, em *D. melanogaster* o gene *Dpp* está localizado na seção 22F1-3 do braço **IIR**,

evidenciando uma discordância na localização do gene *Dpp* de *Z. indianus* em relação à proposta de Muller (1940), de que os genes se conservam dentro os cromossomos homólogos em *Drosophila*. Este achado indica que provavelmente ocorreu um rearranjo complexo, envolvendo o gene *Dpp*, que diferencia as linhagens de *Drosophila* estudadas de *Z. indianus*. As diferenças entre os complementos politênicos de diferentes espécies do gênero *Drosophila* se devem aos muitos rearranjos sofridos ao longo do tempo. As alterações cromossômicas mais comuns são as inversões paracêntricas, as fusões e fissões cêntricas, responsáveis pela variação tanto na disposição dos genes como no número fundamental de cromossomos entre as espécies (Ranz et al, 2001). Rearranjos mais abruptos, como translocações, são considerados muito raros em drosofilídeos, mas, apesar de menos frequentes que as inversões paracêntricas, as pericêntricas já foram evidenciadas entre os elementos **A** e **D** em espécies do grupo *obscura* (Segarra et al, 1995) e no cromossomo **2** de *D. montana*, pertencente ao grupo *virilis* (Vieira et al, 1997).

A localização dos homólogos do gene *Dpp*, no elemento **C** de *D. melanogaster* e no elemento **E** de *Z. indianus* (cromossomo **V**) implica que ocorreram rearranjos mais complexos e incomuns nas linhagens que originaram esta espécie. Devido à falta de estudos mais completos sobre as relações filogenéticas entre *Zaprionus* e outras espécies de drosofilídeos apontadas como mais próximas, as *Hirtodrosophilas* e as pertencentes ao grupo *immigrans* (Throckmorton, 1975; Kwiatowski e Ayala, 1999), não é possível afirmar que tipos de mudanças sofreram os complementos politênicos desses gêneros ao longo do tempo que as distanciaram evolutivamente. Do mesmo modo, a ausência de estudos anteriores de mapeamento do gene *Dpp* em outras espécies de drosofilídeos impossibilita uma conclusão sobre sua possível mudança de localização. No entanto, o gene *Dpp* pertence à família TGF- β , que possui características estruturais bem conservadas, mantendo alta similaridade entre espécies diferentes de *Drosophila* e os genes homólogos de organismos distantes evolutivamente, como mamíferos (Ritcher et al, 1997). Em *D. melanogaster*, outros genes desta família, como o *Scw* e *Gbb*, possuem mais de 50% de similaridade entre suas regiões ligantes e se encontram distribuídos em pelo menos quatro dos seis braços cromossômicos (Newfeld et al, 1997; Flybase, 2005). A presença de outros genes com tão alta conservação na família poderia explicar a presença de outros sinais, embora com menor frequência, presentes nos cromossomos **III** e **X** de *Z. indianus*, respectivamente correlacionados com os braços **3L** e **X** de *D. melanogaster*.

Os dados apresentados neste trabalho, quando comparados com a literatura disponível sobre a localização de genes em *Drosophila*, compilados na Tabela II, permitem afirmar que a hipótese de Muller (1940) de homologia entre os principais elementos politênicos de *Drosophila* pode ser estendida para o gênero *Zaprionus* (Tabela III), o que pode também ser considerado indício de que a sintenia em grandes segmentos cromossômicos foi preservada entre estes gêneros de drosofilídeos.

Finalmente, os dados obtidos através do mapeamento por hibridização *in situ* dos genes *Hsr- ω* , *Ubi*, *Br-C* e *Dpp* nos cromossomos politênicos de *Z. indianus*, apresentados neste trabalho, indicam que esta espécie também conserva as principais homologias com os elementos mullerianos, principalmente os elementos **A**, **D** e **E**. A segunda marcação de ubiquitina pode ser considerada indicação indireta de homologia do cromossomo **II** desta espécie com o elemento **B** de Muller, de forma que, por exclusão, o cromossomo **IV** corresponderia ao elemento **C**. Será de grande importância estender a análise pela localização de genes no clado irmão do gênero *Zaprionus*, o grupo *immigrans* (subgênero *Drosophila*), que possivelmente revelará a extensão dos rearranjos que os distinguem. Particularmente importante será a utilização de sondas de genes localizados próximos ao gene *Dpp* em *D. melanogaster* para hibridização em *Z. indianus*, visando confirmar os resultados obtidos com este gene e verificar a extensão do possível rearranjo ocorrido. Permanece ainda a necessidade da localização de outros genes conservados nos cromossomos politênicos de *Z. indianus*, tanto para confirmar as relações com os elementos **B** e **C** de Muller, como para, juntamente com a comparação do padrão de bandas, que sejam determinados quais tipos de rearranjos aconteceram na divergência entre os gêneros *Zaprionus* e *Drosophila*. Desta maneira, será possível avaliar se grandes arranjos sintênicos foram preservados entre estes gêneros ou se a divergência envolveu também numerosos rearranjos intracromossômicos.

Tabela II. Correspondência entre os elementos politênicos de várias espécies de drosophilídeos, baseada nos dados de localização de genes por hibridização *in situ*. São indicados o braço ou cromossomo e, entre parênteses, a seção mapeada.

Elemento	A	B	D		E	
Genes	BR-C	Dpp	Hsp83	Ubi	Hsp70	Hsr- ω
Espécie						
<i>D. melanogaster</i>	X (2B5)	2L (22F1-3)	3L (63BC)	3L (63E)*, 3R (97A), 2L (31E)	3R (87A-87C)	3R (93D)
<i>D. kikkawai</i>	-	-	24 (2L)	-	3R (94)	90 (3R)
<i>D. malerkotliana</i>	-	-	III R (98)	-	-	-
<i>D. willistoni</i>	XL (16A)	-	XR (34A)	XR (27A)	III (92)	III (94B)
<i>D. paulistorum</i>	-	-	XR (35A)	XR (37B), IIR (77B)	III (91)	-
<i>D. equinoxialis</i>	-	-	XR (31A)	XR (30B), IIR (77B)	III (90)	-
<i>D. repleta</i>	X $\square$	-	-	4 (B1d), X (C3a), 3 (A1b)	2 (D5b)	-
<i>D. hydei</i>	X $\square$	-	4 (81B)	4 (90B)	2 (32A)	2 (48B)
<i>D. virilis</i>	X $\square$	-	3 (33E)	-	2 (29C1)	-
<i>D. subobscura</i>	-	-	I (18C)	-	O (89A-94A)	-
<i>D. pseudoobscura</i>	X $\dagger$	-	XR (23)	-	2 (58-53)	-
<i>Z. tuberculatus</i>	-	-	D (66A)	-	-	-
<i>Z. indianus</i>	X (1D), V (32C)	V (32A)*, X (2BC), III (16D e 17B)	III (17C, 18B)	II (10C), III (17A)	V (34B)	V (32C)
						10, 11

Fontes: 1 – Livak et al, 1978; Holmgren et al, 1981; Rysek et al, 1989; Izquierdo et al, 1984; Chao e Guild, 1986; St Johnston et al, 1990. 2 – Drosopoulos et al, 1996; 3 – Félix, 2002; 4 – Rieger, 1999; 5 – Kokoza et al, 1992; Ranz et al, 1996; 6 – Whiting, et al, 1989; Evgen'ev et al., 2004; 7 – Whiting, et al, 1989; Kokoza et al, 1992; 8 – Kokoza et al, 1992; Segarra et al, 1996; 9 – Su et al (1992); 10 – Campos (2003); 11 – Presente trabalho.

* Principal sinal de hibridização

$\square$ Região telomérica do X, seção não informada

$\dagger$ NãoRegião proximal do X, seção não informada

Tabela III. Correspondência entre os elementos de Muller (1940) com os cromossomos politênicos de várias espécies de drosofilídeos.

Espécie	Subgênero/grupo	Elementos					Ref
		A	B	C	D	E	
<i>D. melanogaster</i>	<i>Sophophora/melanogaster</i>	X	2L	2R	3L	3R	1
<i>D. willistoni</i>	<i>Sophophora/willistoni</i>	XL	IIR	IIL	XR	III	2
<i>D. subobscura</i>	<i>Sophophora/obscura</i>	A	U	E	I	O	3
<i>D. pseudoobscura</i>	<i>Sophophora/obscura</i>	XL	4	3	XR	2	3
<i>D. repleta</i>	<i>Drosophila/repleta</i>	X	3	5	4	2	4
<i>D. virilis</i>	<i>Drosophila/virilis</i>	X	4	5	4	2	4
<i>Z. tuberculatus</i>	<i>Zaprionus sensu-stricto</i>	X	B	D	C	E	5
<i>Z. indianus</i>	<i>Zaprionus sensu-stricto</i>	X	II	IV*	III	V	6, 7

Fontes: 1- Muller (1940); 2 – Rieger (1999); 3 – Steinemann et al (1984); 4 – Ruiz et al (1997); 5 - Su et al (1992); 6 – Campos (2003); 7- Presente trabalho.

* Deduzido por exclusão (ver texto).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashburner, M. (1967) Patterns of puffing activity in salivary gland chromosome of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *D. melanogaster*. *Chromosoma* **27**, 47 – 63.
- Campos, S. R. C. (2003) Fotomapa dos cromossomos politênicos e localização dos genes *Hsp70* e *Hsp83* de *Zaprionus indianus*. *Monografia de Bacharelado*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Chao, A. T. & Guild, G. M. (1986) Molecular analysis of the ecdysterone-inducible 2B5 ‘early’ puff in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal*. **5**, 143-150.
- Chassagnard, M. Th. & Tsacas, L. (1993) Le sous-genre *Zaprionus* S. Str. Definition de groupes d’espèces et revision du sous-groupe *vittiger* (Diptera: Drosophilidae). *Annals Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* **29**, 173 – 194.
- Drosopoulo, E., Konstantopoulou, I. & Scouras Z. G. (1996) The heat shock genes in the *Drosophila montium* subgroup: chromosomal localization and evolutionary implications. *Chromosoma* **105**, 104 – 110.
- Engels, W. R., Preston, C. R., Thompson, P. & Eggleston, W. B. (1986) *In situ* hybridization to *Drosophila* salivary chromosomes with biotinylated DNA probes and alkaline phosphatase. *Focus* **8**, 6 – 8.
- Evgen’ev, M. B., Zatsepina, O. G., Garbuz, D., Lernman, D. N., Velikodvorskaya, V., Zelentsova E. & Feder M. E. (2004) Evolution and arrangement of the *hsp70* gene cluster in two closely related species of *virilis* group of *Drosophila*. *Chromosoma* **113**, 223-232.
- Felix, P. T. (2002) Polimorfismo de inversões e mapeamento in situ do loco *Hsp83* nos cromossomos politênicos de *Drosophila malerkotiana*. *Dissertação de Mestrado*. UFPE, Recife. 77 pp.
- Flybase (2005) Gene Ontology Report: transforming growth factor beta receptor binding. Disponível em <http://flybase.bio.indiana.edu/bin/goreport?GO:0005160s> Acesso em 5 jun 2005.
- Garbe, J. C. & M. L. Pardue. (1986). Heat shock locus 93D of *Drosophila melanogaster*: A spliced RNA most strongly conserved in the intron sequence. *Proceedings of Natural Academy Science USA*. **83**, 1812-1816

- Grimaldi, D. A. (1990) A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bullettin of American Museum of Natural History* **197**, 1-139.
- Gupta, J. P. (1970) Description of a new species of *Phorticella Zaprionus* (Drosophilidae) from India. *Proceedings of Indian Natural Sciences Academy* **36**, 62 – 70.
- Gupta, J. P. & Kumar A. (1987) Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae): Nuclear organizer regions, mitotic and polytene chromossomes and inversion polymorphism. *Genetica* **74** , 19 – 25.
- Hartmann-Goldstein, I. J. (1961) Enhanced differentiation of *Zaprionus* chromosomes by prestaining acid hydrolysis. *Stain Technology* **36**, 309-312.
- Hatch, K. & Jeffery, D. E., (1992) Salivary gland chromosome map of *Zaprionus inermis*. *Journal of Heredity* **83** , 311-315.
- Holmgren, R., Corces, V., Morimoto, R., Blackman, R. & Meselson, M. (1981) Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat shock genes. *Proceedeings of National Academy of Sciences USA* **78**, 3775 – 3778.
- Izquierdo, M. (1994) Ubiquitin genes and ubiquitin protein location in polytene chromosome of *Drosophila*. *Chromosoma* **103** , 193 – 197.
- Izquierdo, M., Arribas, C., Galcerán, J. & Cabrera, V. M. (1984) Characterization of a *Drosophila* repeat mapping at the early-ecdysone puff 63F and present in many eucaryotic genomes. *Biochemica and Biophysca Acta* **783** , 114 – 121.
- Livak, K. J., Freund, R., Schwebwe, M., Wensink, P. C. & Meselson, M (1978) Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proceedings National Academy of Sciences USA* **11**, 5613 – 5617.
- Kokoza, E. B., Belyaeva, E. S. & Zhimulev, I. F. (1992). Location of genes *ecs*, *dor* and *swi* in eight *Drosophila* species. *Genetica* **87**, 79 – 85.
- Kwiatowski, J. & Ayala, F. J. (1999) Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. *Molecular Phylogeny and Evololution* **13**, 319 – 328.
- Muller, J. H. (1940) Bearings of the *Drosophila* work on systematics, pp. 185-268 In: Huxley, J. *New Systematics*. Claredon Press, Oxford.
- Newfeld, S. J., Padgett, R. W., Findley, S. D., Ritcher, B. G., Sanicola, M., Cuevas, M. & Gelbart, W. M. (1997) Molecular evolution at decapentaplegic locus in *Drosophila*. *Genetics* **145** , 297 – 309.

- Pasteur, G. (1978) Affinities of *Zaprionus* and cromosomal evolution. *Drosophila Information Service* **53**, 121, 1978.
- Ranz, J. M., Segarra, C. & Ruiz, A. (1997) Chromosomal homology and molecular Organization of Muller's Elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. *Genetics* **145**, 281 – 295.
- Ranz, J. M., Casals, F. C. & Ruiz, A. (2001); How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. *Genome Reasearch* **11**, 230 – 239.
- Richter, B., Longm, M., Lewontin R.C. & Nitasaka, E. (1997). Nucleotide variation and conservation at the dpp locus, a gene controlling early development in *Drosophila*. *Genetics* **145**, 311-323.
- Rieger, T., T. (1999) Mapeamento por hibridação *in situ* e expressão no desenvolvimento de genes de resposta a estresse e ao hormônio ecdisona em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. 138p. *Tese de Doutorado*. UFRGS, Porto Alegre.
- Ryseck, R., Walldorf, U., Hoffmann, T. & Hovemann, B. (1987) Heat shock loci 93D of *Drosophila melanogaster* and 48D of *Drosophila hydei* exhibit a common structural and transcriptional pattern. *Nucleic Acids Research* **15**, 3317 - 3332.
- Ruiz A., Ranz J.M., Cáceres M., Segarra C., Navarro A. & Barbadilla A. (1997) Chromosomal evolution and comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. *Brazilian Journal Genetics* **20**,553–565.
- Santos, J. F., Rieger, T. T., Campos, S. R. C., Silva, S. V.O., Félix, P. T. & Nascimento, A. C. C. (2003) Colonization of Northeast Region of Brasil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. *Drosophila Information Service* **86**, 92-95.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniats, T. (1989) Molecular cloning: laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol.3.
- Sciandra, R. J., Abdel-Hameed, F. & Bennett, J. (1973) Chromosome complement of *Zaprionus multistriatus*. *Journal of Heredity* **64**, 31-34.
- Segarra, C., Lozovskaya, E. R., Ribó, G., Aguadé, M. & Hartl, D. L. (1995) P1 clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the obscura group of *Drosophila*. *Chromosoma*, 104 : 129 – 136.
- Segarra C., Ribó G. & Aguadé M. (1996) Differentiation of Muller's chromosomal elements D and E in the *obscura* group of *Drosophila*. *Genetics* **144**, 139–146.

- St Johnston, R. D., Hoffmann F.M., Blackman, R.K., Segal, D, Grimaila, R, Padgett, R.W., Irick, H. A., Gelbart, W. M. (1990). Molecular organization of the decapentaplegic gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes and Development* **4**, 1114 – 1127.
- Steinemann M., Pinsker W. & Sperlich D. (1984) Chromosome homologies within the *Drosophila obscura* group probed by *in situ* hybridization. *Chromosoma* **91**,46-53.
- Su, Y., Herrick, K., Farmer, J. L., Jeffery. D. E., (1992) *Zaprionus tuberculatus*: chromosome map and gene mapping by DNA *in situ* hybridization. *Journal of Heredity*, **83**, 229-304.
- Tatarenkov, A., Kwiatowski, J., Skarecky, D., Barrio, E. & Ayala, F. J. (1999) On the Evolution of *Dopa decarboxylase (Ddc)* and *Drosophila* Systematic. *Journal of Molecular Evolution* **48** , 445–462.
- Thomas, R. H., & Hunt, J. A. (1993) Phylogenetic Relationships in *Drosophila*: a conflict between molecular an morphological data. *Molecular Biological Evolution* **10** , 362–374.
- Throckmorton, L. H. (1975) The Phylogeny, Ecology and Geography of *Drosophila*. In: KING, R. C. Hand book of Genetics. Plenum Press, New York, p. 421-469.
- Tsacas, L. (1985) *Zaprionus indianus* Gupta, 1970, Nouveau nom pour le plus commun des *Zaprionus* africains (Diptera, Drosophilidae). *Annls. Soc. Entomol. Fr (N.S)* **21**, 343 - 344.
- Tsacas, L. & Chassagnard, M. T. (1990) Les espèces du genre *Zaprionus* à femurs antérieurs spinuleux (Diptera: Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr (N.S.)* **26**, 461–487.
- Tsacas, L., David, J., Allemand, R., Pasteur, G., Chassagnard, M. T. & Derridj, S. (1977) Biologie évolutive du genre *Zaprionus* recherches sur lê complexe spécifique de *Z. tuberculatus* (Dipetra: Drosophilidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* **13** , 391 – 415.
- Vieira, J., Vieira, C. P., Hartl, D. L. & Lozovskaya, E. R. (1997) A framework physical map of *Drosophila virilis* based on P1 clones: applications in genome evolution. *Chromosoma* **106** , 99-107.
- Vilela, C. R. (1999) Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Drosophila Information Service* **82**, 37-39.

- Vilela, E. F., Zucchi, R. A. & Cantor, F. (2001) Histórico e Impacto das Pragas Introduzidas no Brasil. Holos Editora Ltda-ME. Ribeirão Preto. SP., p. 48-51.
- Wheeler, M. R. (1981) The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: Ashburner, M.; Carson, H. L. and Thompson, Jr., J. N. The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press. New York. Vol.3a, p.1-97
- Wheeler, M. R.. (1986) Additions to the Catalogs of World's drosophilidae In: Ashburner, M.; Carson, H. L. and Thompson, Jr., J. N. The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press. New York. Vol.3c, 1986, p.395-409
- Whiting Jr J.H., Pliley M.D., Farmer J.L. & Jeffery DE (1989) *In situ* hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. *Chromosoma* **122**,99-109.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

1. O fotomapa construído para a linhagem VVI de *Zaprionus indianus* apresenta resolução superior ao mapa desenhado em câmara clara publicado, o que possibilitará seu uso como mapa padrão de referência, para determinação de pontos de quebra de inversões e mapeamento de genes hibridizados *in situ*, fornecendo base física para caracterizações genômicas posteriores;
2. As dificuldades encontradas na utilização do mapa politênico desenhado para *Z. indianus* devem-se à baixa resolução e às diferenças no padrão de ativação de bandas, que revela diferenças regulatórias entre as linhagens utilizadas, como aquelas observadas nas pontas dos cromossomos **II** e **IV**;
3. O cromossomo **V** de *Z. indianus* possivelmente corresponde ao elemento **E** de Muller, com base na localização do gene *Hsr- ω* na seção 32C do cromossomo **V**, que o correlaciona com o braço **3R** de *Drosophila melanogaster*. Esta conclusão reforça a hipótese de homologia entre estes elementos politênicos, anteriormente sugerida pela localização do gene *Hsp70*, também compartilhado no mesmo elemento;
4. O mapeamento do loco *Ubi* na seção 17A do cromossomo **III** de *Z. indianus* apóia a indicação de homologia com o braço **3L** de *D. melanogaster* e, portanto, com o elemento **D** de Muller, apontada anteriormente pela localização do gene *Hsp83* nos mesmos elementos;
5. A segunda marcação significativa da sonda *Ubi* na seção 10C do cromossomo **II** de *Z. indianus* pode indicar um loco de ubiquitina fusionada, sugerindo um indício de que este elemento corresponderia ao braço **2L** de *D. melanogaster*, e, portanto, ao elemento **B** mulleriano;
6. A hibridização do gene *Br-C* na seção 1D do cromossomo **X** em *Z. indianus* sugere sua homologia com o cromossomo **X** de *D. melanogaster* e, portanto, com o elemento **A** mulleriano;
7. O gene *Dpp* foi mapeado na seção 32A do cromossomo **V** de *Z. indianus*, embora sua localização fosse esperada no cromossomo **II** ou no **IV**, um dos quais corresponderia ao braço **2L** de *D. melanogaster*, indicando a possibilidade de ter ocorrido rearranjo que o translocou de elemento;
8. As correspondências indicadas acima entre os elementos politênicos de *Z. indianus* e *D. melanogaster* apóiam a hipótese de homologia entre os

cromossomos **X**, **II**, **III** e **V** de *Z. indianus* com **A**, **B**, **D** e **E** de *Z. tuberculatus*, respectivamente. Por exclusão, o cromossomo **IV** de *Z. indianus* seria homólogo ao cromossomo **C** de *Z. tuberculatus*;

9. Os resultados da localização dos genes descritos no presente trabalho, em comparação com dados da literatura, apóiam a hipótese de Muller de homologia entre os elementos politênicos de *Drosophila* e sua extensão ao gênero *Zaprionus*;
10. Em perspectiva, a localização dos mesmos genes em *Z. indianus* e *D. immigrans* poderá solidificar e ampliar a abrangência da comparação entre os gêneros, permitindo detectar os diversos rearranjos ocorridos em sua história evolutiva.

VI. ABSTRACT

**Homology among polytene chromosomes of *Zaprionus* and *Drosophila*:
photomap and gene mapping by *in situ* hybridization in *Z. indianus***

Sérgio Roberto de Souza Leão da Costa Campos

ABSTRACT

The drosophilid *Zaprionus indianus* has become a potential insect pest in Brazil, which had increased interest in its genetic characterization. It is already available the description of mitotic karyotype and a line-drawing map of its polytene chromosomes in the literature, however, the homology between its chromosomal elements with the chromosomes of *Drosophila* is still lacking. This work describes a good resolution photomap of *Z. indianus* polytene chromosomes, which can be used as the reference map for identification of sections marked by *in situ* hybridization with gene probes. The *Hsr- ω* probe was detected in section 32C of chromosome **V**, indicating its correlation to the *D. melanogaster* **3R** chromosomal arm and the Muller's **E** element, as already suggested by the location of the *Hsp70* gene. The *Ubi* probe hybridized consistently both in sections 17A of chromosome **III** and 10C of chromosome **II**, probably the first being the poliubiquitin locus, which is in accordance with homology of *D. melanogaster* 3L arm and to the mullerian **D** element, as suggested also by *Hsp83* gene location. The *Br-C* gene was mapped in section 1D, near the tip of **X** chromosome, indicating its homology to the mullerian **A** element. The *Dpp* gene hybridized mainly in section 32A of chromosome **V** and, in lower frequencies to other sections, although none signal was observed as expected in the correspondent of mullerian **B** element. This result has led to the suggestion of a rearrangement including *Dpp* locus in *Z. indianus*, being the secondary marks possibly pointing to related genes of TGF- β family.

Master Dissertation, Programa de Pós-Graduação em Genética, UFPE, Recife, Brazil.

VII. ANEXO

ANEXO

O cariótipo mitótico, incluindo banda NOR, uma inversão paracêntrica e um mapa dos cromossomos politênicos, desenhado em câmara clara (Figura 1), foram descritos para *Zaprionus indianus* por Gupta e Kumar (1987). Foram localizados por Campos (2003) por hibridização *in situ* nos cromossomos politênicos de *Z. indianus* os genes *Hsp70* (Figura 2) e *Hsp83* (Figura 3).

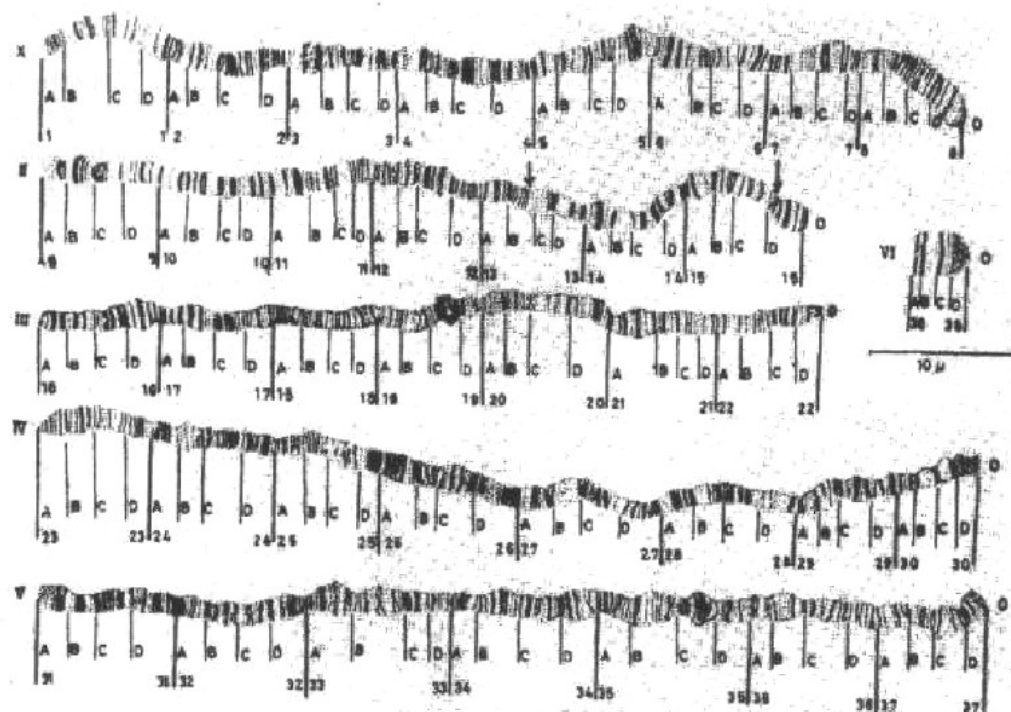


Figura 1. Primeiro mapa politênico de *Zaprionus indianus*, feito em câmara clara por Gupta e Kumar (1987), dividido em 38 seções e 152 subseções. O círculo determina a parte basal ligada ao cromocentro.

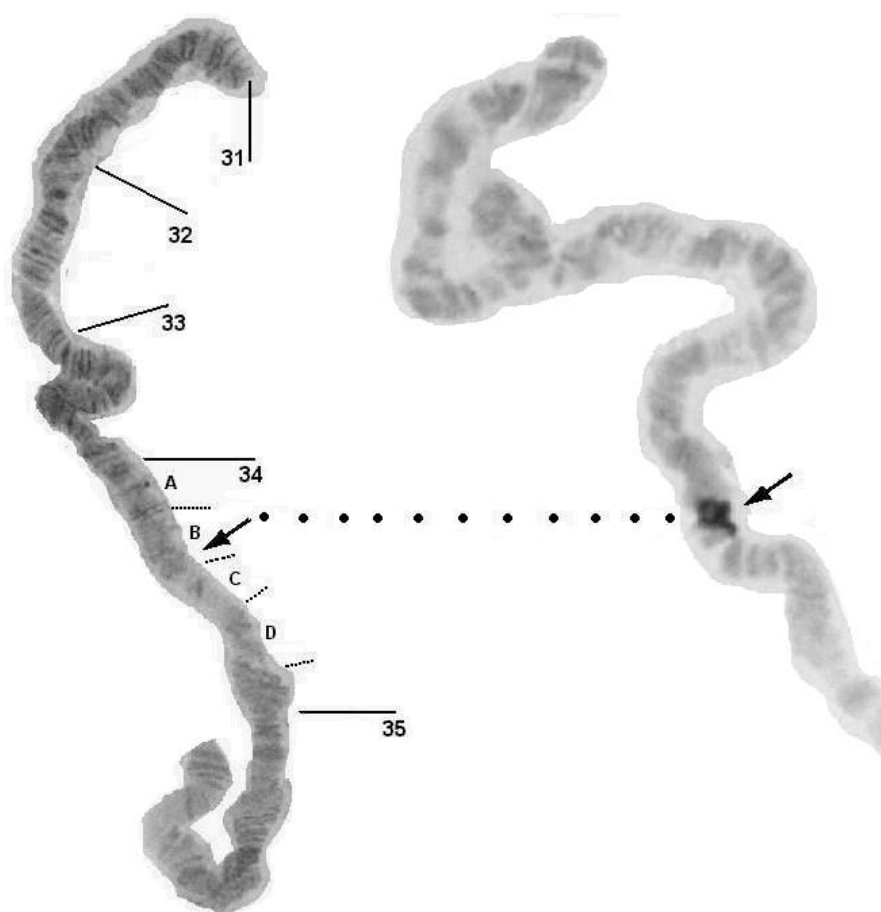


Figura 2. Cromossomo V de *Zaprionus indianus*, mostrando a hibridização da sonda do gene *Hsp70* na seção 34B (seta). A marcação foi encontrada em 11 núcleos analisados, representando cerca de 68,7% das marcas totais (Campos, 2003).

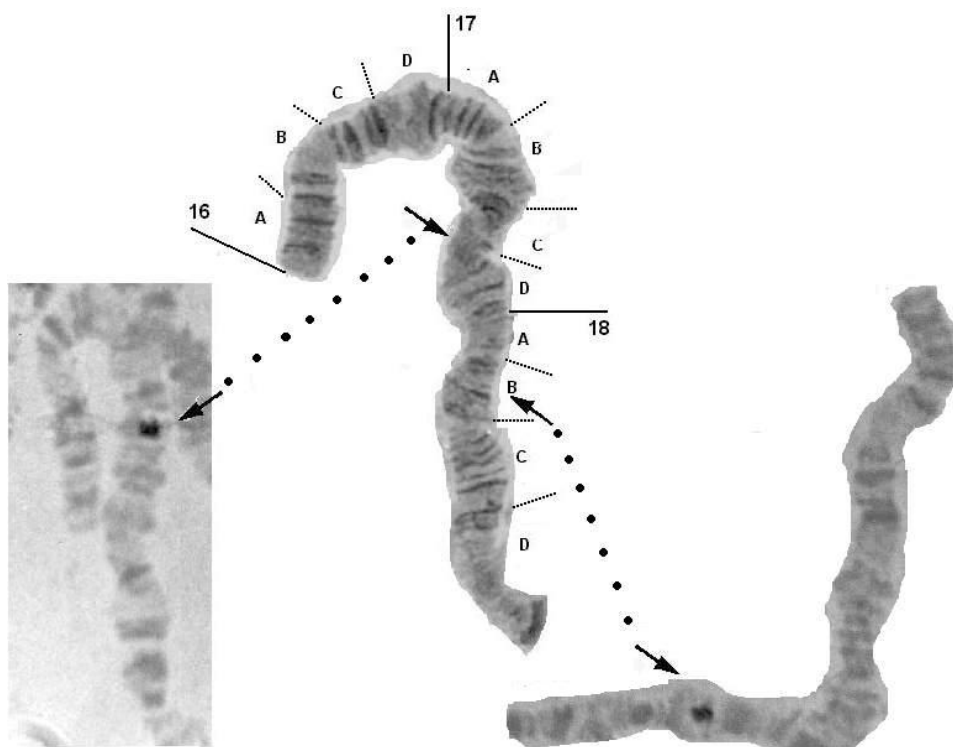


Figura 3. Cromossomo **III** de *Zaprionus indianus*, mostrando a hibridização da sonda do gene *Hsp83* em duas seções (setas). Na seção 17C, onde apareceu em 44,4% das marcações totais e na seção 18B, em cerca de 38,8% das marcações (Campos, 2003).

Genetical Research

Genetical Research publishes original work on all aspects of genetics, or in any field of research which has an important bearing on genetics. Reviews of topical interest will also be considered. Papers will be submitted to referees, and will generally be printed in order of acceptance. Short papers (see below) will be given priority in publication.

Contributions

Contributions are welcomed from scientists of all nationalities but must be written in English. Papers should be sent to one of the Executive Editors, or to a member of the Editorial Board with a particular interest in that area of genetics. Submission of a paper will be taken to imply that it is unpublished and is not being considered for publication elsewhere. Authors of articles published in the journal assign copyright to Cambridge University Press (with certain rights reserved) and you will receive a copyright assignment form for signature on acceptance of your paper.

Papers should be as concise as clarity permits, and illustrations should be restricted to the *minimum needed*.

Executive Editors

Professor W G Hill and Dr D J Finnegan, *Genetical Research*, Institute of Cell, Animal and Population Biology, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JT, UK. Telephone: +44 (0)131-650-5454. Fax: +44 (0) 131-650-6564. Dr Trudy F C Mackay, North Carolina State University, Department of Genetics, Raleigh, NC 27695-7614, USA.

Short papers

This category is designed for concisely written reports of work for which rapid publication is considered desirable. Such papers will normally be published within three months of receipt in acceptable form. They should not exceed 4 pages of print in length, and should include a summary.

Typescripts

A top copy and two other copies should be submitted. The top copy should be typed with double-spacing on one side of good quality paper, leaving margins of about 40 mm (1.5 inches) at the left-hand side and at the top and bottom of each sheet. Each copy should include a complete set of illustrations. The title should ordinarily identify the organism. The address of the laboratory at which the work was carried out will be printed with the authors' names at the head of the paper, and changes of address may be added in footnotes. A footnote to the title page should also give the name and address to whom reprint requests may be made. Sources of financial support should be included with other acknowledgements at the end of the text. The title page of the typescript should include a short title for running headlines (limited to 50 letters and spaces), and the name and address of the author (or his proxy) to whom the proofs are to be sent, under the heading: *Proofs to be sent to* . Main headings should be typed in capitals and (except summary and references) numbered consecutively. Subheadings should be typed in lower case, and underlined except for those words and symbols which would be italicized in the text. Subheadings should be numbered (i), (ii), etc., within each main heading. *Numeral 1 and letter el: if your PC uses one symbol for both, please make clear to the printer which is intended in formulae, gene symbols, etc.*

Disk submission

When an article has been accepted for publication, the author is requested to send a copy of the final version on computer disk (Apple Macintosh or IBM -compatible PC) *together with* the hard copy typescript, giving details of the wordprocessing software used (Microsoft Word, Word or WordPerfect). However, the publisher reserves the right to typeset material by conventional means if an author's disk proves unsatisfactory.

Summary

The summary will be printed at the beginning of the paper. It should give a concise abstract of the significant content and conclusions of the paper, in a form suitable for abstracting journals to use, and should not exceed 250 words.

Illustrations

All illustrations, including photographs, diagrams, graphs etc. are to be labelled consecutively Figure 1, 2 . . . according to their relative positions in the text. Each figure should have a legend to be printed underneath it. Photographs should be supplied as unmounted glossy prints, with a sketch or separate set to show the arrangement required when several photographs are to form one figure. The names of the authors and the orientation of the figure should be indicated on the back of each photograph.

Diagrams should be about twice the size of the printed figure, but not larger than 300 x 200 mm (12 x 8 inches), unless exceptionally complicated, and the thickness of lines and size of points should be determined accordingly. They may be submitted as glossy photographic prints or be drawn. The lettering on drawings should be lightly inserted in *soft pencil* only, so that the printer can put in the finished lettering. Legends to illustrations must be given on a separate sheet of paper. Each illustration must have the name of the author and figure number pencilled on the back.

Tables

Each table should be typed on a separate sheet of paper and its approximate position in the text indicated on the typescript. Each should be numbered and carry an appropriate title. The table should be designed, whenever possible, to be printed in the normal orientation of the text. The data should be grouped so as to make the use of rules unnecessary. Vertical rules, in particular, are expensive to print, and will only be included at the Editor's discretion.

Symbols

Gene and mathematical symbols should generally be printed in italics. Please underline those to be italicized when they appear in the text and tables. Bold letters add to printing costs and should only be used where they are necessary to avoid confusion. The author must assume responsibility for the accurate printing of complex mathematical formulae submitted in typewritten form, by differentiating between letters and numbers which are open to misinterpretation, and identifying all Greek, Hebrew and script letters by means of marginal notes at their first appearance. Note that Greek symbols cannot be italicized and that '+' as the symbol for a wild -type allele should not be italicized.

Nomenclature

Wherever possible, standardized nomenclature should be employed. The author should refer to the following publications for guidance: Novick *et al.* (*Bacteriological Reviews* **40**, 168-189) for plasmids; O'Brien (Ed.), *Genetic Maps* **6**, Cold Spring Harbor 1993, for recent information on most species and recent gene lists.

References

References should follow the normal usage in the journal. In the list of references at the end of the paper, *both titles of articles and names of periodicals* should be written out in full.

Proofs

Two sets of page proofs, together with the typescript of each paper will be sent to the author. The printers' marked proof should be returned after correction to the Executive Editor, together with the typescript. Excessive alterations, other than corrections of printers' errors, may be disallowed or charged to the author. Corrections should be made using the symbols in British Standard 1219: 1958, or its shortened version B.S. 1219C: 1958.

Offprints

Fifty offprints of each paper, or short paper, are provided free of charge. Additional offprints may be ordered in the form sent out with proofs, provided this is returned within fourteen days of receipt.

Este trabalho foi desenvolvido inteiramente nos Laboratório de Genética Animal e Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

