

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

NATASHA AVILA BERTOCCHI

**ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE UM ELEMENTO *MARINER-LIKE*
NO GENOMA DE AVES**

**São Gabriel
2015**

NATASHA AVILA BERTOCCHI

ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE UM ELEMENTO *MARINER-LIKE* NO GENOMA DE AVES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fabiano Pimentel Torres

Coorientador: Dr^a. Analía Del Valle Garnero

**São Gabriel
2015**

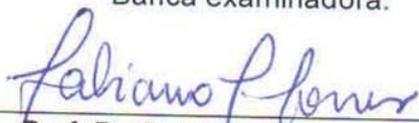
NATASHA AVILA BERTOCCHI

ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE UM ELEMENTO *MARINER-LIKE* NO GENOMA DE AVES

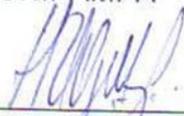
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: dia, mês e ano.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Ricardo José Gunski
UNIPAMPA



Prof. Dr^a. Maríndia Deprá
UFRGS

Ao meu irmão Pedro por ter tornado este último ano de graduação ainda mais especial com a sua chegada e por ter o sorriso mais lindo mundo.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Fabiano pela confiança, atenção e disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho. E também claro, por toda a paciência nas tantas vezes que enchi “o saco” mandando e-mails e interceptando-o nos corredores.

A Prof. Analía pela confiança desde o início no meu potencial e pela compreensão nas tantas vezes que disse “não saber mais o que fazer” com o meu TCC.

Ao Prof. Ricardo por sempre receber com entusiasmo as pequenas novidades que foram surgindo ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Gabriel pela ajuda, disponibilidade e paciência inestimável desde o início da confecção deste trabalho.

A Dr^a Vera Lúcia Valente pelo apoio e disponibilização do Laboratório de *Drosophila* da UFRGS para realização do segundo trabalho.

Aos integrantes do grupo de Diversidade Genética Animal: Rafael, Vanusa e Helber pela parceria. E ao Adriano e o Tiago por toda a ajuda sempre.

A minha amiga, colega e dupla de tantas horas Thays, que como prometido ganhou o espaço só dela nestes agradecimentos. Com certeza somos uma dupla e tanto.

Ao Leandro por toda ajuda no início no laboratório, fostes um ótimo tutor e amigo.

Ao Tarta pelo apoio e parceria constante durante os últimos anos. E por ter tornado esse tempo muito mais agradável e divertido.

Os agradecimentos mais que especiais a minha família: minha mãe, meu padrasto e meu pai pelo amor e presença constante em minha vida mesmo de longe.

A minha mãe por ter me ensinado a “teimosia” de persistir nos meus objetivos mais do que com palavras, com exemplos diários de luta durante todos esses anos em todas as dificuldades que enfrentamos. Ao meu pai pelo pensamento positivo sempre e por ter me auxiliado a manter o foco muitas vezes. Ao meu padrasto pelo apoio e carinho sempre.

“...Que bom que deu tudo certo!”

Tangos e Tragédias

RESUMO

Os elementos transponíveis (ETs) são sequências de DNA encontradas repetidamente nos genomas, que possuem como particularidade a capacidade de mudarem de posição tanto dentro como entre genomas. São classificados de acordo com suas moléculas intermediárias de transposição em classe I (RNA) ou classe II (DNA). São encontrados no genoma hospedeiro nas formas autônomas, que possuem toda a estrutura para sua transposição, e não- autônomas (defectivas) que não a possuem. As aves formam um grupo de animais vertebrados bastante diversificado e amplamente distribuído, porém ainda pouco estudado em relação a genomas e ETs. Dentre os pouco elementos anotados no genoma de *Gallus gallus* (galinha) está o *galluhop*, classificado como sendo de classe II e pertencente à família *mariner*, provavelmente defeutivo e inativo. Este trabalho tem por objetivo contribuir para o conhecimento sobre a presença, dinâmica e evolução de elementos transponíveis (*mariner-like*) nos genomas das aves, identificando e analisando o elemento *galluhop* nos genomas sequenciados de aves, por meio de abordagens *in silico*; e identificando elementos *mariner-like* em aves passeriformes do bioma Pampa. No primeiro trabalho, foram encontradas cópias do elemento *galluhop* em *Buceros rhinoceros*, *Coturnix japonica*, *Colinus virginianus*, *Lyrurus tetrrix* e *Meleagris gallopavo*. Nas primeiras quatro espécies foram analisadas cópias do elemento quanto à quantidade, tamanho, identidade, existência de repetições terminais e atividade do elemento através da existência de uma fase aberta de leitura (ORF). Com as espécies identificadas com *galluhop* reconstruiu-se a relação filogenética do elemento com outros elementos da família *mariner*. As primeiras análises indicaram se tratar de um elemento não autônomo, possivelmente MITE(Miniature Inverted-repeat Transposable Elements) devido as suas características, e a filogenia mostrou se tratar de um elemento *mariner* de uma subfamília ainda não descrita. No segundo trabalho foi identificada, por *dot blot*, a presença de elementos *mariner-like* em algumas famílias de aves existentes no bioma Pampa, projetando uma distribuição mais ampla dessa família de elementos.

Palavras – chave: *galluhop*, *mariner-like*, elementos transponíveis, aves

ABSTRACT

The transposable elements (TEs) are DNA sequences repeatedly found in the genomes, which have the particularity the ability to change position both within and between genomes. They are classified according to their intermediary molecules transposition into class I (RNA) or class II (DNA). They are found in the host genome in autonomous forms, which have the whole structure for their transposition, and non-autonomous (defective) not autonomous transposition. The birds form a vertebrate group rather diverse and widely distributed, but still poor studied in relation to genomes and TEs. Among the some elements annotated the genome of *Gallus gallus* (chicken) is the *galluhop*, classified as Class II and belongs to the *mariner* family, probably defective and inactive. This work aims to contribute to the knowledge about the presence, dynamics and evolution of transposable elements (*mariner-like*) at bird genomes, identifying and analyzing the *galluhop* element in sequenced genomes of birds, through approaches *in silico*; and identifying *mariner-like* elements in Passeriformes birds of the Pampa biome. In the first study, the *galluhop* element copies were found in *Buceros rhinoceros*, *Coturnix japonica*, *Colinus virginianus*, *Meleagris gallopavo* and *Lyrurus tetrrix*. In the first four species were examined copies of the element to the quantity, size, identity, presence and activity terminal repeats of the copies and activity of the element by the provision of ORF. With the species identified with *galluhop* sequences was reconstructed the phylogeny respect to the element with the *mariner* family. The first analysis indicated it is a not autonomous element, possibly MITE due to their characteristics and phylogeny showed it is a *mariner* element of a subfamily still not described. In the second study was identified by dot blot, the presence of *mariner-like* elements in some families of birds occurring in the Pampa biome, projecting a wider distribution of this family of elements.

Keywords: *galluhop*, *mariner-like*, transposable elements, birds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filogenia das Aves	28
Figura 2: Fluxograma da metodologia utilizada para realizar as análises	30
Figura 3: Representação gráfica da conservação (consenso) das TIRs 5' e 3' dos elementos <i>galluhop</i> de cada genoma analisado.....	31
Figura 4: Filogenia de <i>galluhop</i> consenso de <i>G. gallus</i> baseada na transposase....	33
Figura 5: Filogenia de <i>galluhop</i> baseada nas transposases	35
Figura 6: Varredura por <i>dot blot</i> para a presença de <i>mariner</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genomas de aves analisados e identificação de acesso.....	29
Tabela 2: Genomas de aves que possuem <i>galluhop</i> e as características das cópias	29
Tabela 3: Tamanho das cópias de <i>galluhop</i> nos genomas.....	32
Tabela 4: Identidade mínima e máxima encontrada entre as cópias.....	32
Tabela 5: genomas disponíveis de aves analisados para <i>galluhop</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST – basic local alignment search tool

DNA- Ácido Desoxiribonucléico

ET – Elemento Transponível

kb- kilobase

MITE – miniature inverted-repeat transposable element

ORF- Fase aberta de leitura

pb- pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA- Ácido Ribonucléico

TIR- Repetição Terminal Invertida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3. PRIMEIRO MANUSCRITO	16
3.1 Resumo	16
3.2 Abstract.....	17
3.3 Introdução.....	18
3.4 Material e métodos.....	21
3.5 Resultados	23
3.6 Discussão	25
3.7 Conclusão	27
3.8 Figuras do primeiro manuscrito	28
4.SEGUNDO MANUSCRITO	35
4.1 Resumo	35
4.2 Abstract.....	36
4.3 Introdução.....	37
4.4 Material e métodos.....	38
4.5 Resultados e discussão.....	40
4.6 Conclusão	41
4.7 Perspectivas	41
4.8 Figuras do segundo manuscrito.....	41
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS	46

1 INTRODUÇÃO GERAL

Elementos transponíveis (ETs) são sequências de DNA que possuem a capacidade de se mobilizar dentro do genoma hospedeiro ou entre genomas (Capy, 1998). Além da mobilidade, estes elementos possuem características que os distinguem do restante do genoma, como: variabilidade na quantidade, tamanho e integridade das cópias dentro e entre hospedeiros; ao se transporem geram duplicação do sítio alvo de inserção; e apresentam polimorfismos dos sítios de inserção (Capy, 1998).

Os elementos transponíveis foram descobertos na década de 40, no estudo dos cromossomos de milho (*Zea mays* L.), pela geneticista Bárbara McClintock, contradizendo os preceitos da época sobre a estabilidade dos genomas (Jones, 2005). Contradizia principalmente a ideia de que todos os genes estavam presentes nos cromossomos de forma linear (Kass & Chomet, 2009). A sua descoberta só foi acreditada depois do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular com a descoberta de transposons em levedura através da clonagem molecular (Jones 2005). Desde então os estudos na área só aumentaram e mostraram a grande diversidade de elementos transponíveis nos mais diversos genomas, podendo constituir a maior parte de DNA repetitivo nos genomas hospedeiros (Capy, 1998).

Devido à grande variedade e quantidade de elementos transponíveis tornou-se necessária uma classificação. A qual consiste em dividi-los em duas classes conforme a molécula intermediária gerada no processo de transposição: Classe I - molécula intermediária de RNA (retrotransposons) e Classe II - de DNA (transposons). E, dentro de cada classe, organizar os elementos de forma similar com a taxonômica levando em consideração as relações estruturais, enzimáticas e similaridade das sequências (Wicker *et al.*, 2007). Os níveis taxonômicos incluem: subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. Subfamílias são definidas por similaridade de sequências de aminoácido e nucleotídica de, no mínimo, 40%. (Robertson & MacLeod, 1993).

Em todos os grupos de vertebrados evidenciou-se a existência de rearranjos genômicos como inserções, deleções, inversões e duplicações mediadas por elementos transponíveis (Böhne *et al.*, 2007). Em consequência destes rearranjos,

de forma geral, os elementos transponíveis são motores de diversidade genômica em vertebrados (Böhne *et al*, 2007). Dada essa importância, os conhecimentos sobre ETs em aves ainda é muito limitado, contudo novos projetos de seqüenciamento de genomas estão possibilitando um novo panorama sobre esse conhecimento (Kordis, 2009).

Com a anotação da fração repetitiva do genoma de *Gallus gallus* foi identificado um elemento de classe II denominado *galluhop*, pertencente a uma superfamília de elementos amplamente distribuída chamada *Tc1-mariner* (Wicker *et al.*, 2005). A família *mariner* foi descrita em *Drosophila mauritiana*, subgrupo da *Drosophila melanogaster* por Jacobson *et al.*, (1986) e, desde então, foi identificada em diversos organismos como vermes, insetos, peixes, répteis e mamíferos (Kordis, 2009). Elementos transponíveis da família *mariner* geralmente são de aproximadamente 1,3 kb de tamanho, possuem repetições terminais invertidas (TIRs) de 28 a 30 pb, uma fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma transposase de, aproximadamente, 345 aminoácidos e duplicação dos nucleotídeos TA no local de inserção. Com base na filogenia das transposases de diversos elementos *mariner-like*, a família *mariner* é dividida em nove subfamílias: *mauritiana*, *capitata*, *cecropia*, *melífera*, *irritans* (*bytmar-like* e *himar-like*), *elegans*, *marmoratus*, *vertumnana* e *drosophila* (Wallau *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- contribuir para o conhecimento sobre a presença, dinâmica e evolução de elementos transponíveis (*mariner-like*) nos genomas das aves.

Objetivos específicos:

- identificar e analisar um elemento da família *mariner*, denominado *galluhop*, nos genomas sequenciados de aves, por meio de abordagens *in silico*;
- identificar elementos *mariner-like* em aves passeriformes do bioma Pampa.

3 PRIMEIRO MANUSCRITO A SER SUBMETIDO

Análise e identificação do elemento *galluhop* (*mariner-like transposon*) nos genomas de aves

3.1 Resumo

Introdução: Os ETs são sequências de DNA encontradas nos genomas, que possuem como particularidade a capacidade de mudarem de posição tanto dentro como entre genomas. Podem ser classificados de acordo com a molécula intermediária para sua transposição classe I (RNA) ou classe II (DNA). São encontrados de duas formas no genoma hospedeiro: os autônomos que possuem toda a estrutura para sua transposição e os não- autônomos (defectivos) que não a possuem. As aves formam um grupo de animais vertebrados bastante diversificado e amplamente distribuído, porém ainda pouco estudado. Dentre os elementos anotados no genoma de *Gallus gallus* está o *galluhop*, classificado como sendo de classe II e pertencente à família *mariner*, provavelmente inativo e defeutivo. Este trabalho teve por objetivo identificar e analisar *in silico* um elemento *mariner-like* – *galluhop* – nos genomas de aves disponíveis nos bancos de dados.

Resultados: *galluhop* foi encontrado também nos genomas de *Buceros rhinoceros*, *Coturnix japonica*, *Colinus virginianus*, *Lyrurus tetrrix* e *Meleagris gallopavo*. Nos quatro primeiros genomas as cópias variaram de 200 a 1500 pb de tamanho, possuíam TIRs imperfeitas e deleções das ORFs, não havendo cópias completas (autônomas) nos genomas. Análises filogenéticas mostraram se tratar de elementos *mariner-like* de uma subfamília ainda não descrita para a família *mariner*.

Conclusão: Conclui-se que as cópias identificadas nos genomas de aves pertencem à família *mariner* em uma subfamília não descrita anteriormente. E a alta degeneração das sequências indica se tratar de um elemento não autônomo possivelmente um MITE dessa família.

Palavras- chave: *galluhop*, família *mariner*, aves

3.2 Abstract

Background: The transposable elements (TEs) are DNA sequences repeatedly found in the genomes, which have the particularity the ability to change position both within and between genomes. They are classified according to their intermediary molecules transposition into class I (RNA) or class II (DNA). They are found in the host genome in autonomous forms, which have the whole structure for their transposition, and non-autonomous (defective) not autonomous transposition. The birds form a vertebrate group rather diverse and widely distributed, but still poor studied in relation to genomes and TEs. Among the some elements annotated the genome of *Gallus gallus* (chicken) is the *galluhop*, classified as Class II and belongs to the *mariner* family, probably defective and inactive. This work aims to contribute to the knowledge about the presence, dynamics and evolution of transposable elements (*mariner-like*) at bird genomes, identifying and analyzing the *galluhop* element in sequenced genomes of birds, through approaches *in silico*.

Results: *galluhop* was also found in *Buceros rhinoceros* genomes, *Coturnix japonica*, *Colinus virginianus*, *Meleagris gallopavo* and *Lyrurus tetrrix*. In the first four genomes copies ranged 200-1500 bp in size, had imperfect TIRs and deletions of ORFs, with no complete copies (autonomous) in the genomes. Phylogenetic analyzes have shown the case of *mariner-like* elements of a subfamily not described for the *mariner* family.

Conclusion: It follows that the copies identified in the genomes of birds belong to a subfamily of *mariner* family not previously described. And high degeneration of the sequences indicates it is a not autonomous element possibly a MITE this family.

Keywords: *galluhop*, família *mariner*, birds

3.3 Introdução

Os elementos transponíveis (ETs) são sequências de DNA geralmente encontradas repetidamente nos genomas, que possuem como particularidade a capacidade de mudarem de posição tanto dentro como entre genomas. De acordo com a molécula intermediária para sua transposição (RNA ou DNA), os ETs podem ser divididos, em duas classes: Classe I (retrotransposon - utilizam um intermediário de RNA na sua mobilização) e Classe II (transposons - utilizam um intermediário de DNA na sua mobilização) (Capy, 1998; Finnegan, 1989). Os ETs também são divididos em outros grupos similar com os taxonômicos como ordem, superfamília, família e subfamília.

É possível encontrar dois tipos de elementos nos genomas: os autônomos, que conseguem produzir as proteínas necessárias para sua própria transposição, e os não autônomos, que são elementos degenerados que não conseguem se transpor autonomamente, mas podem possuir sequências de reconhecimento conservadas suficientemente para suas mobilidades (González & Petrov, 2009; Fattash *et al*, 2013). Um exemplo é o elemento *hoboVA* que mesmo não autônomo sofreu mobilização (Torres *et al.*, 2006). Estes últimos podem dar origem a um grupo particular de ETs denominado MITEs (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements). Os MITEs caracterizam-se por serem elementos heterogêneos, de poucas centenas de pares de base, que possuem TIRs (repetições terminais invertidas) conservadas, muitas alterações internas, nenhuma capacidade codificante e um alto número de cópias (Wicker *et al*, 2007). Os MITEs possivelmente são derivados de elementos autônomos que, devido à inserção no hospedeiro há muito tempo, acabaram acumulando mutações impossibilitando a transposição independente (Wicker *et al*, 2007). Por manterem TIRs conservadas e ainda serem reconhecidos pelas enzimas de transposição, competem com as cópias autônomas pela mobilização. Por isso, podem ser encontrados em quantidade considerável nos genomas e também estabelecerem homologias entre as cópias formando novas subfamílias (Fattash *et al*, 2013; González & Petrov; 2009; Wicker, 2007).

Os ETs possuem uma grande influência na estrutura, função e evolução dos genomas dos seus hospedeiros, porém o conhecimento sobre esses agentes é

bastante limitado no grupo das aves (Kordis, 2009). A classe aves possui duas grandes divisões inicialmente morfológicas que foram corroboradas pelas análises de filogenia molecular (Jarvis *et al.*, 2014; Tuinen, 2009). A primeira separa em duas subclasses: Paleognathae (as aves mais basais e com pouca ou sem capacidade de vôo) e Neognathae que inclui todas as outras aves (Tuinen, 2009). A segunda divide a subclasse das neognathas em dois clados: Galloanserae e Neoaves (Tuinen, 2009). As aves galloanserae são formadas pela ordem Anseriformes (os patos) e a ordem Galliformes (galinhas, perus), sendo esta superordem o elo de ligação entre as paleognathas e as neoaves (Jarvis *et al.*, 2014; Tuinen, 2009). E as neoaves são constituídas de todas as outras aves formando o clado mais diversificado das aves (Figura 1).

Na classe aves observou-se uma tendência na diminuição de DNA repetitivo nos seus genomas, provavelmente ocasionado pela otimização do metabolismo (Wicker *et al.*, 2005). Assim, os elementos de classe II facilmente encontrados em eucariotos (invertebrados ou vertebrados), não são comuns em sauropsidas (aves e répteis) (Kordis, 2009).

Dentre os ETs de DNA (classe II), encontrados nas aves, estão elementos da família *mariner*. Este elemento foi descrito primeiramente em *Drosophila mauritiana*, subgrupo de *Drosophila melanogaster* (Jacobson *et al.*, 1986), é amplamente distribuída nos mais diversos organismos como, vermes, insetos, peixes, répteis e mamíferos. Os elementos *mariner-like* como aqueles encontrados em aves - formam um grupo homogêneo, ou seja, possuem as mesmas características, como: cópias de aproximadamente 1,3 Kb de tamanho, duas repetições terminais invertidas (TIRs) de 28-30 pb que flanqueiam o elemento, uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma transposase de, aproximadamente, 345 aminoácidos (revisão em Wallau *et al.*, 2014). Esta transposase é responsável pela transposição do elemento e duplicação do dinucleotídeo TA no local de inserção. Com base na filogenia da transposase, elementos *mariner-like* podem ser divididos em subfamílias, cujas cópias necessitam ter no mínimo 40% de identidade em nível de aminoácidos e entre 40 e 56% em nível de nucleotídeos (Robertson & MacLeod, 1993).

A partir da análise da fração repetitiva do genoma de *Gallus gallus* por Hillier *et al.* (2004), foi descoberto um novo elemento da família *mariner*, denominado *galluhop*. Este elemento tem, provavelmente, uma única origem de dispersão no genoma de *G. gallus*, como também é um elemento não-autônomo (sem a

capacidade de se transpor sozinho) (Wicker *et al.*, 2005). Possui características de um elemento *mariner-like* como TIRs de 25 pb flanqueando o elemento, uma ORF que codifica para a transposase de aproximadamente 340 aminoácidos e ser um elemento relativamente pequeno de, aproximadamente, 1,2 kb (Wicker *et al.*, 2005).

Galluhop foi identificado também na anotação do genoma de *Meleagris gallopavo* (peru) que, até pouco tempo, era um dos poucos genomas seqüenciados de aves (Rami *et al.*, 2010). No entanto, nos últimos anos, o número de genomas sequenciados (ou em sequenciamento) disponíveis, das mais diversas ordens, aumentou consideravelmente.

O pouco conhecimento sobre elementos transponíveis na classe Aves, somado ao constante aumento e disponibilidade de genomas sequenciados desse grupo, além da importância da presença de ETs nos genomas objetivou esse trabalho a identificar e analisar *in silico* um elemento *mariner-like* – *galluhop* – nos genomas de aves disponíveis nos bancos de dados.

3.4 Material e métodos

3.4.1 Fluxograma do trabalho

A obtenção e análise dos resultados foram desenvolvidas conforme a Figura 2, utilizando duas abordagens diferentes. Uma, foi caracterizar o elemento quanto a sua estrutura e atividade nos genomas onde foi detectado (Tabelas 1 e 2). Outra, consistiu em confirmar o elemento *galluhop* como integrante da família *mariner* e sua posição na filogenia da família.

3.4.2 Obtenção do elemento transponível *galluhop*

A sequência nucleotídica de *galluhop* consenso descrita por Hillier *et al.* (2004) foi obtida através do banco de dados Repbase (Jurka *et al.*, 2005).

3.4.3 Seleção dos genomas de aves analisados

No banco de dados Genbank (NCBI) estavam disponíveis 60 genomas de aves (Tabela 5), até outubro de 2014. Uma seleção de genomas contendo o elemento *galluhop* foi realizada através da ferramenta BLAST *online* disponibilizada pela plataforma *online* do NCBI, nesses 60 genomas, com as especificações default. Os resultados com E-value inferiores a e^{-10} foram considerados significativos.

3.4.4 Sequências de *galluhop* nos genomas de interesse

Foram selecionadas cópias de *galluhop* nos genomas selecionados através do BLAST (Altschul *et al.*, 1990), realizando busca por similaridade de nucleotídeos com as especificações default.

As sequências de *galluhop* encontradas foram alinhadas pela plataforma MAFFT v.7 (Kato & Standley, 2013) e, posteriormente, o alinhamento foi avaliado e refinado manualmente.

3.4.5 Análises das cópias

As cópias do elemento encontradas nos genomas foram analisadas quanto a sua capacidade de transposição através da sua possível codificação para uma transposase e presença/integridade das TIRs. Com o software UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012) delimitou-se a busca por ORFs de, no mínimo 900 pb, condizente com o elemento consenso. As TIRs foram estabelecidas por análise

visual a partir da descrição de Wicker *et al.* (2005), e a conservação das sequências foi estabelecida pela ferramenta Weblogo (Crooks *et al.*, 2004).

Identificou-se, também, a similaridade entre as cópias de cada genoma através da matriz de distâncias com o software UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Estimou-se, ainda, a variação de tamanho das cópias nas escalas de 0 a 500pb, 501 a 1000pb e mais que 1000 pb.

3.4.6 Análise filogenética do elemento *galluhop*

Com o banco de dados de transposases de elementos de diferentes subfamílias de *mariner* (Wallau *et al.*, 2014), sequências protéicas foram alinhadas juntamente com a sequência protéica putativa de *galluho* (obtida a partir da sequência nulceotídica). Utilizando o software PHYML (Guindon & Gascuel, 2003), através do teste de máxima verossimilhança, buscou-se primeiramente estabelecer as relações filogenéticas de *galluhop* consenso e a família *mariner*. Posteriormente, com as mesmas especificações, mas agora com a sequência mais completa de *galluhop* de cada um dos genomas estabeleceu-se as relações dos elementos com a família *mariner*. A análise de suporte de ramo foi realizada com o teste de aproximação de probabilidade aLRT (Anisimova *et al* Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative.)

3.5 Resultados

3.5.1 *Galluhop* em espécies da ordem Galliformes

Dos 60 genomas disponíveis no Genbank (citar Tabela 5 novamente) apenas seis apresentaram o elemento transponível *galluhop* (Tabela 1 e 2). Os genomas de *Colinus virginianus*, *Coturnix japonica*, *Lyrurus tetrrix*, *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo* são representantes da ordem Galliformes na classe Aves. Os Galliformes, juntamente com a ordem anseriformes, constituem o clado Galloanserae, que são as aves mais basais da subclasse das neognathas (Jarvis *et al.*, 2014; Tuinen, 2009), no entanto, inesperadamente, identificou-se cópias do elemento *galluhop* em *Buceros rhinoceros*. A espécie pertence à ordem Bucerotiformes que está incluída em outro clado das neognathas denominado Neoaves conforme pode ser observado na Figura 1), considerado o grupo mais derivado das aves (Jarvis *et al.*, 2014; Tuinen, 2009).

3.5.2 Cópias de *galluhop* em Galliformes

Observou-se uma variação considerável no número de cópias encontradas inicialmente. No genoma de *G. gallus* foram 10.309 cópias e *M. gallopavo* 9.269, quantidade consideravelmente superior quando comparada aos outros genomas que apresentaram no máximo 147 cópias no caso de *C. virginianus* e apenas cinco cópias em *C. japonica* (Tabela 2). Com o refinamento e ajuste manual do alinhamento houve a diminuição do número de cópias em algumas espécies por não possuírem sequências completamente seqüenciadas ou por se tratarem da duplicação de uma mesma cópia (Tabela 2). Devido ao alto número de cópias muito distintas em *G. gallus* e *M. gallopavo* não foi possível concluir, até o fechamento desse trabalho as análises das características funcionais e estruturais.

As cópias identificadas de *galluhop* eram fragmentos que variaram de 200 pb a 1500 pb (Tabela 3), não sendo encontradas cópias completas do elemento nas espécies *C. virginianus*, *C. japonica*, *L. tetrrix* e *B. rhinoceros*. Em *B. rhinoceros* as cópias representam apenas 0,00076% do seu genoma total seqüenciado, em *C. japônica* representam 0,00041% do genoma, em *C. virginianus* representam 0,0072% do genoma e em *L. tetrrix* 0,007% do genoma. Assim, as cópias constituem parte ínfima desses genomas. Dos quatro genomas analisados, os que possuíam

maior número de cópias apresentaram maior variação de identidade entre as cópias (*C. virginianus* e *L. tetrrix*).

As repetições terminais (TIRs) foram identificadas visualmente e consideradas imperfeitas como descritas por Wicker (2005), nas quatro espécies. Evidenciou-se diferenças consideráveis nas TIRs entre as cópias de cada um dos genomas analisados, o que pode ser observado na Figura 3. Em nenhum dos quatro genomas foram identificadas ORFs completas nas sequências do elemento analisado (Tabela 2) devido a deleções internas do mesmo em cada uma das espécies. Visualizou-se a duplicação do sítio de inserção TA nos genomas, como esperado para elementos da superfamília *mariner*.

3.5.3 Posição de *galluhop* na filogenia da família *mariner*

Para estabelecer a relação de *galluhop* e a família *mariner* utilizou-se a sequência consenso da transposase do elemento e das cópias encontradas nos genomas juntamente com transposases de subfamílias de *mariner* fornecidas por Wallau *et al.* (2014). A primeira análise filogenética, somente com *galluhop* consenso de *G. gallus*, revelou que o elemento não se alocou em nenhuma subfamília conhecida de *mariner* indicando possivelmente se tratar de uma nova subfamília (Figura 4). A análise posterior (Figura 5), incluindo agora as sequências protéicas preditas das cópias de *galluhop* presentes nos outros quatro genomas de aves, revelou que as mesmas agrupam-se todas juntas e não se inserem em nenhuma subfamília conhecida de *mariner* como na figura 4, reforçando a ideia de se tratar de uma nova subfamília.

3.6 Discussão

Com a primeira abordagem do trabalho (Figura 2) a busca nos genomas das aves por cópias do elemento *galluhop* resultou em seis genomas selecionados para a presença desse elemento. Três desses genomas - *C. virginianus*, *C. japonica* e *L. tetrrix* - da ordem Galliformes (clado Galloanserae), bem como *G. gallus* e *M. gallopavo*, onde *galluhop* já havia sido encontrado e brevemente descrito (Rami *et al.*, 2010 e Wicker *et al.*, 2005). O sexto genoma - *B. rhinoceros* - no entanto, pertence à ordem dos Bucerotiformes (clado das Neoaves). O elemento não foi

identificado em nenhuma outra ordem das Neoaves e nem em Anseriformes (outra ordem dos galloanserae) (Figura 1). Isso indica que, possivelmente, *galluhop* inseriu-se nos genomas dessas aves após a diversificação das ordens Galliformes e Anseriformes há 65-55 milhões de anos (Jarvis *et al.*, 2014). Segundo Wicker *et al.* (2005) deve ter ocorrido uma única dispersão de *galluhop* em *G. gallus* e este fato reforça a hipótese de inserção pós diversificação de Galliformes e Anseriformes.

Dada a diversificação de Galliformes e Bucerotiformes há 95-85 milhões de anos, aproximadamente (Jarvis *et al.*, 2014), não ter sido encontrado vestígios do elemento em outra ordem intermediária, somado ao fato de serem espécies distantemente relacionadas e, além disso, ter sido identificado um número baixo de cópias com alta porcentagem de identidade entre elas no genoma de *B. rhinoceros* (Tabelas 2 e 4), pode ser indicativo de possível caso de transferência horizontal de *galluhop* dentro da classe Aves. Há casos bem documentados de transferências horizontais entre vertebrados distantemente relacionados, como no caso do transposon *SPIN*, que foi encontrado em cinco linhagens de mamíferos, em um sapo africano e em um lagarto (Gilbert *et al.*, 2009), mas não em espécies/grupos relacionados a estes onde foi identificado, apresentando uma distribuição muito descontínua, com alta similaridade de cópias nos organismos citados anteriormente.

As cópias encontradas em *B. rhinoceros*, *C. japônica*, *C. virginianus* e *L. tetrrix* não eram completas, ou seja, eram cópias degeneradas do elemento *galluhop* devido às deleções/perdas da ORF que codifica a transposase do elemento (Tabelas 2 e 3). Outra característica estrutural e funcional de um elemento é a presença de repetições nas extremidades da sequência, no caso de transposons as repetições são invertidas e necessárias para reconhecimento da transposase, por isso devem ser altamente conservadas (Capy, 1998). Nos quatro genomas analisados foi difícil definir uma sequência consenso de TIRs para cada espécie, devido às alterações nessas cópias, incluindo essas regiões, o gráfico para as TIRs, apresentado na Figura 3, representa os tamanhos e sequências mais usuais de TIRs de *galluhop* em cada espécie/genoma.

As características evidenciadas de *galluhop* nesses genomas como: cópias degeneradas, sem ORF devido a deleções internas, mas com TIRs flanqueando tais cópias, condizem com elementos não autônomos como descrito por González & Petrov (2009). Por sua vez, elementos não autônomos podem dar origem a um grupo de elementos denominados MITEs. Os MITEs são elementos inseridos há

muito tempo nos genomas, de forma que já agregaram tantas alterações (inserções/deleções, rearranjos) que perderam a capacidade de se mobilizarem sozinhos. Além disso, vão se tornando cada vez menos parecidos com seu elemento autônomo de origem, mantendo, porém, conservação nas regiões das TIRs (Wicker *et al*, 2007). Nesse contexto, considerando as características estruturais das cópias de *galluhop* descritas neste trabalho, podemos sugerir que esse elemento, seja, possivelmente, um MITE dos genomas das aves. E, se esse for o caso, nos quatro genomas analisados neste trabalho, parece que esses MITEs estariam num estágio avançado de degeneração, visto que, além do baixo número de cópias, as TIRs também já não apresentam conservação esperada para um MITE ativo, bem como há muita divergência entre as cópias de um mesmo genoma como, por exemplo, em *L. tetrrix* (Tabelas 3 e 4). É importante lembrar que, embora não tenham sido incluídas neste trabalho, análises preliminares apontaram para um alto número de cópias de *galluhop* nos genomas de *G. gallus* e *M. gallopavo*, reforçando uma característica dos MITEs. MITEs originados pela família TC1/*mariner* já foram descritos em plantas, insetos e anfíbios (Fattash *et al.*, 2013; Wallau *et al.*, 2014).

Com a segunda abordagem proposta e esquematizada no fluxograma (Figura 1) foi possível estabelecer as relações evolutivas de *galluhop* com elementos da família *mariner*. Primeiramente, com a transposase putativa de *galluhop* consenso em *G. gallus*, observou-se que a sequência não se inseriu em nenhuma subfamília já descrita de *mariner*, indicando tratar de uma subfamília ainda não descrita (Figura 4). Posteriormente, confirmou-se esse fato quando foi construída outra filogenia inserindo, agora, as possíveis transposases (preditas) das cópias de *galluhop* dos outros quatro genomas. Todas as sequências protéicas dos quatro genomas analisados agruparam-se juntas com a sequência de *G. gallus* e, as mesmas não se agruparam com nenhuma subfamília conhecida, reforçando a ideia de pertencerem a uma nova subfamília de *mariner* (Figura 5).

3.7 Conclusão

Com este trabalho conclui-se que o elemento *galluhop* está presente em seis genomas de aves, sendo apenas em *B. rhinoceros* uma ocorrência em uma espécie mais derivada das classes das aves. As cópias encontradas em *B. rhinoceros*, *C. japonica*, *C. virginianus*, *L. tetrrix* são incompletas, degeneradas e com sinais de

perda da conservação das TIRs. Tratando assim possivelmente de um elemento MITE ou até mesmo se encaminhando para ser completamente inativo. Os dados obtidos neste trabalho SUGEREM, também, que *galluhop* constitui uma subfamília ainda não descrita de *mariner*.

3.8 Figuras do primeiro manuscrito

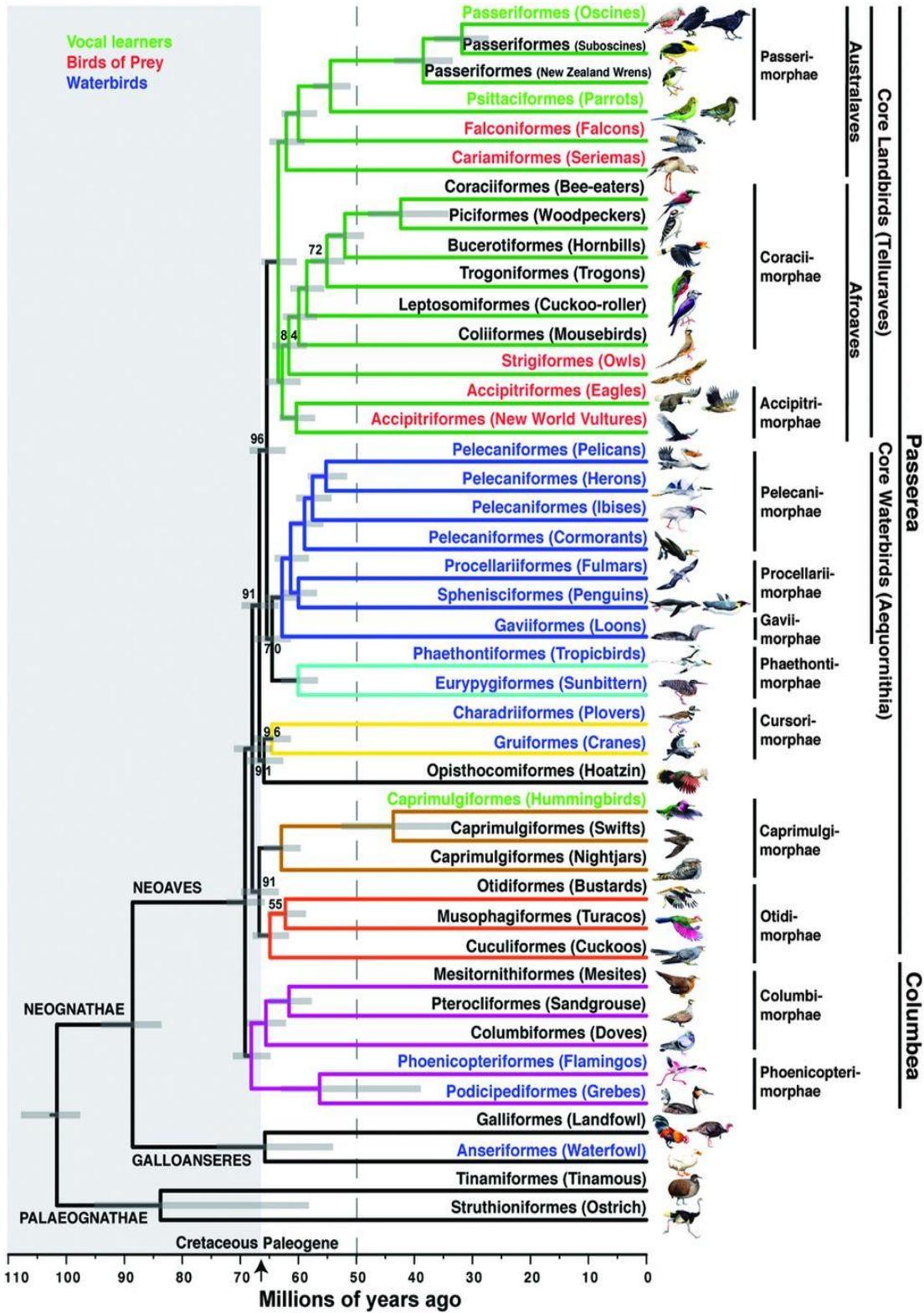


Figura 1: Filogenia das Aves. Filogenia das aves em escala genômica, retirado de Jarvis *et al*, 2014 (Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds).

Tabela 1: Genomas de aves analisados e identificação de acesso

Espécie	Identificação	GenBank Assembly ID
<i>Buceros rhinoceros</i>	32403	GCA_000710305.1 (latest)
<i>Colinus virginianus</i>	12817	GCA_000599465.1 (latest)
<i>Coturnix japonica</i>	113	GCA_000511605.1 (latest)
<i>Gallus gallus</i>	111	GCA_000002315.2 (latest)
<i>Lyrurus tetrix</i>	31278	GCA_000586395.1 (latest)
<i>Meleagris gallopavo</i>	112	GCA_000146605.2 (latest)

Tabela 2: Genomas de aves que possuem *galluhop* e as características das cópias

Espécie	Nome popular	Tamanho Megabase	Sexo	Nº de cópias Iniciais	Nº de cópias pós/análise	ORFs
<i>Buceros rhinoceros</i>	Calau-rinoceronte	1065.78	Macho	14	14	Não tem
<i>Colinus virginianus</i>	Perdiz-da-Virgínia	1171.86	Fêmea	147	99	Não tem
<i>Coturnix japônica</i>	Codorna japonesa	531.96	___*	5	4	Não tem
<i>Gallus gallus</i>	Galo	1046.93	Fêmea	10309	___**	___**
<i>Lyrurus tetrix</i>	Galo-lira	657.025	___*	96	96	Não tem
<i>Meleagris gallopavo</i>	Peru	1061.82	Fêmea	9269	___**	___**

*Estes dados não foram disponibilizados ** Análises ainda não concluídas

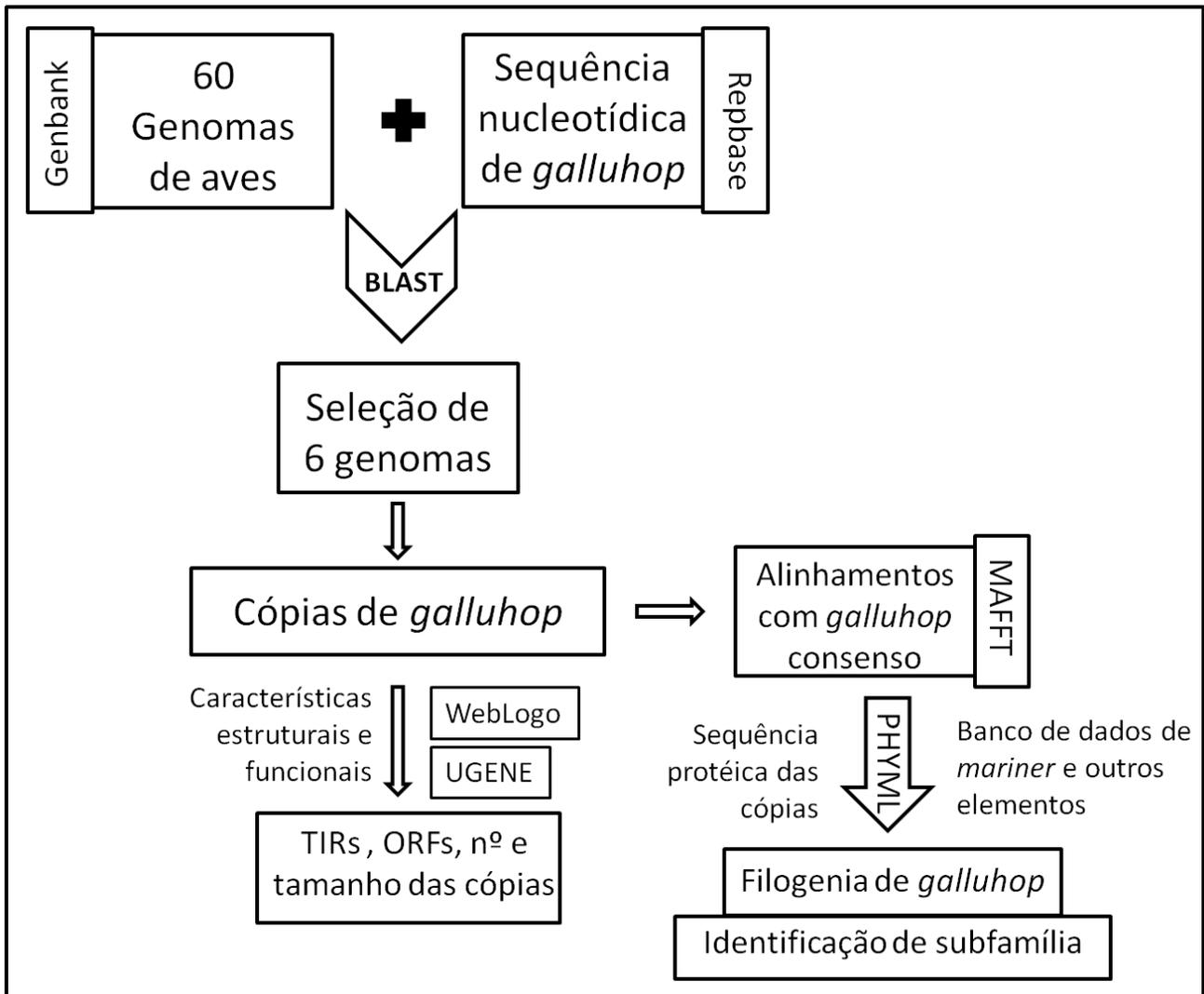


Figura 2: Fluxograma da metodologia utilizada para realizar as análises. Fluxograma das etapas, software, ferramentas e análises desenvolvidas no presente trabalho.

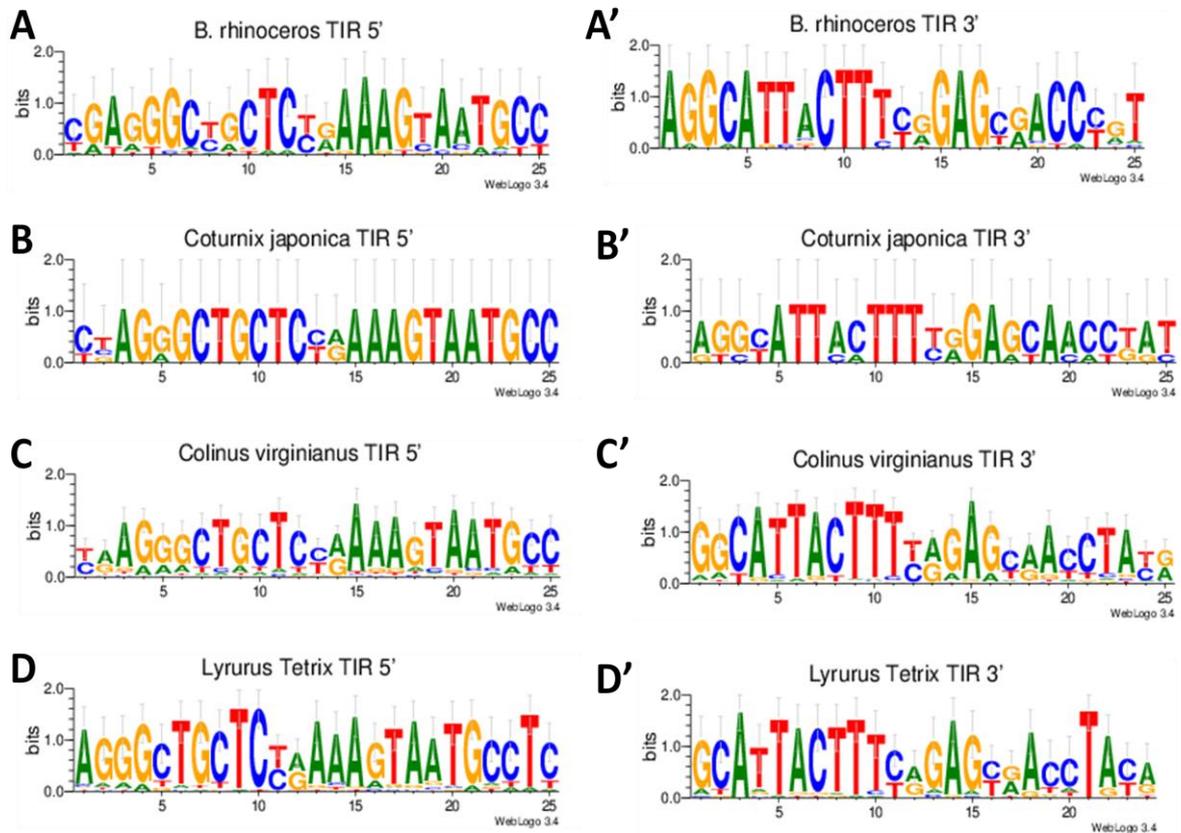


Figura 3: Representação gráfica da conservação (consenso) das TIRs 5' e 3' dos elementos *galluhop* de cada genoma analisado. A e A' - TIRs de *B. rhinoceros*, 5' e 3', respectivamente; B e B' - TIRs de *C. japonica*, 5' e 3', respectivamente; C e C' - TIRs de *C. virginianus*, 5' e 3', respectivamente; D e D' TIRs de *L. tetrix*, 5' e 3', respectivamente.

Tabela 3: Tamanho das cópias de *galluhop* nos genomas

Espécie	Tamanho (pb)		
	Até 500	501 a 1000	> 1000
<i>Buceros rhinoceros</i>	0	14	0
<i>Colinus virginianus</i>	5	69	25
<i>Coturnix japonica</i>	1	3	0
<i>Lyrurus tetrrix</i>	59	34	3

Tabela 4: Identidade mínima e máxima encontrada entre as cópias

Espécie	% identidade entre as cópias	
	% mínima	% máxima
<i>Buceros rhinoceros</i>	57	91
<i>Colinus virginianus</i>	10	86
<i>Coturnix japonica</i>	24	85
<i>Lyrurus tetrrix</i>	10	89

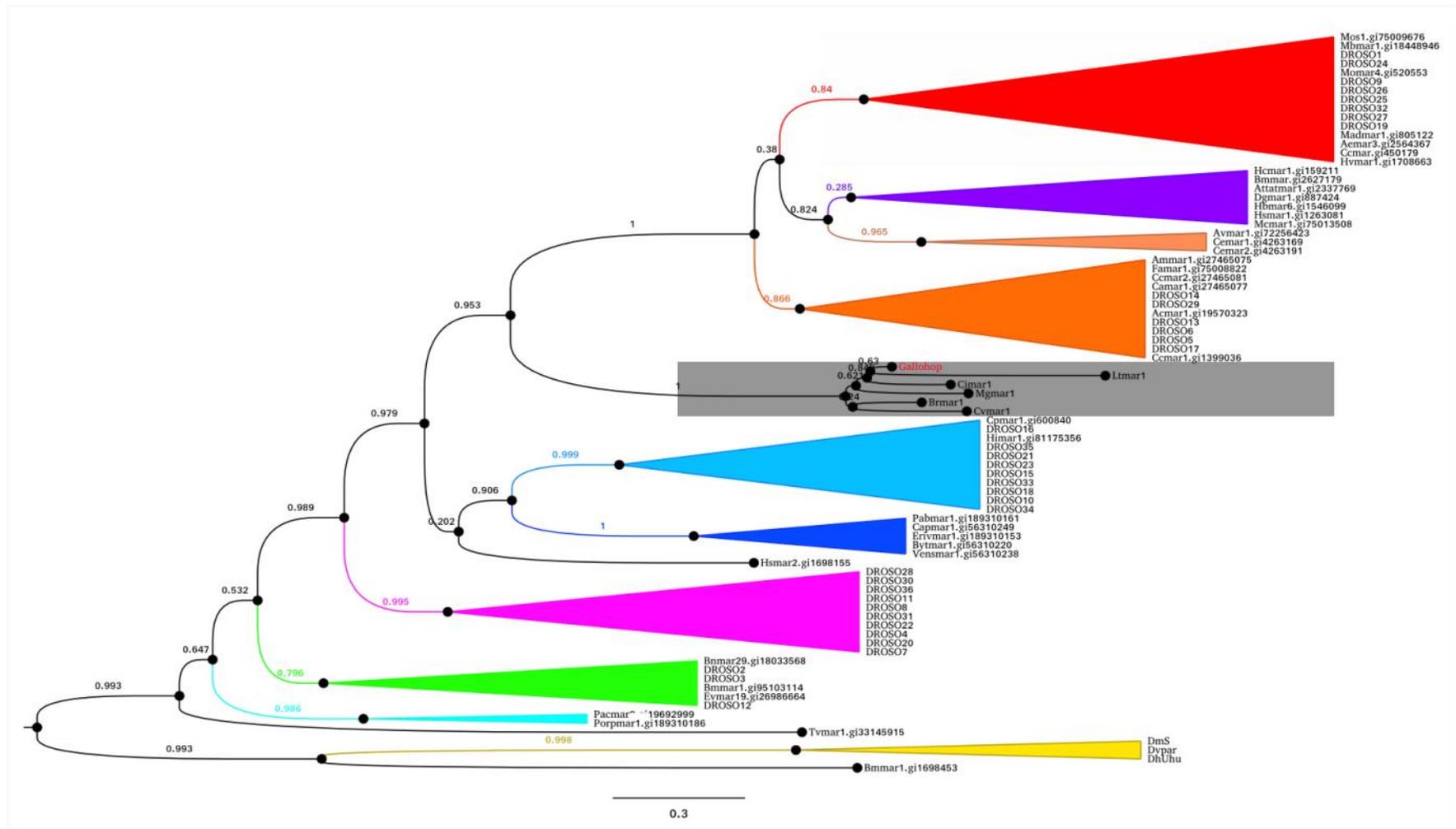


Figura 5: Filogenia de *Gallus gallus* baseada em transposases. Esta filogenia incluiu, além das subfamílias de *mariner* destacadas por cor (no sentido topo-base da árvore): *mauritiana*, *capitata*, *cecropia*, *elegans*, *melifera*, *Gallus*, *irritans* (*bytmar*-like, *himar*-like), *drosophila*, *vertumnana*, *marmoraturus*, também as putativas transposases de *Gallus gallus* em cada um dos genomas analisados (*B. rhinoceros*, *C. japonica*, *C. virginianus*, *L. tetri* e *M. gallopavo*). *G. gallus* foi representado pelo próprio *Gallus* consenso. Todas as sequências agruparam-se juntas indicando se tratar de um mesmo elemento e possivelmente uma nova subfamília.

4 SEGUNDO MANUSCRITO A SER SUBMETIDO

Identificação de elementos *mariner-like* em aves passeriformes do bioma Pampa

4.1 Resumo

Introdução: A avifauna do bioma Pampa em termos de diversidade genética ainda é pouco estudada e investigada em nível genômico, principalmente em relação a marcadores moleculares. Um dos possíveis estudos sobre os genomas diz respeito à existência e caracterização dos elementos transponíveis. Os elementos transponíveis foram analisados nos genomas de algumas aves, como *Gallus gallus*, sendo identificado elementos *mariner-like*. A superfamília *Tc1-mariner*, é amplamente distribuída entre invertebrados e vertebrados, possui três famílias, sendo uma delas a família *mariner*. A família *mariner* possui algumas características que a define, como: tamanho de aproximadamente 1300 pb, duplicação da sequência TA no sítio alvo de inserção, repetições terminais invertidas de, aproximadamente, 25 pb, e uma única ORF que codifica uma transposase. Dada a diversidade das aves Passeriformes no bioma Pampa, os poucos estudos sobre os genomas das mesmas, aliado ao fato de haver relatos da presença de elementos *mariner* em outros grupos de vertebrados, este trabalho tem por objetivo contribuir para o conhecimento sobre a presença, dinâmica e evolução de elementos transponíveis (*mariner-like*) nos genomas das aves, identificando elementos *mariner-like* em aves passeriformes do bioma Pampa.

Resultados: Pela técnica de hibridização por *dot blot*, de 16 espécies analisadas, cinco espécies de três famílias distintas de Passeriformes mostraram sinal positivo para a presença de *mariner*, sendo elas: *Saltator similis* (Thraupidae), *Poospiza nigrorufa* (Emberizidae), *Lathrotricus euleri* (Tyrannidae), *Saltator aurantiirostris* (Thraupidae), *Thraupis bonariensis* (Thraupidae).

Conclusão: Os resultados de hibridização apontam para uma distribuição mais ampla de elementos da família *mariner* no grupo das aves.

Palavras-chave: *mariner*, aves, Passeriformes

4.2 Abstract

Background: Abundances of birds of the Pampa biome in terms of genetic diversity has been poor studied and investigated at the genomic level, especially in relation to molecular markers. One approach to studies genomes possible concerns the existence and characterization of transposable elements. The transposable elements were analyzed in the genomes of some birds, such as *Gallus gallus*, identified mariner-like elements. The *Tc1-mariner* superfamily, is widely distributed among invertebrates and vertebrates, has three families, one of which the *mariner* family. The *mariner* family has some characteristics that defines: like: approximately 1300 bp in length, duplication of the target TA sequence at the insertion site, inverted terminal repeats of approximately 25 bp, and a single ORF encoding a transposase. Given the diversity of Passeriformes birds in the Pampa biome, the few studies on the genomes of the same, together with the fact that there are reports of the presence of *mariner* elements in other vertebrate groups, this study aims to contribute to the knowledge about the presence, dynamics and evolution of transposable elements (*mariner-like*) in the genomes of birds, identifying *mariner-like* elements in Passeriformes birds of the Pampa biome.

Results: Based on dot blot analysis with 16 species, five species of three distinct families of Passeriformes showed positive signal for the presence of *mariner*, namely: *Saltator similis* (Thraupidae), *Poospiza nigrorufa* (Emberizidae), *Lathrotricus euleri* (Tyrannidae) , *Saltator aurantiirostris* (Thraupidae), *Thraupis bonariensis* (Thraupidae).

Conclusions: The hybridization results show a broader distribution of *mariner* family members in the group of birds.

Keywords: *mariner*, birds, Passeriformes

4.3 Introdução

O bioma Pampa representa 63% do território do estado do Rio Grande do Sul (IBGE, 2004), possuindo uma vasta fauna com aproximadamente 500 espécies de aves segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA). Em termos de diversidade genética, no entanto, essa variabilidade ainda é pouco estudada e investigada em nível genômico, principalmente em relação a marcadores moleculares. Os estudos relacionados são sobre o perfil cariotípico como visto em Kretschmer *et al.*(2014) e Da Ponte (2014).

Dentre as diversas espécies encontradas no território do Pampa estão presentes muitas famílias da ordem Passeriformes, como por exemplo: Tiranidae, Emberizidae e Furnariidae. É o grupo mais derivado das aves (Jarvis *et al.*, 2014), com espécies geralmente de pequeno porte, coloridas e canoras.

Um dos possíveis estudos sobre os genomas dos organismos diz respeito à existência e caracterização dos elementos transponíveis nesses genomas. Os elementos transponíveis foram analisados nos genomas de algumas aves, principalmente *Gallus gallus* (Hillier *et al.*, 2004; Wicker *et al.*, 2005), sendo identificados nesses genomas elementos *mariner-like* (Hillier *et al.*, 2004; Rami *et al.*, 2010; Wicker *et al.*, 2005). A superfamília *Tc1-mariner*, amplamente distribuída entre invertebrados e vertebrados, possui três famílias, sendo uma delas a família *mariner* (Capy, 1998). A família *mariner* possui algumas características que a define, como: tamanho de aproximadamente 1300 pb, duplicação da sequência TA no sítio alvo de inserção, repetições terminais invertidas de, aproximadamente, 25 pb, e uma única ORF que codifica uma transposase.

Dada a diversidade das aves Passeriformes no bioma Pampa, os poucos estudos sobre os genomas das mesmas, aliado ao fato de haver relatos da presença de elementos *mariner* em outros grupos de vertebrados, este trabalho propõe uma investigação preliminar sobre a existência de elementos *mariner-like* em aves Passeriformes amostradas do bioma Pampa.

4.4 Material e Métodos

4.4.1 Coleta das amostras

As coletas ocorreram conforme a licença do SISBIO nº 33860-1, código 18127894 data 08/06/2012 e da Comissão de ética no uso de animais-CEUA/UNIPAMPA sob protocolo nº 026/2012. Poderiam ser coletados até cinco exemplares de cada espécie de diferentes famílias da classe Aves por ano, em três diferentes locais (São Gabriel, Dom Pedrito e Santa Maria). As aves foram capturadas através de redes de neblina. As amostras utilizadas foram as coletadas na cidade de São Gabriel.

4.4.2 Extração de DNA genômico

As amostras de sangue e tecidos coletadas foram armazenadas segundo o protocolo de Lahiri & Nurnberger (1991). O DNA genômico foi extraído seguindo o método de fenol-clorofórmio (Sassi *et al.*, 2005) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences).

4.4.3 Hibridização por *Dot blot*

Para a hibridização por *dot blot*, as amostras de DNA genômico (1µg) foram desnaturadas, transferidas para uma membrana de nylon (Hybond-N+; GE Healthcare Biosciences) e fixadas a 80°C por duas horas. Para marcação da sonda e detecção foram utilizados os *kits* de marcação e detecção AlkPhos Direct Labelling and Detection System com CDP-Star (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. Como sonda foi utilizado um fragmento interno do elemento *mariner* de *Drosophila simulans* conforme descrito abaixo.

A hibridização ocorreu lentamente em forno de hibridização, *overnight*, a 55°C. As lavagens de estringência foram desenvolvidas, primeiramente, a 55°C e, após, à temperatura ambiente, com agitação constante. Para a detecção da hibridização, foi utilizado o *kit* de detecção acima referido e revelação em filme de autoradiografia, com exposições de uma hora e *overnight*.

4.4.4 Obtenção da sonda

Para obtenção da sonda, foi amplificado, por PCR, um fragmento interno do elemento *mariner* de *Drosophila simulans*, utilizando os iniciadores Pgex-F (5'

CTGGTTCCGCGTGGATCCCCGATGTCGAGTTTCGTGCCGAA 3') e Pgex-R (5' ACGCGCGAGGCAGATCGTCATTATTCTAAGTATTTGCCGTCGC3') desenhados por Wallau (2014). Estes iniciadores amplificam um fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondente a ORF completa do elemento *mariner* de *D. simulans*. Foram utilizadas aproximadamente 50ng de DNA para uma reação de 50µl contendo 1U de Taq Polimerase (Invitrogen), 5µl de tampão 10X fornecido pelo fabricante, 10mM de cada nucleotídeo, 10 pmol de cada *primer* e 1,5 mM de MgCl₂. As condições de amplificação foram: 97°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O fragmento amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelREd e visualizado em transiluminador de luz UV. Após, esse fragmento foi purificado com o kit de purificação de produto de PCR illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit.

4.5 Resultados e Discussão

Foram amostrados 27 indivíduos de aves (26 passeriformes do Pampa e *G. gallus*), representando nove famílias e 16 espécies diferentes. Houve hibridização da sonda de *mariner* com o DNA genômico das espécies: (1)*Saltator similis* (Thraupidae), (5)*Poospiza nigrorufa* (Emberizidae), (13)*Lathrotricus euleri* (Tyrannidae), (17)*Saltator aurantirostris* (Thraupidae), (20)*Thraupis bonariensis* (Thraupidae), (Figura 6), abrangendo, assim, cinco espécies de três famílias distintas. Dessas, (5)*Poospiza nigrorufa* (Emberizidae), (13)*Lathrotricus euleri* (Tyrannidae) e (20)*Thraupis bonariensis* (Thraupidae) apresentaram sinal mais fraco de hibridização, indicando a presença de sequências altamente divergentes, mas relacionadas a *mariner*.

Considerando o uso de sonda inespecífica específica para elementos *mariner* de *D. simulans*, esses sinais positivos apontam para a presença de elementos relacionados à *mariner*, comumente conhecidos como *mariner-like* nos genomas desses indivíduos, ampliando, dessa forma, a distribuição dessa família de elementos no grupo das aves e relatando pioneiramente a presença dos mesmos em passeriformes do Pampa.

Inesperadamente, no entanto, não houve hibridizações em amostras da mesma espécie como no caso de *P. nigrorufa*, onde haviam mais duas amostras na posição 2 e 7 da figura 6, e, no caso de *L. euleri*, com mais uma amostra na posição 14 da mesma figura. Isso pode ter ocorrido devido a alguns fatores técnicos como diferenças na concentração de DNA fixados na membrana, sensibilidade e eficiência do Kit e reagentes empregados na revelação. Considerando que são todos indivíduos de uma mesma população (Dom Pedrito), descarta-se, em princípio, qualquer variabilidade no número de cópias/intensidade de sinal na hibridização.

O fato de não ter havido hibridização em *G. gallus*, pode ser explicado pela alta divergência entre o elemento da família *mariner* (*galluhop*) descrito nesse genoma (Wicker *et al.*, 2005) com a sonda utilizada (*mariner* de *Drosophila simulans*), embora não possa ser descartada a existência de elementos mais divergentes mas ainda relacionados a essa família.

4.6 Conclusão

Pode-se concluir, com esses dados preliminares, que o elemento *mariner* ou elementos *mariner-like* estão presentes nos genomas de algumas espécies de aves do Pampa, com maior ou menor similaridades. A técnica de hibridização por *dot blot* mostra-se sensível e eficiente para a detecção de elementos transponíveis, mesmo inespecíficos, nos genomas de aves.

4.7 Perspectivas

Devido ao fato de ser uma análise preliminar (e pioneira), abrem-se muitas perspectivas para esse trabalho, como:

- ampliação do número de amostras a serem analisadas por *dot blot*,
- amplificação, por PCR, de elementos/sequências *mariner-like* nas espécies positivas para a presença de *mariner* no dot blot;
- clonagem, sequenciamento, identificação e análises das sequências amplificadas por PCR;
- construção de primers degenerados de *mariner-like* mais específicos para aves.

Também seria bom incluir uma filogenia, ou outra informação que mostre mais ou menos as relações evolutivas entre as aves.

4.8 Figuras do segundo manuscrito

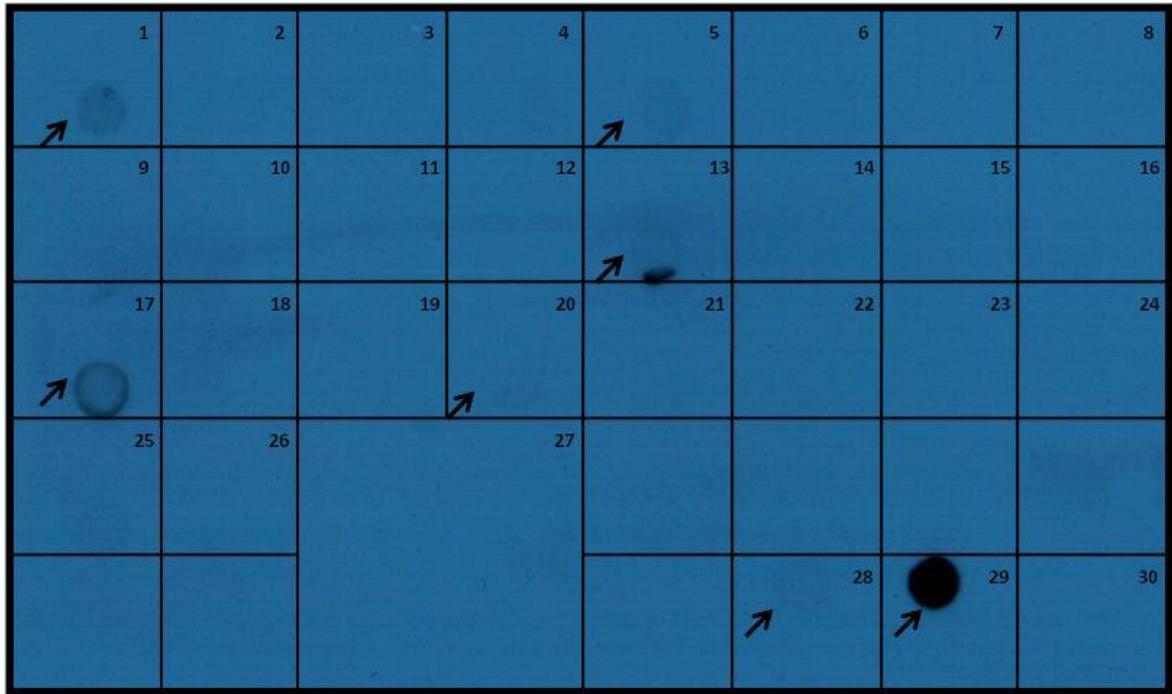


Figura 6: Varredura por *dot blot* para a presença de *mariner*. As famílias analisadas e suas respectivas espécies são as seguintes: 1 - 8) Emberizidae: **1- *Saltator similis***; 2- *Poospiza nigrorufa*; 3- *Zonotrichia capensis*; 4- *Z. capensis*; **5- *P. nigrorufa***; 6- *Z. capensis*; 7- *P. nigrorufa*; 8- *Z. capensis*; 9 - 15) Tyrannidae: 9- *Pitangus sulphuratus*; 10- *P. sulphuratus*; 11- *P. sulphuratus*; 12- *Lathrotriccus euleri*; **13- *L. euleri***; 14- *L. euleri*, 15- *P. sulphuratus*; 16-17 e 19-20) Thraupidae: 16- *Lanio cucullatus*; **17- *Saltator aurantiirostris***; 19- *Paroaria coronata*; **20- *Thraupis bonariensis***; 18) Mimidae: 18- *Mimus saturninus*; 21) Turdidae: 21- *Turdus rufiventris*; 22- *Euscarthmus meloryphus* – Tyrannidae; 23 e 24) Picidae: 23- *Colaptes melanolaemus*; 24- *C. melanolaemus*; 25) Furnaridae: 25- *Syndactyla rufosuperciliata*; 26) Trochilidae: 26- *Hylocharis chrysura*; 27) Phasianidae: 27- *Gallus gallus*. Controles positivos: **28- *D. simulans* -Águas de Lindóia (drosophilidae)**; **29- *D. simulans* -white (drosophilidae)**; 30- *Drosophila paulistorum* (drosophilidae).

REFERÊNCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W *et al.*: **Basic local alignment search tool**. *National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894*. *J Mol Biol* 1990, **215**: 403-10

Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D *et al.*: **Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates**. *Chromosome Research* 2008, **16**:203-215

Capy P: **Dynamics and evolution of transposable elements**. Austin, Texas, U.S.A.: *Lands Bioscience and Chapman & Hall*, 1998. 197

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE **WebLogo: A sequence logo generator**. *Genome Research* 2004, **14**:1188-1190

Da Ponte LN: **Diversidade genética de duas populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes)**. *Trabalho de Conclusão de Curso*, 2014

Fattash I, Rooke R, Wong A *et al.*: **Miniature inverted-repeat transposable elements: discovery, distribution, and activity**. *Genome* 2013, **56**:475-486

Finnegan DJ: **Eukaryotic transposable elements and genome evolution**. *Trends Genet* 1989, **5**:103-107

González J, Petrov D: **MITEs – The Ultimate Parasites**. *Science* 2009, **325**:1352-1353

Gilbert C, Pace JK, Feschotte C: **Horizontal SPINning of transposons**. *Communicative & Integrative Biology* 2009, **2**:2 117-119;

Guindon S, Gascuel O: **A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood**. Copyright Society of Systematic Biologists. *Syst. Biol* 2003, **52(5)**:696–704

Hillier LW, Miller W, Birney *et al.*: **Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution**. *Nature* 2004, **432**:695-716

IBGE: **Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação.** *Acessível em:*
www.ibge.gov.br

Jacobson JN, Medhora MM, Hartl DL: **Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:8684-8688

Jarvis ED, Mirarab S, Aberer AJ *et al*: **Aberer:Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds.** *Science* 2014, **346**:1320-1331

Jones RN: **McClintock's controlling elements: the full story.** *Cytogenetic and Genome Research* 2005, **109**: 90-112

Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, *et al.*: **Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements.** *Cytogenetic and Genome Research* 2005, **110**:462-467

Katoh K, Standley DM: **MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.** *Mol Biol Evol* 2013, **30**:772-780.

Kass LB, Chomet P: **Barbara McClintock.** In: Bennetzen, J. L; Hake, S.C. (Eds.). *The handbook of maize – Genetics and Genomics.* Springer 2009, **3** n. 12

Kretschmer R, de Lima VLC, da Ponte LN *et al.*: **NOR- bearing as a plesiomorphic characteristic in *Mimus saturninus* (Passeriformes Mimidae).** *Biotec. Biodivers* 2014, **5**:140-147

Kordis D: **Transposable Elements in Reptilian and Avian (Sauropsida) genomes.** *Cytogenet Genome Research* 2009, **127**:94-111

Lahiri DK, Nurnberger J I Jr: **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** *Nucleic Acids Research* 1991, **19**: 19

Ministério do Meio Ambiente (MMA): **Bioma Pampa.** *acessível:*
<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. **Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit.** *Bioinformatics* 2012 **28**: 1166-1167

Rami A, Dalloul RA, Long JA, Zimin AV *et al.*: **Multi-Platform Next-Generation Sequencing of the Domestic Turkey (*Meleagris gallopavo*): Genome Assembly and Analysis.** *PLoS Biol* 2010, **8**(9): e1000475.

Robertson HM, MacLeod EG: **Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods.** *Insect Mol Biol* 1993, **2**:125-139.

Sassi AK, Herédia F, Loreto EL, *et al.*: **Transposable elements P and gypsy in natural populations of *Drosophila willistoni*.** *Genetics and Molecular Biology* 2005, **28**:734–739

Torres FP, Fonte LFM, Valente VLS *et al.*: **Mobilization of a *hobo*- related sequence in the genome of *Drosophila simulans*.** *Genética* 2006, **126** :101-110

Tuinen M: **The Timetree of Life (birds).** S. B Hedges and S. Kumar (Oxford University Press) 2009, 409-411

Wallau GL, Capy P, Loreto E., *et al.*: **Genomic landscape and evolutionary dynamics of mariner transposable elements within the *Drosophila* genus.** *BMC genomics* 2014, **15**:727

Wicker T., Robertson JS, Schulze SR *et al.*: **The repetitive landscape of the chicken genome.** *Genome Research* 2005, **15**: 126-136 p

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A *et al.*: **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:973-982

ANEXO DO PRIMEIRO MANUSCRITO

Tabela 5: genomas disponíveis de aves analisados para *galluhop*

NOME	Tam. Mb	ID	GenBank Assembly ID
<i>Acanthisitta chloris</i>	1035.88	32002	GCA_000695815.1 (latest)
<i>Amazona vittata</i>	1175.4	15170	GCA_000332375.1 (latest)
<i>Anas platyrhynchos</i>	1105.05	2793	GCA_000355885.1 (latest)
<i>Apaloderma vittatum</i>	1070.84	32169	GCA_000703405.1 (latest)
<i>Aptenodytes forsteri</i>	1254.35	32061	GCA_000699145.1 (latest)
<i>Aquila chrysaetos</i>	1548.48	32031	GCA_000696035.1 (latest)
<i>Ara macao</i>	1204.7	17770	GCA_000400695.1 (latest)
<i>Balearica pavonina</i>	1127.61	117089	GCA_000709895.1 (latest)
<i>Buceros rhinoceros</i>	1065.78	32403	GCA_000710305.1 (latest)
<i>Calypte anna</i>	1105.68	32060	GCA_000699085.1 (latest)
<i>Caprimulgus carolinensis</i>	1119.68	32067	GCA_000700745.1 (latest)
<i>Cariama cristata</i>	1132.25	31967	GCA_000690535.1 (latest)
<i>Cathartes aura</i>	1152.57	7839	GCA_000699945.1 (latest)
<i>Chaetura pelagica</i>	1119.19	33278	GCA_000747805.1 (latest)
<i>Charadrius vociferus</i>	1219.86	32124	GCA_000708025.2 (latest)
<i>Chlamydotis undulata</i>	1086.57	32036	GCA_000695195.1 (latest)
<i>Colinus virginianus</i>	1171.86	12817	GCA_000599465.1 (latest)
<i>Colius striatus</i>	1075.93	31969	GCA_000690715.1 (latest)
<i>Columba livia</i>	1107.99	10719	GCA_000337935.1 (latest)
<i>Corvus brachyrhynchos</i>	1091.31	32035	GCA_000691975.1 (latest)
<i>Corvus cornix</i>	1049.96	18230	GCA_000738735.1 (latest)
<i>Coturnix japonica</i>	531.96	113	GCA_000511605.1 (latest)
<i>Cuculus canorus</i>	1153.89	32170	GCA_000709325.1 (latest)
<i>Egretta garzetta</i>	1206.48	31706	GCA_000687185.1 (latest)
<i>Eurypyga helias</i>	1088.02	31970	GCA_000690775.1 (latest)
<i>Falco cherrug</i>	1174.81	14103	GCA_000337975.1 (latest)
<i>Falco peregrinus</i>	1171.97	132	GCA_000337955.1 (latest)
<i>Ficedula albicollis</i>	1118.34	11872	GCA_000247815.2 (latest)
<i>Fulmarus glacialis</i>	1141.4	31971	GCA_000690835.1 (latest)
<i>Gallus gallus</i>	1046.93	111	GCA_000002315.2 (latest)
<i>Gavia stellata</i>	1129.68	7634	GCA_000690875.1 (latest)
<i>Geospiza fortis</i>	1065.29	13302	GCA_000277835.1 (latest)
<i>Haliaeetus albicilla</i>	1133.55	31975	GCA_000691405.1 (latest)
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	1178.41	32665	GCA_000737465.1 (latest)
<i>Leptosomus discolor</i>	1136.24	32000	GCA_000691785.1 (latest)
<i>Lyrurus tetrix</i>	657.025	31278	GCA_000586395.1 (latest)
<i>Manacus vitellinus</i>	1145.85	31979	GCA_000692015.2 (latest)
<i>Meleagris gallopavo</i>	1061.82	112	GCA_000146605.2 (latest)
<i>Melospittacus undulatus</i>	1117.37	10765	GCA_000238935.1 (latest)
<i>Merops nubicus</i>	1062.96	31978	GCA_000691845.1 (latest)
<i>Mesitornis unicolor</i>	1087.29	32034	GCA_000695765.1 (latest)
<i>Nestor notabilis</i>	1053.56	33272	GCA_000696875.1 (latest)
<i>Nipponia nippon</i>	1223.85	7967	GCA_000708225.1 (latest)
<i>Opisthocomus hoazin</i>	1203.71	31992	GCA_000692075.1 (latest)

<i>Pelecanus crispus</i>	1160.92	31933	GCA_000687375.1 (latest)
<i>Phaethon lepturus</i>	1152.96	31929	GCA_000687285.1 (latest)
<i>Phalacrocorax carbo</i>	1138.97	32171	GCA_000708925.1 (latest)
<i>Phoenicopterus ruber</i>	1132.18	31928	GCA_000687265.1 (latest)
<i>Picoides pubescens</i>	1167.32	32059	GCA_000699005.1 (latest)
<i>Podiceps cristatus</i>	1134.92	7975	GCA_000699545.1 (latest)
<i>Pseudopodoces humilis</i>	1043	15114	GCA_000331425.1 (latest)
<i>Pterocles gutturalis</i>	1069.32	32063	GCA_000699245.1 (latest)
<i>Pygoscelis adeliae</i>	1216.62	17559	GCA_000699105.1 (latest)
<i>Serinus canaria</i>	1152.1	11251	GCA_000534875.1 (latest)
<i>Struthio camelus</i>	1225.03	122	GCA_000698965.1 (latest)
<i>Taeniopygia guttata</i>	1232.14	367	GCA_000151805.2 (latest)
<i>Tauraco erythrolophus</i>	1155.54	32247	GCA_000709365.1 (latest)
<i>Tinamus guttatus</i>	1047.06	32250	GCA_000705375.2 (latest)
<i>Tyto alba</i>	1120.14	31927	GCA_000687205.1 (latest)
<i>Zonotrichia albicollis</i>	1052.6	17510	GCA_000385455.1 (latest)