

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO ESPAÇADOR INTERNO
TRANSCRITO-1 ITS-1 DO DNA RIBOSSÔMICO NAS ESPÉCIES DO
CLUSTER *BUZZATII* DE *DROSOPHILA* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

**PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF THE rDNA ITS-1 INTERNAL
TRANSCRIBED SPACER-1 IN THE *DROSOPHILA BUZZATII* CLUSTER
SPECIES (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

Rogério Pincela Mateus¹

Carlos Roberto Ceron²

Luciana Paes de Barros Machado¹

Fábio de Melo Sene³

RESUMO

O DNA ribossômico (DNAr) possui seqüências intercalares, que variam intra e interpopulacionalmente, e seqüências codificadoras altamente conservadas e que servem como marcadores para comparação entre táxons divergentes e até mesmo entre diferentes reinos. O *cluster buzzatii* do grupo *repleta* é considerado monofilético e a morfologia da genitália é a principal característica diagnóstica para separar as espécies. Neste trabalho, foi realizado um estudo preliminar sobre o espaçador interno transcrito-1 ITS-1 do DNA ribossômico das espécies deste *cluster*, com o objetivo de verificar o nível de diferenciação interespecífica na estrutura da região deste espaçador, através da análise do tamanho dessa seqüência em seis diferentes espécies. Não foi encontrada diferenciação no tamanho do espaçador ITS-1 entre as seis espécies do *cluster buzzatii* estudadas, o que reforça o monofiletismo sugerido para este *cluster* e indica que futuros estudos filogenéticos deverão ser realizados através do sequenciamento desta região do DNA ribossômico.

Palavras-chave: DNAr; espaçador ITS-1; *cluster buzzatii*; espécies crípticas

¹ UNICENTRO-Universidade Estadual do Centro-Oeste, CEDETEG-Centro de Desenvolvimento Educacional e Tecnológico de Guarapuava, Laboratório de Genética e Evolução do Departamento de Ciências Biológicas, Guarapuava, PR, Brasil.

² UNESP-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Química e Ciências Ambientais, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³ USP-Universidade de São Paulo, FMRP-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Laboratório de Genética Evolutiva do Departamento de Genética, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

ABSTRACT

The ribosomic DNA (rDNA) have intergenic sequences which vary within and among populations, and highly conserved coding sequences that can be used as genetic marker for comparisons among taxa, even among kingdoms. The *Drosophila buzzatii* cluster species of the *Drosophila repleta* group is considered monophyletic, and aedeagus morphology has been applied to diagnostify species. In this work, we performed a preliminary study using rDNA ITS-1 internal transcribed spacer-1 in *Drosophila buzzatii* cluster species in order to evaluated possible length polymorphism among six different species. No differentiation was found in the size of the ITS-1 spacer in the six species analyzed, reinforcing the monophyletic status of this group. The preliminary characterization of ITS-1 intergenic spacer demonstrated to be important for future phylogenetic studies, which should be realized through the sequencing of this rDNA region.

Key-words: rDNA; ITS-1 spacer; *Drosophila buzzatii* cluster species; cryptic species

INTRODUÇÃO

O genoma nuclear possui vasta complexidade e muitos genes têm se mostrado úteis para inferir relações filogenéticas (Friedlander *et al.*, 1992). O melhor exemplo de ampla utilização de genes nucleares em estudos filogenéticos é a unidade de repetição do DNA ribossômico (DNAr), a qual tem seqüências intercalares que variam dentro e entre populações e seqüências codificadoras que são altamente conservadas e que servem como marcadores para comparação entre táxons divergentes (Mindell e Honeycutt, 1990; Hillis e Dixon, 1991), até mesmo entre reinos diferentes (Pace *et al.*, 1986).

Em eucariotos, o DNAr é uma família multigênica organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade repetida consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões mais variáveis de espaçadores não-codificantes. Na maioria dos animais, existem de 100 a 500 cópias do gene DNAr no genoma nuclear. Cada unidade de transcrição, é composta de uma região promotora líder (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do RNAr 18S, um espaçador não-codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de RNAr 5,8S, um outro espaçador não-codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de RNAr 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não-transcrito, IGS (Hillis e Dixon, 1991; Polanco *et al.*, 1998).

A partir do momento em que seqüências do genoma nuclear possam ser eficientemente acessadas, elas passam a fornecer um estoque infindável de marcadores

para estudos genéticos e evolutivos. A grande vantagem de trabalhar com seqüências de *loci* conhecidos é que estes apresentam um potencial maior de verificação de sua variação em outras espécies e, assim, ser beneficiado pela sinergia entre estudos de evolução e sistemática molecular.

A heterogeneidade na estrutura do DNAr pode ser devido a polimorfismos de tamanho e/ou mutações pontuais na seqüência do espaçador intergênico (Bowen e Dover, 1995; Ganley e Scott, 1998) e, em alguns casos, à presença de elementos transponíveis, tais como descrito para o elemento R1 encontrado em *Drosophila arizonae* (Tovar *et al.*, 2000) e para os elementos R1 e R2 encontrados em *D. simulans* (Perez-Gonzalez e Eickbush, 2001). Regiões não-codificadoras variáveis do DNAr são úteis na identificação de linhagens de *Leishmania donovani* (Tian *et al.*, 2004), de espécies crípticas de diatomáceas (Beszteri *et al.*, 2005) e de espécies de muitos insetos (Scott *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2004; Tartarotti e Ceron, 2005). Dentre estas regiões, o espaçador ITS-1 geralmente tem sido bem informativo (Baffi e Ceron, 2002).

O *cluster buzzatii* do grupo *repleta* é formado atualmente por 7 espécies crípticas: *Drosophila buzzatii*, *D. serido*, *D. borborema*, *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. gouveai* e *D. antonietae*. A distribuição geográfica de algumas destas espécies na América do Sul está esquematizada na Figura 1. Dentre os diversos marcadores estudados nestas espécies, o complexo arranjo de inversões cromossômicas define este *cluster* como sendo monofilético e a morfologia da genitália é considerada como a principal característica diagnóstica para separar as diversas espécies (Vilela, 1983; Silva e Sene, 1991, Tidon-Sklorz e Sene, 1995). Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo preliminar sobre o espaçador intergênico ITS-1 do DNA ribossômico destas espécies para verificar o nível de diferenciação interespecífica na estrutura com relação ao tamanho da região deste espaçador.

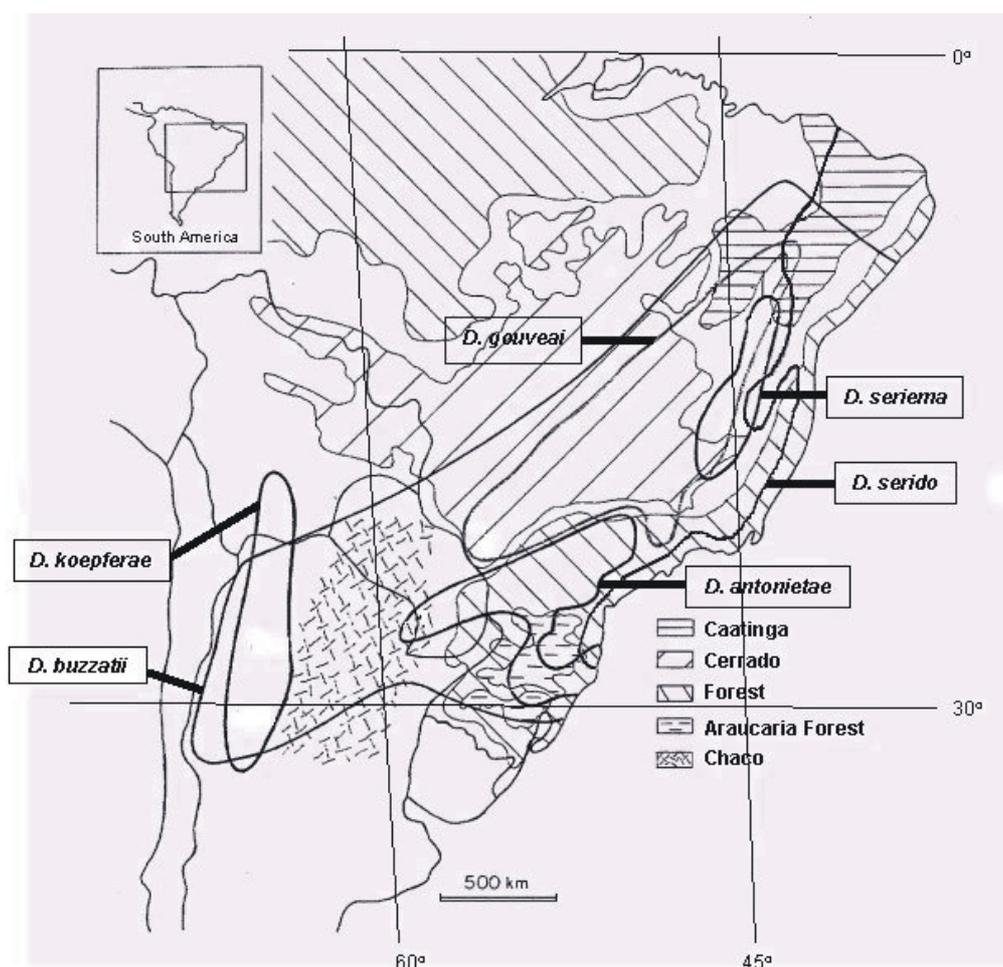
MATERIAL E MÉTODOS

A análise de polimorfismo de tamanho para o espaçador interno transcrito-1 ITS-1 do gene DNAr foi realizada com indivíduos obtidos a partir de linhagens de seis espécies do *cluster buzzatii*: *Drosophila buzzatii* (Bahia, Brasil), *D. serido* (Cafarnaum, BA), *D. gouveai* (Pirenópolis, GO), *D. seriema* (Morro do Chapéu, BA), *D. antonietae* (Serrana, SP) e *D. koepferae* (Famatina, Argentina). As espécies *Drosophila melanogaster*, *D. arizonae* e *D. mulleri*, as quais já tiveram o tamanho do espaçador ITS-1 caracterizado (Tautz *et al.*, 1988; Baffi e Ceron, 2002), foram utilizadas como controle.

O DNA genômico foi extraído macerando moscas de cada espécie individualmente em tubos contendo 50 mL de solução de proteinase K (200 mg/ml em *Squishing Buffer* 1x), incubando-as a 37° C por 30 minutos e depois a 95° C por 3

minutos. A amplificação da região completa do ITS-1 foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* com homologia a extremidade 3' do gene 18S do DNAr, e à extremidade 5' do gene 5,8S do DNAr, de acordo com o método descrito por Baffi e Ceron (2002).

FIGURA 1. Mapa de vegetação e distribuição das espécies de *Drosophila* do cluster *buzzatii* utilizadas neste trabalho. Modificado de Machado *et al.* (2006).

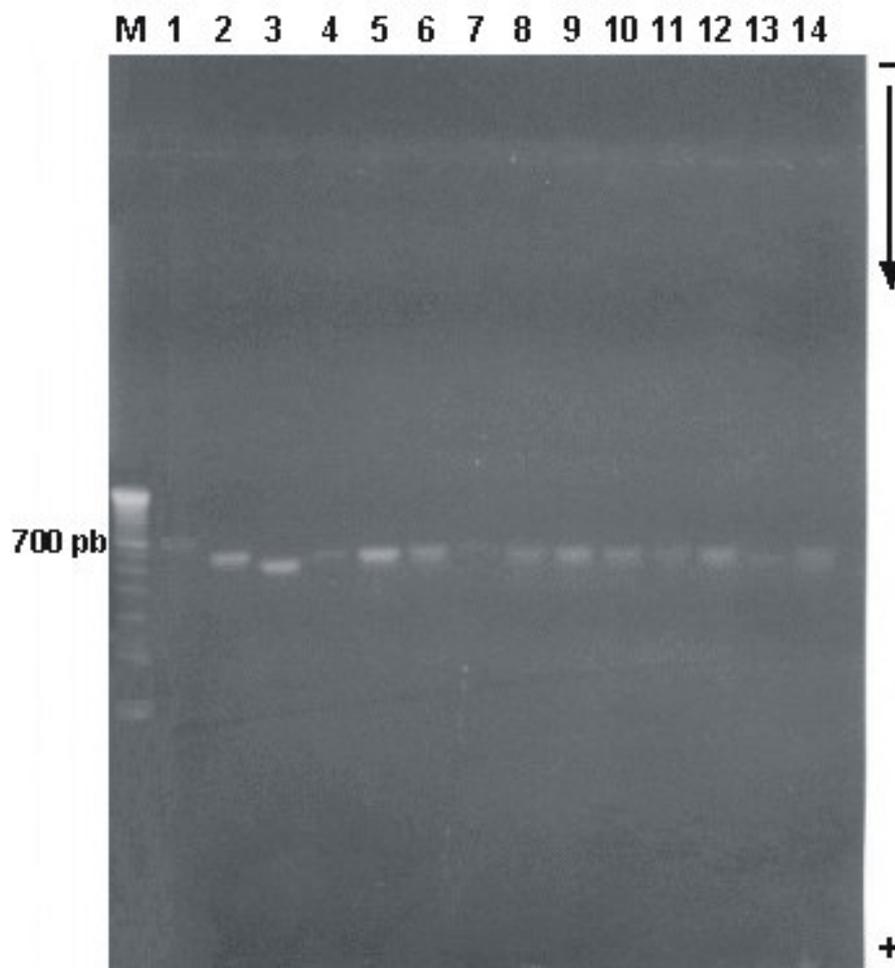


Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% em Tampão TAE 1X pH 8,0, contendo 5 mL de solução 10 mg/mL de brometo de etídio. A separação dos fragmentos no gel foi realizada através de eletroforese a 50 V constantes na fonte durante 4 horas e a visualização das bandas foi feita através de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 representa o resultado da amplificação do espaçador interno ITS-1 em *Drosophila melanogaster*, *D. mulleri* e *D. arizonae* e nas seis espécies de *Drosophila* do cluster *buzzatii*. *Drosophila melanogaster* apresentou o maior fragmento amplificado, seguido por *D. mulleri* e as seis espécies do cluster *buzzatii* e, finalmente, por *D. arizonae*. Nenhuma diferenciação no tamanho do espaçador ITS-1 foi encontrada entre as espécies do cluster *buzzatii*.

FIGURA 2. Fragmentos do espaçador interno transcrito-1 ITS-1 do DNAr visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo e luz ultravioleta.



M. Marcador de peso molecular em pares de base (pb) – 100 base pair ladder (Pharmacia); **1.** *Drosophila melanogaster* (726 pb); **2.** *D. mulleri*; **3.** *D. arizonae*; **4 e 5.** *D. serido*; **6 e 7.** *D. gouveai*; **8 e 9.** *D. seriema*; **10 e 11.** *D. antonietae*; **12 e 13.** *D. koepferae*; **14.** *D. buzzatii*.

Tautz *et al.* (1988) realizaram um estudo detalhado dos genes para RNA ribossômico em *Drosophila melanogaster*. Segundo estes autores, a região do espaçador intergênico ITS-1, nesta espécie, apresenta 726 pares de bases (pb) de comprimento (entre as posições 1996-2721). Baffi e Ceron (2002) determinaram, em *Drosophila mulleri* e *D. arizonae*, que o espaçador ITS-1 apresenta 600 pb e 500 pb, respectivamente. Para as espécies do *cluster buzzatii*, analisadas no presente trabalho, esta região apresentou tamanho semelhante ao de *D. mulleri*, aproximadamente 600 pb.

Segundo Tidon-Sklorz e Sene (1995) e Monteiro (1997), a morfologia do edeago da espécie *Drosophila buzzatii* a difere das demais espécies do *cluster*, mostrando que *D. serido*, *D. gouveai*, *D. seriema*, *D. antonietae*, *D. koepfarae* e *D. borborema* possuem uma grande semelhança morfológica entre si, o que sugere ancestralidade comum. Deste modo, estas seis espécies foram agrupadas por Ruiz *et al.* (2000), formando o *subcluster serido*. Nossos dados não separaram *Drosophila buzzatii* das demais espécies do *cluster*, como a morfologia do edeago, indicando que para a detecção da variabilidade nessa região de DNAr é necessário a realização de sequenciamento, que será o próximo passo desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À USP-Ribeirão Preto, UNESP-São José do Rio Preto e UNICENTRO pelos auxílios indiretos, e a Taylor Maxwell pela revisão do Summary.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baffi, M. A., Ceron, C. R. Molecular analysis of the rDNA ITS-1 intergenic spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and their hybrids. *Biochem. Genet.*, v.40, p.411-421, 2002.
- Beszteri, B., Acs, E., Medlin, L. K. Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity. *Protist*, v.156, p.317-333, 2005.
- Bowen T., Dover G. A. PCR amplification of intergenic spacers in the ribosomal DNA of *Drosophila melanogaster* reveals high levels of turnover in length and copy-number of spacers in geographically separated populations. *Mol Ecol.*, v.4, p.419-427, 1995.
- Friedlander, T. P., Regier, J. C., Mitter, C. Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates. *Syst. Biol.*, v.41, p.483-490, 1992.
- Ganley A. R., Scott B. Extraordinary ribosomal spacer length heterogeneity in a *Neotyphodium endophyte* hybrid: implications for concerted evolution. *Genetics*, v.150, p.1625-1637, 1998.

- Gao, Q., Zhou, H. Y., Li, J. L., Li, F. H., Choe, T. G., Yom, S. C., Zhu, G. D., Cao, J. Analysis of the sequences of the ribosomal DNA ITS-2 region for differentiating anopheline mosquitoes within hyrcanus group. *Chin. J. Parasitol. Parasitic Diseases*, v.22, p.277-279, 2004.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.*, v.66, p.411-453, 1991.
- Machado, L. P. B., Madi-Ravazzi, L., Tadei, W. J. Reproductive relationships and degree of synapsis in the polytene chromosomes of *Drosophila buzzatii* species cluster. *Braz. J. Biol.*, v.66, p. 279-293, 2006.
- Mindell, D. P., Honeycutt, R. L. Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v.21, p.541-566, 1990.
- Monteiro, S. G. *Morfometria multivariada de populações naturais de Drosophila serido*. Tese de Doutorado, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, 1997.
- Pace, N. R., Olsen, G. J., Woese, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell.*, v.45, p.325-326, 1986.
- Perez-Gonzalez, C. E., Eickbush, T. H. Dynamics of R1 and R2 elements in the rDNA locus of *Drosophila simulans*. *Genetics*, v.158, p.1557-1567, 2001.
- Polanco C., Gonzalez, A. I., de la Fuente, A., Dover, G. A. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics*, v.149, p.243-256, 1998.
- Ruiz, A., Cansian, A. M., Kuhn, G. C. S., Alves, M. A. R., Sene, F. M. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. *Genetica*, v.108, p.217-227, 2000.
- Scott, J. A., Brogdon, W. G., Collins, F. H. Identification of a single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, v.49, p.520-529, 1993.
- Silva, A. F. G., Sene, F. M. Morphological geografic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v.35, p.455-468, 1991.
- Tartarotti, E., Ceron, C.R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochem. Genet.*, v.43, p.365-373, 2005
- Tautz, D., Hancock, J. M., Webb, D. A., Tautz, C., Dover, G. A. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol*, v.5, p.366-376, 1988.
- Tian, Y., Chen, J. P., Hu, X. S. Cloning and sequence analysis of the ribosomal DNA ITS gene of *Leishmania donovani* isolates from hill foci of China. *Chin. J. Parasitol. Parasitic Diseases*, v.22, p.294-296, 2004.

Tidon-Sklorz, R., Sene, F. M. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* group) in the Northeastern South America. *Evolución Biológica*, v.8/9, p.71-85, 1995.

Tovar, F. J., Silva, L. A. F., Rodarte, R. S., Leoncini, O. Characterization of ribosomal DNA (rDNA) in *Drosophila arizonae*. *Genet. Mol. Biol.*, v.23, p.231-233, 2000.

Vilela, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v.27, 114p., 1983.