

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/46467

IB/ 81688

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia



Horácio Montenegro

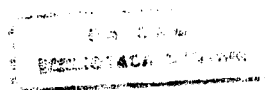
“Sex-Ratio” Citoplasmático em *Drosophila melanogaster*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Horácio Montenegro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia –
UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Animal e Evolução

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Campinas, 2001



| | |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | I B/81688 |
| N.º CHAMADA: | T/UNICAMP |
| | M764s |
| V. | Em. |
| TOMBO | 46467 |
| REC. | 16-392101 |
| C | <input type="checkbox"/> |
| D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 11,00 |
| DATA | 15/09/01 |
| N.º CPD | |

CM00159901-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Montenegro, Horácio
M764s “Sex-ratio” citoplasmático em *Drosophila melanogaster*/
 Horácio Montenegro. --Campinas-SP. [s.n.], 2001.
 059f. Ilus.

Orientador: Louis Bernard Klaczko
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas..
 Instituto de Biologia.

1. Genética. 2. Insetos. 3. Razão sexual. 4. Simbiose. I. Klaczko,
 Louis Bernard. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título.

DATA DE DEFESA: 24/07/2001

Banca Examinadora

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (Orientador)



Prof. Dr. Fábio de Melo Sene



Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Agradecimentos

A Alexandre Afrânio Peixoto, Otávio Henrique Pavan e Domingos da Silva Leite, pela atenciosa e valiosa ajuda no início do trabalho.

A Fábio de Melo Sene, Anete Pereira de Souza e Ana Maria de Azeredo Espin, por participarem de bom-grado da pré-banca e pelas sugestões que certamente melhoraram a qualidade da redação da tese.

Às diversas pessoas que nos ajudam e esquecemos ou não damos importância. Muitas vezes, apenas olhando para trás descobrimos o quanto falta a solidariedade, espontânea e desinteressada, das pessoas – próximas, distantes e até anônimas – que dispendem um pouco de seu tempo e energia para nos auxiliar.

Aos meus ajudantes de campo, Gabriela Mishima Honório, Roberto Donizete Vieira e Louis Bernard, e coletores (Hermes, Alik, Luciane, Galia, Cacá e vários outros, muitos dos quais esqueci). Sua ajuda foi fundamental e, certamente, não haveria tese sem ela.

À professora Vera Nisaka Solferini, pela naturalidade com que me aceitou, um “agregado”, em seu laboratório, e pelas oportunidades que ela me proporcionou. A todo pessoal de seu laboratório, incluindo outros agregados, pelas várias horas agradáveis, pelos cafés e bolos, pelas conversas, sugestões e incentivo, e também pela amizade e companheirismo.

A Sônia, pela inestimável ajuda com a insuportável e insondável burocracia.

Aos meus companheiros de casa – Alexandre, Breila, Erika, Flávio, Márcia, Verônica – pelo apoio e ótima amizade, por compartilhem comida e problemas comigo e, principalmente, pela infinita paciência que demonstraram no dia-a-dia. O convívio e troca mútuos têm sido ricos e gratificantes, e certamente continuará assim por muito tempo.

À Verônica, ao Flávio e ao laboratório da Vera, por providencialmente me emprestarem seus computadores.

À Wilma, Patrícia, dona Cida e seu Laércio, técnicos do laboratório, por toda simpatia, amizade e ajuda no trabalho. E aos meus colegas de laboratório, Cacá, Galia, Hermes, Luciane, Luciana, Marcos e Roberto, que compartilham comigo muitas perguntas e dúvidas, e algumas respostas, tanto a respeito de evolução como do resto da vida. Nestes quatro anos no laboratório, convivi com um grupo de pessoas sem igual, e certamente lembrarei com carinho e saudade desta época, quando olhar para trás.

Ao Vanini, pelas aulas de violão, recheadas de saudosas conversas sobre a beleza e ordem do mundo.

Aos meus pais, Fernando e Fernanda, que nunca deixaram de acreditar em mim, mesmo nos momentos em que minha auto-confiança acabou. Foram meus maiores financiadores, desde a pré-escola até o final de meu mestrado. São as pessoas que melhor me compreendem, mesmo quando não me entendem. Para eles, nenhum agradecimento será suficiente.

Ao Hermes e ao Cacá, pelas sugestões e instigantes discussões desde o começo do trabalho. Seu entusiasmo e interesse, maior do que o meu em alguns momentos, sempre animaram-me a continuar.

Ao Louis Bernard, pela minha formação e orientação. Pela tese, pois foi dele a idéia de coletar naquele dia e naquele mercado, onde tudo começou.

Ao FAEP-UNICAMP, à FAPESP, à CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

As coisas estão longe de ser todas tão tangíveis e dizíveis quanto se nos pretenderia fazer crer; a maior parte dos acontecimentos é inexprimível e ocorre num espaço em que nenhuma palavra nunca pisou.

Rainer Maria Rilke



Luís Fernando Veríssimo

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | iv |
| Índice | vii |
| Resumo | viii |
| Summary | ix |
| 1) Introdução | |
| 1.1) Proporção sexual de Fisher | 1 |
| 1.2) Elementos genéticos egoístas | 2 |
| 1.3) Agentes androcidas | 4 |
| 1.4) Evolução de elementos genéticos egoístas | 7 |
| 1.5) “Sex-ratio” e <i>Drosophila melanogaster</i> | 9 |
| 2) Formato da dissertação e objetivos | 10 |
| 3) Artigos | |
| 3.1) Male-killing selfish cytoplasmic element causes sex-ratio distortion in <i>Drosophila melanogaster</i> . Heredity 85 (5): 465-471. | 11 |
| 3.2) Busca de fatores genéticos para resistência ao agente androcida de <i>Drosophila melanogaster</i> . | 17 |
| 4) Discussão e conclusão geral | 42 |
| 5) Bibliografia | 46 |

Resumo

A proporção sexual é, geralmente, de 1♀: 1♂. Fisher (1930) propôs a primeira explicação baseada em seleção natural para esta proporção. O princípio de Fisher prediz que o sexo mais raro será mais fértil, pois sua contribuição média por indivíduo será maior. Desta forma, a seleção favorecerá os alelos que aumentem a frequência do sexo raro. Quando a proporção chegar a 1♀: 1♂, os dois sexos terão o mesmo valor adaptativo. Agentes androcidas (AA) são endosimbiontes herdados maternalmente que matam os embriões machos. Como consequência, a proporção sexual da progênie das fêmeas infectadas afasta-se de 1♀: 1♂, para um excesso de fêmeas (“sex-ratio” ou SR). Em *Drosophila melanogaster*, este é o primeiro caso de um AA natural.

Uma fêmea de *D. melanogaster* com progênie apenas de fêmeas foi acidentalmente descoberta em uma coleta em mercados de Campinas. Sucessivos cruzamentos com machos Canton-S e transmissão da característica através de injeções de macerados de moscas SR mostraram que o “sex-ratio” é citoplasmático, infeccioso e transmitido maternalmente. Cruzamentos com machos portadores de mutações visíveis e experimentos comparando a viabilidade entre estirpes normais e SR em estágios imaturos do desenvolvimento indicam que mortalidade de embriões machos causa o excesso de fêmeas, caracterizando um novo caso de AA. Os raros machos que aparecem em estirpes SR não transmitem o SR para sua progênie.

Devido à mortalidade de machos, do desvio da razão sexual do equilíbrio de Fisher e da possibilidade de conflitos intragenômicos, espera-se que o hospedeiro evolua para resistência ao AA. Cruzamentos de fêmeas SR com machos de diversas estirpes do campo sugerem haver variação na resistência entre as linhagens, embora nenhuma linhagem tenha expressado resistência total. Experimentos preliminares mostraram que a idade da fêmea influencia a taxa de transmissão do agente, e que a transmissão do AA é menor que a mortalidade de machos.

Summary

The usual sexual proportion is 1♀: 1♂. Fisher (1930) was the first to propose an explanation based on the natural selection for this proportion. Fisher's principle predicts that, if one of the sexes is rarer, it will be more fertile, because its individual means contribution will be greater. Thereafter, selection will favour alleles that increase the rarer sex frequencies. When the proportion reaches 1♀: 1♂, there is no difference in investing differentially in any sex, because they will have the same fitness. Male killing agents (**MK**) are maternally inherited endosymbionts that kill male embryos. Consequently, the sexual proportion of infected females deviates from 1♀: 1♂, departing to a female excess ("sex-ratio" or **SR**). A **MK** instance has never been found before in *Drosophila melanogaster*.

A *D. melanogaster* female producing only female progeny was accidentally discovered in a collection of flies from markets in Campinas. Repeated crosses with Canton-S males and the transmission of the trait using macerates of **SR** flies have shown that the trait is inherited maternally, is cytoplasmic and is infectious. Crosses with strains marked with visible mutations and viability experiments at pre-adult stages of development indicate that the skewed sex ratio results from male mortality before hatching, thus characterising a new **MK** instance. Males do not transmit the trait to their progeny.

Due to the high male mortality, the deviation from Fishers' sexual equilibrium and the possibility of intragenomic conflicts, one expects host evolution towards resistance against the **MK**. Crossing *D. melanogaster* **MK** infected females with males from several field strains suggested the existence of resistance variation between strains. However, not a single strain showed complete resistance. Preliminary experiments showed that female age influence **MK** transmission rate, and that transmission rate is lower than male mortality.

1) Introdução

1.1) Proporção sexual de Fisher

A proporção sexual de $1\text{♀} : 1\text{♂}$ é a mais comumente encontrada na natureza. Por ter sido Fisher o primeiro a propor uma explicação baseada em seleção natural (Fisher, 1930), ela é conhecida como proporção sexual de Fisher. O princípio de Fisher pode ser interpretado da seguinte maneira: em uma população reproduzindo-se sexualmente, metade dos genes vem de cada sexo, independente da frequência dos sexos. Se algum sexo for mais raro, será mais fértil, pois sua contribuição média por indivíduo será maior. Desta forma, a seleção favorecerá os alelos que aumentem a frequência do sexo raro na prole. Quando a proporção chegar a $1\text{♀} : 1\text{♂}$, não fará diferença investir diferentemente em qualquer sexo, pois a seleção é dependente da frequência – quanto maior o desvio para um lado, maior a seleção para o outro. Na verdade, o argumento anterior admite custos iguais entre a produção de um macho ou de uma fêmea. Caso isto não seja verdade, a seleção ocorrerá no sentido de equiparar o investimento entre os sexos.

Alguns pressupostos do princípio de Fisher (postulados pelo próprio Fisher ou por outros autores; revisão em Bull & Charnov, 1988) são:

1. sexos separados.
2. biparentalismo – todo zigoto tem uma mãe e um pai.
3. segregação mendeliana dos alelos que influenciam a proporção sexual.
4. controle parental da proporção sexual, o genótipo de um indivíduo influencia a razão sexual de sua progênie.
5. custos da progênie são aditivos e os recursos para produzi-la, limitados.
6. panmixia numa população infinita sem estruturação.

7. que razões sexuais diferentes entre famílias não estejam correlacionadas com diferenças no valor adaptativo dentro de um sexo.

Se algum destes pressupostos é quebrado, a proporção sexual poderá desviar-se de 1♀:1♂. Por exemplo, em condições em que machos aparentados competem entre si por fêmeas aparentadas (violação do pressuposto 6), a razão sexual desvia-se para um excesso de fêmeas, a frequência final dependerá da intensidade da competição entre os machos (“local mate competition”; Hamilton, 1967).

1.2) Elementos genéticos egoístas

Elementos genéticos egoístas (**EGE**) produzem desvios nas proporções mendelianas, aumentando sua própria frequência e, geralmente, prejudicando seu hospedeiro (Crow, 1988; Werren *et al.*, 1988). Os **EGE** são descobertos frequentemente por acaso, devido a mudanças na razão sexual, taxas de mutação ou padrões de mortalidade. Sua etiologia, mecanismos e efeitos fenotípicos são variados. Existem genes que alteram a segregação meiótica (ou genes de impulso meiótico), tanto autossômicos – por exemplo, “segregation distorter” em *Drosophila melanogaster* (Hartl & Hartung, 1975) – como ligados aos cromossomos sexuais – presentes em muitas espécies de *Drosophila*, como *D. mediopunctata* (Carvalho *et al.*, 1989), *D. quinaria* e *D. recens* (Jaenike, 1996). Outros exemplos de **EGE** são os transposons (Kidwell, 1992), que fazem cópias de si mesmos em vários locais no genoma do hospedeiro, e os genes *Medea* (Smith, 1998).

Elementos citoplasmáticos egoístas (**ECE**) representam um caso especial de **EGE** (Cosmides & Tooby, 1981). Como apenas as fêmeas transmitem os **ECE**, eles sofrem forte seleção para desviar a proporção sexual ou a alocação de recursos em favor das fêmeas. Alguns exemplos de **ECE** são: esterilidade citoplasmática do macho em plantas, causada por mutações mitoncondriais (Saumitou-Laprade *et al.*, 1994), incompatibilidade citoplasmática, causada pela

bactéria *Wolbachia* (Hoffman *et al.*, 1998) e muitos outros endosimbiontes que alteram a proporção sexual de 1♀: 1♂, como agentes androcidas (AA), que matam os machos antes destes atingirem a idade adulta (Williamson & Poulson, 1979; Hurst *et al.*, 1996a).

EGE e ECE são uma fonte de alteração na proporção sexual de Fisher, pois violam pressupostos da teoria (Bull & Charnov, 1988). Genes de impulso meiótico (segregação não mendeliana) e partículas citoplasmáticas herdáveis (segregação não mendeliana e uniparentalismo) podem desviar a proporção esperada para até 100 % de machos ou fêmeas, levando a população à extinção. De fato, progênies de algumas fêmeas coletadas na natureza apresentam total falta de machos – uma característica chamada de “sex-ratio” (SR). Os primeiros casos de SR analisados – *Drosophila obscura* (Gershenson, 1928) e *D. pseudoobscura* (Sturtevant & Dobzhansky, 1936) – eram determinados pelo genótipo paterno e causados por um cromossomo X que provocava impulso meiótico. Posteriormente foram descritos SR herdados maternalmente em diversas espécies de *Drosophila* (Buzzatti-Traverso, 1941; Cavalcanti *et al.*, 1957; e outros). Todos tinham herança citoplasmática e eram causados por agentes androcidas (AA), que agem no estágio de embrião e, em algumas ocorrências, demonstrou-se que eram infecciosos (Malogolowkin & Poulson, 1957). Howard (1942) deparou-se com um exemplo intrigante e complexo no tatuzinho de jardim *Armadillidium vulgare*. Ele interpretou o fenômeno como impulso meiótico dos cromossomos sexuais nas fêmeas, tanto do Z como do W, produzindo proles com excesso de machos e/ou fêmeas. Recentemente, Juchault *et al.* (1992) explicaram a ocorrência como devida a dois fatores SR, um citoplasmático – uma bactéria do gênero *Wolbachia* – e o outro, de origem desconhecida, com transmissão predominante (mas não exclusivamente) materna. Os dois fatores agem como indutores de feminização (IF), e um gene nuclear dominante inibe ambos. Aliás, Cavalcanti *et al.* (1958) já chamavam a atenção para o fato que a ação simultânea de fatores citoplasmáticos e modificadores nucleares pode complicar a

interpretação de resultados. Apenas depois de obter diversas estirpes homozigotas em *D. prosaltans* foi possível encontrar padrões previsíveis e descrever o **SR** observado como resultado de um **ECE** androcida e um gene nuclear recessivo que interrompe a transmissão do **ECE**. Finalmente, indutores de partenogênese (**IP**) nas vespas parasitóides *Trichogramma pretiosum* e *T. deion* também provocam proles somente de fêmeas (Stouthamer & Werren, 1993). Neste caso, o **IP** também é a bactéria *Wolbachia*. Todos os casos acima podem ser atribuídos a elementos genéticos egoístas.

1.3) Agentes androcidas

Fêmeas infectadas por indutores de feminização, indutores de partenogênese ou agentes androcidas têm a prole com excesso de fêmeas, comumente apresentando total falta de machos. Os três elementos são citoplasmáticos e transmitidos apenas por fêmeas. Para que estes elementos mantenham-se em equilíbrio na população, o número de fêmeas infectadas produzidas por geração deve ser igual ao número de fêmeas não infectadas produzidas por geração. Entretanto, fêmeas normais podem ser filhas de fêmeas normais ou de fêmeas infectadas (se a transmissão não for 100% eficiente), e fêmeas infectadas só podem ser filhas de fêmeas infectadas. Como **IP** e **IF** são **ECE** que transformam toda “prole potencial” da fêmea infectada em fêmeas, não há diminuição no tamanho da prole. Apenas em caso de transmissão muito ineficiente ou de efeitos deletérios muito grandes o **ECE** não irá persistir na população. Portanto, para **IP** e **IF** as condições de invasão são pouco restritivas, e espera-se que a frequência de equilíbrio seja alta (Hurst, 1993).

Agentes androcidas, ao contrário, matam metade dos embriões produzidos pelas fêmeas infectadas (os machos). Mesmo com transmissão totalmente eficiente e sem efeitos deletérios no valor adaptativo, o número de fêmeas das proles de fêmeas infectadas é, no máximo, igual ao

número de fêmeas de proles de fêmeas normais. Desta forma, as condições de invasão de um AA são bastante restritivas: apenas nos casos em que a mortalidade dos machos confere alguma vantagem para as fêmeas infectadas sobreviventes, ou se houver transmissão horizontal, existe a chance de o AA manter-se população (Hurst, 1991).

Hurst (1991) propôs a separação entre AA precoces (agem no começo da embriogênese) e AA tardios (agem no final da fase de larva), argumentando que a lógica evolutiva subjacente aos dois fenômenos é completamente diferente. AA precoces são favorecidos por seleção de parentesco. Parentes clonais do elemento suicida localizados nas fêmeas beneficiam-se indiretamente com a morte dos machos, pelo aumento do valor adaptativo destas fêmeas. Este aumento do valor adaptativo pode ser devido à diminuição da competição entre a prole restante, ou devido à diminuição da depressão por endocruzamento (Werren, 1987; Hurst, 1991). A morte dos machos acontece cedo (antes da eclosão dos ovos) para aumentar ao máximo o benefício para as fêmeas sobreviventes. Em AA tardios, a morte dos machos libera uma grande quantidade de AA, que infectam um hospedeiro intermediário. Depois, há transmissão do hospedeiro intermediário para fêmeas não infectadas (Hurst, 1991). A morte dos machos acontece tarde (no último instar larval) para que o AA se reproduza e atinja grande densidade dentro do hospedeiro definitivo, e liberar um grande número de parasitas para aumentar a eficiência de transmissão para o hospedeiro intermediário.

Mais de 100 espécies de mosquitos, abrangendo 15 gêneros (por exemplo, *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*), são infectados por microsporídeos (Andreadis, 1999), que agem como agentes androcidas tardios (Hurst, 1991). Microsporídeos são eucariontes sem mitocôndrias, que vivem em ambientes anóxicos ou, mais frequentemente, são parasitas (Vossbrinck, 1987). O complexo ciclo de vida dos microsporídeos nos mosquitos envolve polimorfismo de desenvolvimento, que resulta em dois tipos de esporos diferentes, tanto morfológica como

funcionalmente. Este polimorfismo depende do sexo da larva de mosquito: em fêmeas, ocorre infecção benigna que resulta em transmissão vertical (da mãe para sua prole). Em larvas de machos, o microsporídeo se multiplica, matando a larva ao final do quarto instar. Os esporos são liberados na água e infectam o hospedeiro intermediário, um copépode aquático (Ordem Crustacea). No copépode, os microsporídeos novamente se multiplicam, matam o hospedeiro e os esporos infectam as larvas de mosquitos. Se a larva infectada for fêmea, o microsporídeo produz a infecção benigna, apresentando transmissão vertical na fêmea adulta (Sweeney *et al.*, 1988; Andreadis, 1999).

Ao contrário, AA precoces parecem ser um fenômeno comum entre artrópodes, ocorrendo em várias espécies de diferentes níveis taxonômicos. Em insetos, já foram descritos em aproximadamente 30 espécies de 5 ordens (Hurst 1991; Ebbert, 1991). Em *Drosophila*, AA precoces foram relatados em dez espécies: *D. bifasciata* (Buzzatti-Traverso, 1941; Magni, 1953; Moriwaki & Kitagawa, 1954), *D. prosaltans* (Cavalcanti *et al.*, 1957), *D. robusta* (Poulson, 1966), *D. borealis* (Carson, 1956), *D. willistoni* e *D. paulistorum* (Malogolowkin, 1958), *D. equinoxialis* (Malogolowkin, 1959), *D. nebulosa* (Poulson, 1963), *D. mercatorum* (Barros, 1949) e *D. roehrae* (Vaz *et al.*, 1998). No grupo *willistoni* o agente causador do SR foi identificado como uma bactéria do gênero *Spiroplasma* (Classe Mollicutes, Ordem Mycoplasmatales), o agente de *D. bifasciata* foi identificado como uma bactéria do gênero *Wolbachia* (Hurst *et al.*, 2000). Apenas transmissão vertical foi observada (Hurst & Majerus, 2000).

Recentemente, técnicas de genética molecular têm sido usadas na caracterização e identificação de bactérias, com enorme sucesso, principalmente pela possibilidade de trabalhar sem a necessidade de se cultivar a linhagem bacteriana (Amann *et al.*, 1995). Basicamente, no caso de AA a estratégia consiste em extrair o DNA de ovários ou ovos do hospedeiro, usar “primers” específicos de bactérias e amplificar através de PCR. O produto obtido pode ser

seqüenciado diretamente ou após clonagem. Com a seqüência, identifica-se a bactéria e desenha-se ou escolhe-se na bibliografia “primers” específicos para o grupo identificado, para testar a associação entre AA e bactéria. Vários AA foram identificados com esta metodologia, e apenas bactérias foram identificadas como causadoras de AA precoces até agora (Hurst & Jiggins, 2000). Na verdade, apenas em dois casos os AA foram cultivados, preenchendo os postulados de Koch: os espiroplasmas chamados de “sex-ratio organisms” (SRO) de *D. willistoni* e espécies próximas (Hackett *et. al.*, 1986), e “son-killer” da vespa parasitóide *Nasonia vitripennis* (Werren *et. al.*, 1986).

1.4) Evolução de elementos genéticos egoístas

Quão comum são os elementos genéticos egoístas? Como surge um tipo particular de elemento? A evolução dos EGE depende de sua taxa de surgimento e de sua capacidade em manterem-se na população, sem serem extintos ou levarem a população à extinção. No entanto, é praticamente impossível prever onde e como um EGE surgirá, assim como qual será o resultado do conflito entre um EGE e seu hospedeiro (Hurst *et al.*, 1996b). Transferências horizontais entre espécies parecem ter bastante importância macroevolutiva na manutenção e diversificação de EGE (Kidwell, 1992; Schilthuizen & Stouthamer, 1997).

Existem diversos modelos e hipóteses para explicar ou prever os padrões apresentados por EGE numa população, depois deles terem surgido. Como os EGE têm diversos mecanismos de ação e efeitos fenotípicos, fazer uma generalização válida para todos os EGE é quase impossível. Quase sempre, EGE estão associados a efeitos deletérios para seus hospedeiros, e a seleção pode atuar em vários níveis para diminuir os efeitos do EGE (Hurst *et al.*, 1996b). Entre os resultados possíveis da interação EGE/hospedeiro estão:

1. Extinção do **EGE** por causa de seus efeitos deletérios, ou fixação de supressores totais ao **EGE**, acabando com o desvio e levando à perda aleatória do **EGE**.

2. Extinção da população (consequentemente do **EGE**) por causa dos efeitos deletérios do **EGE**. Se o desvio nas proporções mendelianas produzido for suficientemente grande, mesmo com efeitos deletérios o **EGE** pode subir de frequência a ponto de extinguir uma população.

3. Equilíbrio estável, por balanço entre o aumento da proporção do **EGE** e seus efeitos deletérios, ou pelo surgimento de supressores parciais do **EGE**.

4. Fixação do **EGE**, quando não surgem supressores e o efeito deletério não é muito grande. Nestes casos, o **EGE** torna-se indetectável.

Nos casos em que o **EGE** causa desvio na razão sexual, existe a possibilidade de a população ser levada à extinção pela falta de um sexo. Na maioria dos casos observados, o **EGE** que causa o desvio tem efeitos deletérios, tanto no caso de cromossomos SR (Carvalho & Vaz, 1999), ou efeitos deletérios e transmissão imperfeita, como no caso de elementos citoplasmáticos (Hurst, 1993). Carvalho & Vaz (1999) e Hurst (1993) sugeriram que isto pode ocorrer pois, quando o **EGE** que causa desvio na proporção sexual não tem efeitos deletérios, sobe de frequência muito rápido – antes do surgimento de modificadores – e fixa-se, extinguindo a população. Ou seja, os casos observados não representam o que realmente acontece na história evolutiva dos **EGE**.

Pensando no caso específico de endosimbiontes citoplasmáticos, por que a relação **ECE**/hospedeiro não evolui para um comensalismo (ou até mutualismo)? Uma das possíveis respostas é que os organismos têm restrições que limitam ou direcionam a trajetória da coevolução (Toft & Karter, 1990). Neste sentido, saber os parâmetros da infecção é fundamental, tanto para prever a dinâmica populacional entre hospedeiro e parasita, como para especular sobre a evolução da simbiose (Dunn *et al.*, 1995). Por exemplo, Turelli (1994), modelando

incompatibilidade citoplasmática para *Drosophila simulans/Wolbachia*, mostra que pode haver seleção no complexo hospedeiro/parasita no sentido de aumentar a susceptibilidade do hospedeiro ou a eficiência do parasita na produção da incompatibilidade citoplasmática. Além disto, o hospedeiro não pode depender fisiologicamente do AA, uma vez que, se o AA tiver uma frequência muito alta, a população pode extinguir-se por falta de machos (Hurst & Jiggins, 2000).

1.5) “Sex-ratio” e *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster é uma das espécies mais estudadas em biologia, sendo um modelo em genética (Rubin, 1988). É uma espécie cosmopolita e urbana. Até agora, não se achou endosimbionte androcida em nenhuma população natural desta espécie (Fitz-Earle & Sakaguchi, 1986; Hurst, 1993).

Nós encontramos o primeiro caso natural de **SR** citoplasmático causado por um endosimbionte androcida descrito em *D. melanogaster*. Em julho de 1997, fizemos uma coleta em mercados de Campinas. Foram fundadas nesta ocasião 43 linhagens isofêmeas de moscas do grupo melanogaster. Para separar *D. simulans* de *D. melanogaster*, a prole foi examinada e as linhagens, identificadas através do arco genital dos machos. Das 43 linhagens, 5 não tiveram prole, 35 eram *D. simulans* e apenas 3, *D. melanogaster*. Uma destas – VFA-11 – produziu apenas fêmeas, entre mais de 80 filhas analisadas. Desde então, o **SR** tem sido mantido no laboratório cruzando fêmeas **SR** com machos de uma estirpe padrão normal (Canton-S).

2) Objetivos e formato da tese

Os objetivos deste trabalho são:

- 1) Determinar o tipo de herança e a causa da alteração da proporção sexual.
- 2) Determinar se há genótipos que confirmam resistência ao **SR**.

A dissertação foi escrita em forma de artigos. Há uma introdução geral, dois artigos com perguntas e experimentos específicos e uma conclusão geral. O primeiro artigo trata da causa do excesso de fêmeas e foi publicado na revista *Heredity*, o segundo cuida da busca por fatores de resistência ao **SR** e deverá ser logo submetido à publicação.

Male-killing selfish cytoplasmic element causes sex-ratio distortion in *Drosophila melanogaster*

HORÁCIO MONTENEGRO†, WILMA N. SOUZA†, DOMINGOS DA SILVA LEITE‡
& LOUIS B. KLACZKO†

†Departamento de Genética e Evolução and ‡Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, CEP 13083–970, São Paulo, Brazil

Sex ratio distortion induced by a male-killing agent has been found to affect *Drosophila melanogaster*. The trait was discovered accidentally in a collection of flies from markets in Campinas, São Paulo State, Brazil. Repeated crosses with Canton-S males (for 15 generations to date) and successful transmission using the injection of macerates of sex ratio flies, have shown that the trait is inherited maternally, is cytoplasmic and is infectious. Crosses with strains marked with the visible mutation *white* and viability experiments at pre-adult stages of development, indicate that the skewed sex ratio results from male mortality before hatching. Males do not transmit the trait to their progeny.

Keywords: cytoplasmic inheritance, sex ratio, Spiroplasma, SRO.

Introduction

Selfish *genetic* elements (SGE) produce departures from Mendelian proportions and increase their own frequencies, often at the expense of host fitness (Werren *et al.*, 1988). Selfish *cytoplasmic* elements (SCE) are a special case of SGE. Since only females transmit SCE, they suffer strong selection to deviate the sex ratio or resource allocation towards females. This is usually accomplished through male sterility in plants (Saumitou-Laprade *et al.*, 1994) and other endosymbionts that alter the sex ratio away from 1♀:1♂, including male killers (Williamson & Poulson, 1979; Hurst, 1993).

Sometimes the progenies of females collected in the wild show an exceptional excess of females — a trait commonly called ‘sex-ratio’ (SR). The first SR cases analysed were determined paternally and produced by driving X chromosomes in *Drosophila -obscura* (Gershenson, 1928) and *D. pseudoobscura* (Sturtevant & Dobzhansky, 1936). Maternally inherited SR traits were described later in several *Drosophila* species (for a review see Hurst, 1993). All were inherited cytoplasmically, as shown by the male killing (MK) at the embryonic stage. In one case, the SR trait was found to be infectious (Malogolowkin & Poulson, 1957). Howard (1942) reported an intriguing and complex picture in *Armadillium vulgare* that he ascribed to the

meiotic drive of the sex chromosomes in females (Z or W drive), which produced broods with an excess of males and/or females. More recently, Juchault *et al.* (1992) explained the situation as two selfish sex-ratio factors, one cytoplasmic and the other one with predominantly, but not exclusive, maternal transmission. Cavalcanti *et al.* (1958) noted that the simultaneous action of cytoplasmic factors and nuclear modifiers could blur interpretation of the results. Thus, only after obtaining several homozygous strains in *D. prosaltans* were these authors able to explain the observed SR in this species as being a consequence of a cytoplasmic male-killer and a recessive nuclear gene which disrupts transmission of the cytoplasmic factor. Moreover, parthenogenesis can also produce all-female broods (Lanier & Oliver, 1966; Stouthamer & Werren, 1993). Thus, if one attempts to explain a newly observed SR in terms of male-killing SCE all other possible causes must be ruled out.

Hurst (1991) proposed a distinction between early and late MK, on the grounds that the evolutionary strategies underlying these two phenomena were completely different. Early male-killers have an advantage in that kin-selection favours clonal relatives of the suicide element located in females whereas with late MK there is a chance of horizontal transmission to uninfected females. In *Drosophila*, early MK agents have been reported in nine species: *D. bifasciata* (Magni, 1953), *D. prosaltans* (Cavalcanti *et al.*, 1958), *D. borealis* (Carson, 1956), *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. nebulosa*,

*Correspondence. E-mail: lbk@unicamp.br

D. robusta (Williamson & Poulson, 1979) and *D. roehrae* (Váz *et al.*, 1998). Only in the *willistoni* group has the causative agent been identified, as a *Spiroplasma* (Class Mollicutes, Order Mycoplasmatales) (Hackett *et al.*, 1986).

So far no male-killing endosymbiont has been found in any natural population of *D. melanogaster* (Fitz-Earle & Sakaguchi, 1986; Hurst, 1993). We report here for the first time the occurrence of a sex-ratio trait in this species which is maternally inherited, infectious and caused by early MK.

Materials and methods

Collection, maintenance and selection of SR strain

In order to perform an experiment not related to sex ratio distortion, we collected adult flies in two markets in Campinas, São Paulo State, Brazil, on 16 July 1997. To set up isofemale lines, the females were placed individually in bottles with standard cornmeal medium, at room temperature. After 7 days, they were etherized to death and placed individually in wells of ELISA plates containing alcohol 70%. The progenies were counted after all adults had hatched. In order to distinguish *D. melanogaster* from its sibling species, *D. simulans*, the offspring were examined and the species separated according to the genital arch of the males. Forty-three lines were set up. Five did not produce offspring; 35 were found to be *D. simulans*; and only three were *D. melanogaster*, one of which — strain VFA-11 — had no males among more than 80 flies examined.

We took two samples of 13 flies each from this strain and crossed them to Canton-S males and to males from another strain (VFA-9). In both cases, no males appeared in the progenies. From then on, all experiments were performed using flies from the VFA-11 × Canton-S cross (hereafter called SR).

Initially, the stocks were maintained through mass transfer of SR females and the addition of Canton-S males. Nevertheless, after a few generations, the male frequency gradually rose from 0% to about 30%. At this point, we started a selection procedure to maintain the SR strain. In the first generation, 14 virgin SR flies were crossed individually to two Canton-S males, after which, at each generation, we chose five females from each of the four most fertile lines and with the most skewed sex ratios (20 females in total). These were crossed individually to two Canton-S males. Females from later broods of the selected lines were subsequently used to start a new generation. From the seventh generation onwards, the total number of selected females varied from 5 to 15, but always with five females per selected line.

Crosses to males with visible mutations

An altered sex ratio may have several aetiologies, including feminization of genetic males, parthenogenesis, male-killing or gametic selection. To rule out the first two hypotheses in the present case we crossed SR females with males from a *white* (recessive X-linked mutation) strain, and back-crossed the daughters to *white* males. If no *white* females appeared in the F_1 feminization was discarded. If the back-cross progeny showed the *white* mutation, parthenogenesis was excluded. However, these crosses cannot differentiate gametic selection from male-killing.

Egg-larva, larva-pupa and pupa-adult viability

The next step was to distinguish between gametic selection — male zygotes not being formed (primary sex ratio) — from the killing (early or late) of male zygotes (secondary sex ratio). To do so, we compared the mortality rates at various developmental stages of normal and SR strains. After collecting eggs and larvae, the egg-larva, larva-pupa and pupa-adult hatch rates were scored. Eggs were collected from slides covered with coloured medium on which the flies had been allowed to oviposit for up to 8 h, when slides were replaced. The eggs were picked just after slide removal, and were maintained at 24°C. Larvae and unhatched eggs were counted 30 h after egg collection. The larvae were collected as described for eggs, but the slides were changed every 24 h: the larvae were then collected after a further 24 h and transferred to small vials containing 10 mL of medium (100 mL distilled water, 4 g agar, 16 g dry yeast and 5 g sugar) with 10 larvae per vial, and maintained at 24°C. Pupae and adults were counted after at least 12 days; the adults were also sexed.

Demonstration of infectivity

Horizontal transfer is a test that can help to link an SR trait to an infectious agent (Ebbert, 1993). Because obligate endosymbionts are often fastidious to culture, thus hindering the fulfilment of Koch's postulates, this test is useful in revealing the nature of the trait at the outset of a study. We therefore used injections of macerated flies to determine whether an infectious agent was the cause of the observed sex ratio condition.

For this, we used a slight modification of the L'Heritier's (1958) method. In the first experiment, a macerate of 100 15–20-d-old SR flies was centrifuged in 1 mL of Waddington's modified *Drosophila* Ringer solution (solution A contains NaCl 37.5 g, CaCl₂ 1.0 g and, KCl 0.5 g in 500 mL of distilled water and solution B contains NaHCO₃ 1.0 g in 500 mL distilled water; the

solutions are autoclaved separately and mixed when needed in a ratio of one part of A, one part of B and eight parts of sterile distilled water) for 15 min at 3000–4500 r.p.m. In the second experiment, 150 flies were macerated. The supernatant, kept on ice, was injected into etherized 1–7-d-old virgin females, from normal Canton-S strains. As a control, a supernatant of Canton-S females, obtained in the same way, was injected into Canton-S females. The macerate was injected at the junction between the thorax and the scutellum. Each recipient fly received approximately 0.1 μ L. Injected females were left to recover for one day in separate vials, after which two or three Canton-S males were added. The vials were changed at intervals ranging from 3 to 7 days, until the fly died or did not produce offspring.

Tests of males

The males that appeared in SR lines were crossed to Canton-S females to establish whether males transmit the sex ratio condition to their broods. We used two controls. In the positive control, SR females, sisters of the males being tested, were crossed to Canton-S males. In the negative control (normal sex ratio), Canton-S females were crossed to Canton-S males. In a few cases, in addition to SR females from the same brood in which males appeared, SR females from a later brood were tested. All crosses were performed as single-pair matings so that the progenies could be scored as single female productions. Pairs were put into small vials with approximately 20 mL of cornmeal medium and were moved to new vials at variable intervals, but always allowing the scoring of at least three broods. If the

progeny had a sex ratio of 3 females: 1 male (or more skewed) it was considered as SR progeny (Sakaguchi & Poulson, 1963). If the progeny started with an even sex ratio and later showed an SR ratio (as defined above), it was considered to be a progressive SR progeny. The remaining cases were considered normal progenies.

Results

Maintenance and selection of SR strain

In order to maintain SR, we carried out a selection procedure for 15 generations, back-crossing the females to Canton-S males at each generation. This resulted in a strain with more than 99.9% of the Canton-S genetic background. Table 1 shows the total progeny in each generation, along with the number of producing females and SR females per generation. To date, 14 571 flies have been counted, with 14 463 females and only 108 males (0.7%). Among 154 individual progenies scored, only one had a normal (1♀:1♂) sex ratio. In addition to the normal strain, males also appeared in 11 SR lines, with the highest male frequency being 15% (36♀, 4♂), always in the first broods (males were absent in later broods). This trend was also observed in other instances in which males appeared.

Crosses to males with visible mutations

Overall, the results from the crosses with *white* males indicated that fertilization was occurring, whereas feminization was not. In the first generation of SR females individually crossed to *white* males, there was neither a single white fly nor a male in the progeny

Table 1 Results from the selection procedure used for sex ratio maintenance

| Generation | ♀ Offspring produced | ♂ Offspring produced | ♀♀ Producing SR progenies | ♀♀ Producing normal progenies |
|------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 1 | 492 | 0 | 8 | 0 |
| 2 | 1569 | 8 | 18 | 0 |
| 3 | 3057 | 0 | 18 | 0 |
| 4 | 3384 | 4 | 20 | 0 |
| 5 | 1302 | 0 | 17 | 0 |
| 6 | 937 | 1 | 16 | 0 |
| 7 | 653 | 0 | 14 | 0 |
| 8 | 832 | 0 | 14 | 0 |
| 9 | 150 | 0 | 5 | 0 |
| 10 | 292 | 10 | 5 | 0 |
| 11 | 605 | 0 | 5 | 0 |
| 12 | 52 | 0 | 2 | 0 |
| 13 | 756 | 0 | 5 | 0 |
| 14 | 160 | 2 | 4 | 0 |
| 15 | 222 | 83 | 3 | 1 |

Table 2 Results of crosses of SR females to males from a *white* strain. In the first generation eight females of the VFA-11 strain (SR) were crossed to *white* males. From the F₁, eight females were backcrossed to *white* males

| F ₁ | | Backcross | |
|---------------------------|---|-----------|--|
| ♀ VFA-11 × ♂ <i>white</i> | ♀ (♀ VFA-11 × ♂ <i>white</i>) × ♂ <i>white</i> | | |
| 170 ♀ + | 400 ♀ + , 425 ♀ <i>white</i> | | |

(Table 2, summarizes the results for 170 flies, with pooling of the progenies). If feminization occurred, one would expect some of the females to be *white*. In the second generation — backcross to *white* males — 825 flies were examined. All were females, with 400 being wild type and 425 *white*, in agreement with the expected 1:1 Mendelian ratio among females. This unequivocally shows that fertilization occurred and that the sex-ratio trait observed is not a result of parthenogenesis.

Viability experiments

The egg-larva viability in the SR strain was half (41.2%) that of the normal strain (82.7%) (Table 3). However, the larva-pupa and pupa-adult viabilities were the same in the two strains (Table 4). The larva-adult viability in the normal strain was 92.8%, while in the SR strain it was 94.5%. These results show that male embryos are dying very early in the development and this is probably the cause of the sex-ratio deviation. Moreover, females seem to be little — or not at all — affected by the killing agent.

Injection experiments

Initially, the injection experiments did not yield encouraging results at first sight. In the first experiment, not a single control fly produced sufficient offspring for comparison with SR injected flies. None of the 13 females that produced enough progeny had overall SR broods. Only one at the very end of its life produced SR broods (a progressive SR fly). The total production did not differ significantly from a 1♀:1♂ sex ratio (780♀, 714♂, $\chi^2 = 2.92$, $P = 0.09$). Because no control remained, only a few tests were performed to account

Table 3 Egg-larva viability in normal (Canton-S) and SR strains

| Strain | Eggs counted | Larvae hatched (% of total) |
|----------|--------------|-----------------------------|
| SR | 153 | 63 (41.2%) |
| Canton-S | 162 | 134 (82.7%) |

Table 4 Larva-pupa and pupa-adult viability in normal and SR strains

| Strain | Larvae tested | Pupae formed (% of larvae) | Adults hatched (% of pupae) |
|----------|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| SR | 90 | 87 (96.7%) | 84♀ and 1♂ (97.7%) |
| Canton-S | 140 | 131 (93.6%) | 72♀ and 58♂ (99.2%) |

for transmissions to subsequent generations. Nevertheless, two injected females — one of them being the one mentioned above — gave origin to lines that eventually became SR. One of the strains was maintained without producing males (more than 98% females) for five generations, after which it was lost. The other has been maintained by the same procedure used in the selection experiment. Currently, this line is in the ninth generation, with skewed progenies (more than 99% females).

In the second experiment all of the lines injected with SR macerated flies and their controls produced normal progenies, except one female in the experimental group. It started with a normal sex ratio and developed into a skewed one [the consecutive counts were 73(♀):63(♂); 64:52; 63:17; 2:0]. In the second generation we tested 47 females of the experimental group and 30 from the controls (data not shown). Only one female — from the experimental group — was SR (36♀:2♂). Using this fly progeny, we established an SR strain that has been kept for eight generations with a consistently skewed sex-ratio (more than 92% females).

Tests of males

The crosses with males that appeared in SR lines vs. Canton-S females did not produce any SR line, and were not significantly different ($\chi^2 = 1.52$, $P = 0.22$) from the sex ratio in the control lines of Canton-S females × Canton-S males. In contrast, 72% of the crosses involving SR females produced SR or progressive SR progenies (Table 5). This shows that only females transmit the SR condition to their progenies.

Discussion

During a collection at markets in Campinas, São Paulo State, Brazil, we found a *D. melanogaster* female that produced highly skewed progeny with an excess of females. This distorted sex ratio has been maintained for 15 generations by outcrossing SR females to males of a normal laboratory strain, showing that the trait is maternally inherited. The maternal inheritance and the transfer of SR by the injection of macerates of SR flies into Canton-S normal flies shows that a selfish cytoplasmic element caused the SR. The results of crosses to

Table 5 Results of male transmission tests (ratios expressed in ♀:♂)

| | SR ♀ | Progressive SR ♀ | Normal ♀ |
|-------------------------|--------------|---------------------|----------------|
| ♀ Canton-S × ♂ Canton-S | 0 | 0 | 21 (3226:3078) |
| ♀ Canton-S × ♂ SR | 0 | 0 | 24 (3127:3118) |
| ♀ SR × ♂ Canton-S | 36 (5558:19) | 5 (809:371) | 16 (2595:2392) |

white males, together with the fact that the hatching rate of SR lines was half of the normal lines, strongly suggests that SR distortion resulted from the early death of male embryos. The present case shares some features with other reports of MK instances: incomplete transmission, occurrence of progressive SR females, which is rarer than reversion to normal females or full transmission (Ebbert, 1993), and early broods, which are more prone to contain males and uninfected females (Ebbert, 1991).

The present finding raises up to 10 the number of *Drosophila* species known to be affected by MK agents. It is possible that other *Drosophila* species may bear them. However, the persistence of MK agents within drosophilids has not yet been well explained. Data are still lacking to support the supposed advantages of resource reallocation, avoidance of inbreeding and horizontal transmission that could result from killing males and compensate incomplete symbiont transmission (Ebbert, 1993; Hurst, 1993).

The nature of the MK agent described here remains to be investigated. *D. melanogaster* was the recipient species at various MK transfer experiments involving spiroplasmas that infect the *willistoni* group (review in Williamson & Poulson, 1979). Whether any such transfers later resulted in a spread to natural populations, has not been investigated. It is tempting to speculate that the androcidal agent of *D. melanogaster* is an escape from any of these experiments.

Several questions arise from the finding of the *D. melanogaster* MK agent. Are the androcidal agents in *D. melanogaster* and in the *D. willistoni* group species the same? If so, was it a natural transmission? Or, is this finding a consequence of the experiments of Poulson and coworkers in the early MK studies? Will the element persist in the population, or will it go extinct?

Acknowledgements

It is a pleasure to acknowledge Dr O. H. Pavan's help with the injection system. Carlos A. C. Andrade and Hermes F. Medeiros gave us insightful suggestions during the execution of this work. We received financial support from: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP-UNICAMP).

References

- CARSON, H. L. 1956. A female-producing strain of *Drosophila borealis* Patterson. *Drosoph. Inf. Serv.*, **30**, 109–110.
- CAVALCANTI, A. G. L., FALCÃO, D. N. AND CASTRO, L. E. 1958. The interaction of nuclear and cytoplasmic factors in the inheritance of the 'sex-ratio' character in *Drosophila prosaltans*. *Univ. Brasil Publ. Fac. Nac. Filos. Série Cient.*, **1**, 1–54.
- EBBERT, M. A. 1991. The interaction phenotype in the *Drosophila willistoni*-spiroplasma symbiosis. *Evolution*, **45**, 971–988.
- EBBERT, M. A. 1993. Endosymbiotic sex ratio distorters in insects and mites. In: Wrensch, D. L. and Ebbert, M. A. (eds) *Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites*, pp. 150–191. Chapman & Hall, New York.
- FITZ-EARLE, M. AND SAKAGUCHI, B. 1986. Sex ratio distortion in populations and its possible role in insect suppression: experimental studies with strains of *Drosophila melanogaster* carrying cytoplasmically-inherited male-killing spiroplasmas. *Jap. J. Genet.*, **61**, 447–460.
- GERSHENSON, S. 1928. A new sex-ratio abnormality in *Drosophila obscura*. *Genetics*, **13**, 488–507.
- HACKETT, K. J., LYNN, D. E., WILLIAMSON, D. L., GINSBERG, A. S. AND WHITCOMB, R. F. 1986. Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio spiroplasma. *Science*, **232**, 1253–1255.
- HOWARD, H. W. 1942. The genetics of *Armadillium vulgare* Latr. II. Studies on the inheritance of monogeny and amphogeny. *J. Genet.*, **44**, 143–159.
- HURST, L. D. 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. *Proc. R. Soc. B*, **244**, 91–99.
- HURST, L. D. 1993. The incidences and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.*, **68**, 121–193.
- JUCHAULT, P., RIGAUD, T. AND MOCQUARD, J. P. 1992. Evolution of sex-determining mechanisms in a wild population of *Armadillium vulgare* Latr. (Crustacea, Isopoda): competition between two feminising parasitic sex factors. *Heredity*, **69**, 382–390.
- LANIER, G. N. AND OLIVER, J. H. JR. 1966. 'Sex-ratio' condition: unusual mechanisms in bark beetles. *Science*, **153**, 208–209.
- L'HERITIER, P. 1958. The hereditary virus of *Drosophila*. *Adv. Virus Res.*, **5**, 195–245.
- MAGNI, G. E. 1953. 'Sex-ratio': a non-Mendelian character in *Drosophila bifasciata*. *Nature*, **4367**, 81.

- MALOGOLOWKIN, C. AND POULSON, D. F. 1957. Infective transfer of maternally inherited abnormal sex-ratio in *Drosophila willistoni*. *Science*, **126**, 32.
- SAKAGUCHI, B. AND POULSON, D. F. 1963. Interspecific transfer of the 'sex-ratio' condition from *Drosophila willistoni* to *D. melanogaster*. *Genetics*, **48**, 841–861.
- SAUMITOU-LAPRADE, P., CUGUEN, J. AND VERNET, P. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. *Trends Ecol. Evol.*, **9**, 431–435.
- STOUTHAMER, R. AND WERREN, J. H. 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Invert. Pathol.*, **61**, 6–9.
- STURTEVANT, A. H. AND DOBZHANSKY, T. 1936. Geographical distribution and cytology of 'sex ratio' in *Drosophila pseudoobscura* and related species. *Genetics*, **21**, 473–490.
- VAZ, S. C., VIBRANOVSKI, M. D. AND CARVALHO, A. B. 1998. Sex-ratio citoplasmático em *Drosophila roehrae*. *Genet. Mol. Biol.*, **21** (Suppl.), 260.
- WERREN, J. H., NUR, U. AND WU, C.-I. 1988. Selfish genetic elements. *Trends Ecol. Evol.*, **3**, 297–302.
- WILLIAMSON, D. L. AND POULSON, D. F. 1979. Sex ratio organisms (spiroplasmas) of *Drosophila*. In: Whitcomb, R. F. and Tully, J. G. (eds) *The Mycoplasmas*, Vol. 3, pp. 175–208. Academic Press, New York.

Busca de fatores genéticos para resistência ao agente androcida de

Drosophila melanogaster

Horácio Montenegro¹ & Louis B. Klaczko²

^{1,2} Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, CEP 13083-970.

E-mails: ¹ horaciom@unicamp.br; ² lbk@unicamp.br

Resumo

Agentes androcidas (AA) são endosimbiontes herdados maternalmente que desviam a razão sexual de fêmeas infectadas matando os embriões machos. Devido à excessiva mortalidade de machos, do desvio da razão sexual do equilíbrio de Fisher e da possibilidade de conflitos intragenômicos, espera-se que o hospedeiro evolua para aumentar sua resistência ao AA. Cruzamentos de fêmeas de *D. melanogaster* infectadas com AA com machos de diversas estirpes do campo sugerem haver variação na resistência entre as linhagens, embora nenhuma linhagem tenha se revelado como totalmente resistente. Experimentos preliminares mostraram que a idade da fêmea tem influência na taxa de transmissão do agente, e que a transmissão do AA é menor do que a mortalidade de machos.

Introdução

Agentes androcidas (AA) são elementos herdados maternalmente que matam os embriões de machos (Hurst, 1991). Sendo transmitidos apenas pelo citoplasma das fêmeas, tais elementos sofrem seleção para aumentar a proporção de fêmeas transmissoras na população (Eberhard,

1980; Cosmides & Tooby, 1981). Como tal desvio não beneficia o hospedeiro, AA são chamados de elementos genéticos egoístas – EGE (Crow, 1988; Werren *et al.*, 1988).

AA precoces, que provocam mortalidade de machos nos primeiros estágios da embriogênese, foram observados em várias espécies de cinco ordens de insetos (Hurst, 1991), e o número de casos relatados vem crescendo rapidamente nos últimos anos (Montenegro *et al.*, 2000; Fialho & Stevens, 2000; Jiggins *et al.*, 2000; Majerus & Majerus, 2000), principalmente por dois fatores: AA têm sido especificamente procurados e as novas técnicas moleculares permitem análise mais acurada e rápida do agente causador. Mesmo os primeiros casos de AA descritos (por exemplo, Buzzatti-Traverso, 1941; Magni, 1953) têm sido retomados e analisados com as técnicas de genética molecular (Hurst *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, demonstrou-se que bactérias causam a mortalidade dos embriões de machos (Hurst *et al.*, 2000; Hurst *et al.*, 1999a, b; Werren *et al.*, 1986).

Teoricamente, AA aumentam de frequência numa população por se beneficiarem indiretamente da morte dos machos (em geral, aumento direto do valor adaptativo de fêmeas infectadas não foi observado). Este benefício indireto pode ocorrer de três maneiras: aumento de recursos para fêmeas infectadas pela morte dos machos, diminuição do endocruzamento e transmissão horizontal para fêmeas não infectadas (Hurst & Majerus, 1993).

AA podem provocar desvios populacionais na razão sexual. Usualmente, a frequência do AA é baixa e o desvio, pequeno, mas significativo (Hurst *et al.*, 1993). Alguns casos, entretanto, apresentam desvios muito grandes, chegando a haver populações com absoluta falta de machos (Jiggins *et al.*, 1998). Nestas populações, um grande número de fêmeas é coletada virgem, ao contrário das populações da mesma espécie com baixa incidência do AA, nas quais as fêmeas são coletadas usualmente já inseminadas. Estas populações sofrem seleção para igualar a proporção sexual (Fisher, 1930), pois o sexo menos frequente tem maior sucesso reprodutivo em relação ao

sexo mais freqüente. Quanto maior o desvio populacional na razão sexual, maior a intensidade de seleção para produzir o sexo menos freqüente, compensando o desvio.

Além de provocarem desvio na razão sexual de 1♀: 1♂, tais elementos matam até metade da progênie dos pais (no entanto, razões ecológicas podem diminuir ou até anular a diminuição da progênie causada pela mortalidade diferencial dos machos. Por exemplo, involuntariamente no laboratório, Counce & Poulson (1966) igualaram a fecundidade de linhagens **SR** e normais, pois a quantidade de recursos oferecida às larvas era restrita, e nas proles **SR** a competição era menor). Sendo assim, há seleção no hospedeiro para diminuir a mortalidade dos machos, além de para compensar o desvio na razão sexual. Ou seja, uma consequência teórica óbvia é a evolução do hospedeiro para resistência ao **AA**.

Se o desvio populacional da razão sexual for muito pequeno, a vantagem para a progênie portadora do **AA** for grande (a ponto de progênies de fêmeas normais e **SR** serem do mesmo tamanho) e o **AA** não tiver efeitos deletérios nas fêmeas, não há decréscimo no valor adaptativo dos pais. Assim, pode parecer que não há seleção para resistência. Porém, na verdade, existe, pois genes não ligados ao **AA** dentro do genoma podem aumentar sua representação anulando o efeito do **AA**.

Para um **AA** em equilíbrio manter-se numa população, o número total de fêmeas infectadas produzidas deve ser igual ao número total de fêmeas não-infectadas produzidas. Werren (1987) elaborou um modelo da dinâmica populacional de elementos extra-cromossômicos (EEC) transmitidos maternalmente. Neste modelo, a frequência p' do EEC é definida por:

$$p' = px_s W\alpha / [px_s W\alpha + (1 - p)x + px_s (1 - \alpha)]$$

Onde:

p = frequência do EEC em fêmeas adultas

α = eficiência de transmissão do EEC

x_s = proporção de filhas produzidas por fêmeas infectadas

x = proporção de filhas produzidas por fêmeas normais

W = valor adaptativo de fêmeas infectadas comparado às fêmeas normais

Consequentemente, a frequência de equilíbrio p^* do EEC é definida por:

$$p^* = [x_s W \alpha - x] / [x_s W \alpha - x + x_s (1 - \alpha)]$$

Ou seja, a dinâmica populacional de um **AA** depende dos efeitos do agente no valor adaptativo das moscas infectadas, da taxa de transmissão e da proporção de filhas produzidas por fêmeas infectadas. A existência ou não de fatores genéticos para resistência tem relevância para a dinâmica populacional do ECE (Werren, 1987; Randerson *et al.*, 2000), pois fatores de resistência diminuem a eficiência média de transmissão do agente, tornando mais restritivas as condições necessárias para que o **AA** mantenha-se na população.

Recentemente, um novo caso de **AA** foi encontrado e descrito (Montenegro *et al.*, 2000) em *Drosophila melanogaster*. Neste trabalho, aprofundamos a análise da simbiose *Drosophila*—parasita, procurando genótipos resistentes à ação deste **AA**. Fizemos cruzamentos de fêmeas **SR** com machos de diversas estirpes do campo, para substituir o genótipo do laboratório e detectar resistência.

Materiais e Métodos

Para procurar fatores genéticos para resistência ao agente androcida, moscas **SR** foram cruzadas com machos de estirpes provenientes do campo. A tabela 1 indica localidade e data de coleta das linhagens. Estas linhagens estão sendo mantidas em laboratório desde a coleta por transferência em massa de moscas para novas garrafas.

Dois experimentos para testar a existência de genótipos resistentes foram realizados: um experimento-piloto, preliminar e menor, com machos de 22 estirpes do campo e duração de uma geração; outro experimento maior, com machos de 68 estirpes isofêmeas provenientes do campo e quatro gerações de duração.

As fêmeas **SR** para a geração parental (**P**) foram obtidas a partir da progênie de um repique de uma única mosca **SR** descendente do experimento de injeção e transferência do **SR**. Esta progênie, cruzada com machos Canton-S, foi repicada para uma nova garrafa de cinco em cinco dias. As fêmeas virgens **P** dos dois experimentos vieram do 4º ou 5º repique deste cruzamento. No primeiro experimento, a linhagem original era da estirpe SRO-39, no segundo, da linhagem XRJ-10. A linhagem SRO-39 é proveniente do primeiro experimento de transferência do **SR** através da injeção de macerados de moscas **SR** em moscas normais, a linhagem XRJ-10 é proveniente do segundo experimento de transferência (Montenegro *et al.*, 2000). Na tabela 2 estão listados alguns dados referentes a estas linhagens desde o momento da fundação do estoque até o presente momento. Do tubo de onde a **P** foi obtida, não apareceram machos em nenhum dos dois experimentos, tampouco dos tubos dos repiques anteriores que foram observados, embora não tenha sido realizada contagem do número de fêmeas.

Montaram-se então linhagens onde sete fêmeas **P** foram cruzadas com dez a doze machos, para cada estirpe proveniente do campo. No primeiro experimento, foi realizada uma transferência das moscas para uma nova garrafa (totalizando dois repiques). Não houve uma estirpe controle neste experimento. No segundo experimento, foram feitas duas transferências para novas garrafas (três repiques), uma após sete dias de realizado o cruzamento, outro após mais sete dias. No vigésimo primeiro dia, as moscas foram descartadas. Como controle, machos Canton-S foram cruzados da mesma maneira com fêmeas **P**. A estirpe Canton-S vem sendo utilizada na manutenção do **SR** no laboratório desde o início, e já provou ser bastante suscetível.

No segundo experimento, foram feitas quatro gerações pois, em um experimento semelhante com *D. willistoni*, Malogolowkin (1958) notou que os machos apareciam apenas a partir da 3ª geração de cruzamento com machos de estirpes resistentes.

Do 2º repique da F₁ – progênie do cruzamento de fêmeas **P** com machos das estirpes do campo – foram coletadas as fêmeas para o cruzamento da segunda geração. As mães da F₃ e F₄ foram coletadas do 3º repique das F₂ e F₃, respectivamente. Estas fêmeas foram cruzadas com machos da mesma estirpe parental. Assim, as fêmeas da F₁ têm 50% do genótipo nuclear das estirpes do campo, as fêmeas da F₂ têm – em média – 75%, as fêmeas da F₃ têm – em média – 87.5% e as da F₄ tem – em média – 93.75% do genótipo do campo.

Com as fêmeas da F₁, dois cruzamentos adicionais foram feitos, um com fêmeas jovens (dentre as primeiras a eclodir das pupas) do primeiro repique; outro com fêmeas jovens do terceiro repique. Nos dois casos, os machos usados foram Canton-S. Em cada caso, uma fêmea de cada estirpe foi cruzada individualmente com dois ou três machos. As fêmeas foram mantidas num tubo com meio de cultura por 7 dias, depois do que foram descartadas.

As fêmeas da prole da estirpe Canton-S do primeiro repique da F₂ foram cruzadas para analisar a eficiência de transmissão do **AA**. As primeiras 59 fêmeas a eclodir foram cruzadas individualmente com dois ou três machos Canton-S. As fêmeas foram mantidas num tubo por cinco dias, depois foram trocadas de tubo, mantidas por mais cinco dias e então descartadas.

Resultados

Os resultados do 1º experimento e das quatro gerações do 2º experimento estão condensados nas figuras 1 e 2, respectivamente. Os histogramas (figura 1) mostram o número de linhagens por classe de porcentagem de machos. As porcentagens estão divididas em classes de 1

%. Os “box-plots” na figura 2 resumem os dados dos 1º, 2º e 3º repiques nas quatro gerações, assim como os totais dos repiques nas quatro gerações.

Considerando apenas a F₁ das linhagens do 2º experimento presentes no 1º experimento, nota-se que a razão sexual é diferente entre os experimentos, sendo maior no 2º experimento (dados agrupados: 9215 ♀, 15 ♂ no 1º experimento; 18996 ♀, 112 ♂ no 2º experimento; $\chi^2 = 25.03$; G. L. = 1; $P < 0.0001$). Este resultado está de acordo com o histórico no laboratório das duas estirpes (SRO-39 e XRJ-10) que originaram as fêmeas P de cada experimento. Utilizando o procedimento de seleção do sex-ratio (Montenegro *et al.*, 2000) a estirpe SRO-39 também apresenta menor porcentagem de machos do que a estirpe XRJ-10, apesar da eficiência de transmissão do SR nas duas estirpes ser igual (tabela 2).

No 2º experimento, inicialmente foi feita uma análise categórica (SAS Institute) no conjunto total dos dados. Esta análise mostrou haver influência da estirpe e geração na proporção de machos, além de haver interação entre estirpe e geração (tabela 3a). A análise prosseguiu separando-se as estirpes por localidade de coleta (Campinas, São José da Coroa Grande, Recife, Rio de Janeiro e outros, englobando Atibaia, Brasília e a linhagem Canton-S). Novamente, efeitos da estirpe, geração e interação entre estirpe e geração foram encontrados em todas localidades (tabela 3b, 3c, 3d, 3e e 3f). Os gráficos da figura 3 ilustram estes efeitos – mostrando a porcentagem de machos por geração em cada linhagem – principalmente a interação entre estirpe e geração. Recife, por possuir um número elevado de linhagens, foi dividido em dois gráficos. Esta interação torna a interpretação dos resultados complicada, pois ela significa que linhagens que numa geração estavam entre as que apresentavam proporções altas de machos, na geração seguinte estavam entre as com menor porcentagem de machos, e vice-versa.

Posteriormente, foram feitos testes de Kruskal-Wallis comparando o 1º, 2º e 3º repiques, assim como o total dos repiques, entre as quatro gerações, mostrando que, para o primeiro

repique e para o total, apenas a F1 e a F2 são iguais entre si; nos segundo e terceiro repiques, as gerações tendem a ser mais parecidas, sendo que no terceiro repique, todas as gerações são iguais entre si (tabela 4). Esta semelhança crescente das porcentagens de machos nos repiques posteriores entre as diferentes linhagens deve-se à diminuição da porcentagem de machos com o aumento da idade da fêmea (figura 2).

Dentro de cada geração, os três repiques foram comparados através de um teste de Friedman (tabela 5). Um resultado bastante consistente é que a maior porcentagem de machos aparece no primeiro repique, diminuindo no segundo e no terceiro, em todas as gerações – sendo que o segundo e terceiro repiques são estatisticamente semelhantes. Os box-plots da figura 2 mostram este resultado para a 1ª, 2ª, 3ª, e 4ª gerações, além de mostrar que as diferenças entre segundo e terceiro repiques são baixas, tanto dentro de cada geração como entre gerações. Isto acontece porque a maioria das estirpes apresenta poucos ou nenhum macho nos segundo e terceiro repiques.

O cruzamento de fêmeas jovens do primeiro e terceiro repique com machos Canton-S mostra que as fêmeas do terceiro repique têm uma taxa de transmissão do **AA** muito maior do que as do primeiro repique, indicando que a idade da mãe tem influência na taxa de transmissão do **AA** para as filhas. O teste exato de Fisher mostra que a diferença é altamente significativa. A proporção de machos é menor na progênie das fêmeas **SR** do terceiro repique do que para as fêmeas **SR** do primeiro repique, indicando, também, maior eficiência de mortalidade de machos nas proles de fêmeas do terceiro repique (tabela 6).

Os cruzamentos para estimar a eficiência de transmissão indicam que a eficiência da mortalidade dos machos é maior do que a eficiência de transmissão. A progênie total da garrafa que forneceu as fêmeas deste cruzamento foi de 354 ♀: 4 ♂. Mas, considerando a razão sexual de 59 ♀: 4 ♂ (a maior eficiência de mortalidade de machos possível, considerando-se a progênie do

cruzamento), a mortalidade de machos teve eficiência de 91.5% (55 mortos em 59, seguindo a expectativa de 1 ♀: 1 ♂). Já a eficiência de transmissão foi de 71.9% (41 fêmeas **SR** produzindo 3463 ♀ e 23 ♂; 16 fêmeas normais produzindo 1468 ♀ e 1393 ♂, não houveram fêmeas com **SR** progressivo). Duas fêmeas não tiveram progênes. O valor do teste exato de Fisher comparando a eficiência de transmissão com a de mortalidade dos machos é $P = 0.003$.

Conclusões e discussão

Em relação à existência de resistência ao **SR**, os resultados são de difícil interpretação. De maneira geral, a proporção de machos sobe da F_1 para a F_3 , mas na F_4 desce abaixo da F_1 . Existe variação na porcentagem de machos, entretanto, a causa de tal variação é um assunto mais complicado. Certamente, existem mais causas de variação na proporção de machos do que apenas resistência genética. A existência de interações entre estirpe e geração, presente em todas localidades, sugere que grande parte desta variação não é genética. O fato da proporção de machos da quarta geração ter diminuído também indica fatores outros que não resistência genética. Parte desta variação continua inexplicada e deve-se provavelmente ao acaso. Variações ao acaso como esta foram encontradas em outros casos de **AA** (Cavalcanti *et al.*, 1958), assim como em indutores de feminização (Rigaud *et al.*, 1999).

Um padrão bastante claro, presente em todas as gerações é o fato de que a proporção de machos é maior no primeiro repique, diminuindo nos repiques subsequentes – na maioria dos casos chegando à absoluta falta de machos. A eficiência de transmissão também apresenta o mesmo padrão: maior eficiência nos repiques posteriores. No entanto, parece que a eficiência de transmissão do **AA** é menor do que a mortalidade de machos. Também pode haver transmissão do agente, mas necessidade de que ele alcance um nível mínimo de densidade para que ocorra mortalidade de machos (Hurst *et al.*, 2000). Estes fatores, considerados conjuntamente, podem

explicar porque na segunda geração aumentou a proporção de machos, pois as fêmeas escolhidas para fazer o cruzamento da F₂ eram do segundo repique da F₁. Se a mortalidade dos machos é mais eficiente do que a transmissão do agente, o aumento desta proporção na terceira geração pode ainda ser um reflexo do cruzamento da segunda geração, apesar de o cruzamento da F₃ ter usado moscas do terceiro repique da F₂ (onde a proporção média de machos foi de 0.19%). As moscas da F₂ e F₃ estavam todas infectadas, mas apenas à medida que as fêmeas envelheceram o AA atingiu a densidade necessária para ocorrer 100% de mortalidade de machos. Na F₄, as fêmeas usadas provavelmente já estavam com alta densidade de AA, resultando em alta mortalidade de machos.

Uma consequência de tal variação temporal na eficiência de transmissão e na mortalidade de machos é que a resistência dependerá do desenho experimental: as mesmas linhagens podem ser ou não resistentes, dependendo se as fêmeas usadas são das primeiras progênes ou de progênes posteriores. Com o desenho experimental usado aqui, não foi encontrada resistência total ao AA. Mas, no campo, a resistência observada talvez já seja suficiente para que o AA não suba de frequência, pois os primeiros dias de vida são os mais importantes para a contribuição para a próxima geração (Birch *et al.*, 1963). Por exemplo, a 25°C, enquanto as mães estivessem pondo os ovos do terceiro repique, a progênie do primeiro repique já teria eclodido das pupas há quatro dias, e estaria pondo ovos também.

Em infecções artificiais de *D. melanogaster*, também existe variação entre estirpes na mortalidade dos machos e eficiência de transmissão (Sakaguchi & Poulson, 1963; Counce & Poulson, 1966). Assim como no presente experimento, tal resistência prepondera no começo da produção de prole da fêmea, à medida que a fêmea envelhece, a resistência desaparece, devido ao aumento de proles SR nas diferentes estirpes. Ainda em acordo com nosso experimento, nestes estudos resistência total não foi observada. Além de nossos resultados serem bastante similares a

estes estudos usando infecções artificiais em *D. melanogaster*, qualitativamente, os resultados são semelhantes à infecção natural nas espécies do grupo willistoni: maior eficiência de transmissão e mortalidade de machos à medida que a fêmea envelhece (Willimson & Poulson, 1979).

Em outro estudo (Yamada *et al.*, 1985), utilizando-se cromossomos marcados, não foram encontrados fatores de resistência nem no 2º nem no 3º cromossomo de cem estirpes do campo de *D. melanogaster*. Este estudo também usou a mesma infecção artificial de um AA, uma bactéria do gênero *Spiroplasma*. Em infecções naturais de *Drosophila*, vários graus de resistência foram observados. Em *D. prosaltans*, um gene recessivo interrompe a transmissão do AA (Cavalcanti *et al.*, 1958). Em *D. willistoni* e *D. paulistorum* a resistência parece ser multigênica (Malogolowkin, 1958).

A eficiência de transmissão é um parâmetro importante nos casos de agentes transmitidos citoplasmaticamente, mas, no caso de AA, é fundamental e tem de ser muito alta, pois a progênie total da fêmea infectada reduz pela metade. Sem aumento no valor adaptativo e com transmissão incompleta, o AA desaparecerá (Werren, 1987). De fato, o aumento no valor adaptativo deve crescer exponencialmente para contrabalançar a perda de eficiência de transmissão (Werren, 1987). As eficiências de transmissão da tabela 2 são uma super-estimativa – pois no procedimento de seleção as fêmeas das progênies posteriores são usadas – e a eficiência do experimento realizado aqui é uma sub-estimativa, pois apenas as primeiras fêmeas da progênie foram testadas. Porém, a transmissão é menor do que 100%, o que indica que deve haver um aumento no valor adaptativo (direto ou indireto) de fêmeas infectadas, ou transmissão horizontal, para que o AA permaneça na população.

No caso da infecção natural de *D. melanogaster*, não existem muitos dados sobre o valor adaptativo das fêmeas infectadas. A viabilidade de larva a adulto é igual entre estirpes normais e SR (Montenegro *et al.*, 2000). Nos outros casos descritos, em uma infecção artificial de um AA

em *D. melanogaster*, foram observados pequenos efeitos deletérios na fertilidade e tempo de sobrevivência das fêmeas, embora não na fecundidade (Counce & Poulson, 1966). Em *D. bifasciata* (infecção natural), não foram observados diferenças entre fêmeas **SR** e normais para tempo até eclosão, tempo para atingir maturidade sexual ou incidência de esterilidade nas fêmeas, mas fêmeas normais produzem mais fêmeas por dia durante sua vida reprodutiva (Ikeda, 1970). Em *D. nebulosa*, fêmeas **SR** atingiam a maturidade sexual pelo menos um dia antes de fêmeas normais (Malogolowkin-Cohen & Rodrigues-Pereira, 1975).

Os efeitos indiretos no valor adaptativo podem ser: aumento da sobrevivência das fêmeas através de realocação de recursos por diminuição da competição ou possibilidade de canibalismo dos ovos de embriões masculinos, diminuição do endocruzamento ou transmissão horizontal para fêmeas não infectadas (Hurst & Majerus, 1993). Em apenas um caso (*Nasonia vitripennis*, uma vespa parasitóide) transmissão horizontal foi observada. Realocação de recursos e diminuição do endocruzamento dependem da ecologia da espécie para serem efetivos, e não está claro se são importantes na manutenção de **AA** em espécies de *Drosophila* (Hurst & Majerus, 1993).

Apesar da dificuldade em se encontrar uma explicação sólida para a manutenção de **AA** em *Drosophila*, nos casos de **AA** em que se fez coletas ao longo do tempo, as frequências dos **AA** se mantiveram constantes nas populações (revisão em Hurst & Jiggins, 2000). As frequências em geral são as mais baixas dentre os **AA** descritos, entre 5-7%, atingindo um máximo de 10%, mas as frequências se mantêm ao longo do tempo (Cavalcanti *et al.*, 1958; Ikeda, 1970; Williamson & Poulson, 1979).

Para *D. melanogaster*, as dificuldades se ampliam: as hipóteses de aumento no valor adaptativo também parecem falhas e, apesar de *D. melanogaster* ser uma espécie intensamente estudada, este é o primeiro caso de **AA** natural descrito na espécie (Montenegro *et al.*, 2000). Mesmo nas coletas com maior número de moscas (Rio de Janeiro – 9 fêmeas, Recife – 25 fêmeas

e São José da Coroa Grande – 13 fêmeas) o **SR** não foi encontrado de novo. Existe a possibilidade de que o surgimento deste **SR** seja um evento muito recente, e esteja destinado a desaparecer (Hurst (1993) propôs que a maior parte dos **AA** tem este destino). Caso esta hipótese esteja correta, encontrar este agente androcida foi um enorme golpe de sorte. Novas coletas, principalmente em Campinas, devem ser feitas para tentar esclarecer a questão.

Muito se tem especulado a respeito de como **EGE** podem interferir na evolução do hospedeiro. O fato de a resistência ao **AA** em *D. melanogaster* ser mais acentuada nos primeiros dias da vida reprodutiva da fêmea pode selecionar para diminuir o tempo de maturação até a primeira reprodução, ou para concentrar a produção de ovos nos primeiros dias após a fecundação. Este dado pode ser interpretado de outra forma: talvez *D. melanogaster* seja uma espécie pouco vulnerável à invasão de um **AA**, por amadurecer sexualmente cedo e investir mais no começo de sua vida reprodutiva. O fato de apenas uma mosca infectada ter sido encontrada, e de não existir nenhum outro registro de um **AA** natural em *D. melanogaster*, reforçam esta hipótese.

Bibliografia

- Birch, L. C., Dobzhanky, T., Elliott, P. O. & Lewontin, R. C. 1963. Relative fitness of geographic races of *Drosophila serrata*. *Evolution* 17: 72-83.
- Buzzatti-Traverso, A. 1941. An extreme case of sex ratio in *Drosophila bilineata*. *Drosophila Inform. Serv.* 14: 49.
- Cavalcanti, A. G. L., Falcão, D. N. & Castro, L. E. 1958. The interaction of nuclear and cytoplasmic factors in the inheritance of the “sex-ratio” character in *Drosophila prosaltans*. Univ. Brasil Publ. Fac. Nac. Filosof. Série Científica, No. 1, pp 1-.
- Cosmides, L. & Tooby, J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *J. Theor. Biol.* 89: 83-129.
- Counce, S. J. & Poulson, D. F. 1966. The expression of maternally-transmitted sex ratio distortion (**SR**) in two strains of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 37: 364-390.

- Crow, J. F. 1988. The ultraselfish gene. *Genetics* **118**: 389-391.
- Eberhard, W. G. 1980. Evolutionary consequences of intracellular organelle competition. *Q. Rev. Biol.* **55**: 231-249.
- Fialho, R. F. & Stevens, L. 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc Roy Soc Lon B* **267**: 1469-1473.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Claredon Press, Oxford.
- Hurst, L. D. 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. *Proc R. Soc. Lond. B* **244**: 91-99.
- Hurst, L. D. 1993. The incidences and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.*, **68**, 121-193.
- Hurst, G. D. D., Johnson, A. P., von der Schulenburg, J. H. G. & Fuyama Y. 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* **156**: 699-709.
- Hurst, G. D. D., Bandi, C., Sacchi, L., Cochrane, A. G., Bertrand, D., Karaca, I. & Majerus, M. E. N. 1999a. *Adonia variegata* (Coleoptera : Coccinellidae) bears maternally inherited Flavobacteria that kill males only. *Parasitology* **118**: 125-134.
- Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M., von der Schulenburg, J. H. G., Bertrand, D., West, S. A., Goriacheva, I. I., Zakharov, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R. & Majerus, M. E. N. 1999b. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc Roy Soc Lon B* **266**: 735-740.
- Hurst, G. D. D., Majerus, M. E. N. & Walker, L. E. 1993. The importance of cytoplasmic male killing elements in natural-populations of the 2 spot ladybird, *Adalia-bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera, Coccinellidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **49**: 195-202.
- Hurst, G. D. D. & Majerus, M. E. N. 1993. Why do maternally inherited microorganisms kill males? *Heredity* **71**: 81-95.
- Hurst, G. D. D. & Jiggins, F. M. 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 329-336.
- Ikeda, H. 1970. Cytoplasmically-inherited 'sex-ratio' condition in natural and experimental populations of *Drosophila bifasciata*. *Genetics* **65**: 311-333.
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D. & Majerus, M. E. N. 1998. Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. *Heredity* **81**: 87-91.

- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., Jiggins, C. D., Von der Schulenburg, J. H. G. & Majerus, M. E. N. 2000. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing Spiroplasma bacterium *Parasitology* **120**: 439-446.
- Magni, G. E. 1953. 'Sex-ratio': a non-Mendelian character in *Drosophila bifasciata*. *Nature*, **4367**, 81.
- Majerus, M. E. N. & Majerus, T. M. O. 2000. Female-biased sex ratio due to male-killing in the Japanese ladybird *Coccinula sinensis*. *Ecol. Entomol.* **25**: 234-238.
- Malogolowkin, C. 1958. Maternally inherited "sex-ratio" conditions in *Drosophila willistoni* and *Drosophila paulistorum*. *Genetics* **43**: 274-286.
- Malogolowkin-Cohen, C. & Rodrigues-Pereira, M. A. Q. 1975. Sexual drive of normal and sr flies of *Drosophila nebulosa*. *Evolution* **29**: 579-580.
- Montenegro, H., Souza, W. N., Da Silva Leite, D. & Klaczko, L. B. 2000. Male-killing selfish cytoplasmic element causes sex-ratio distortion in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **85**: 465-470.
- Randerson, J. P., Smith, N. G. C. & Hurst, L. D. 2000 The evolutionary dynamics of male-killers and their hosts. *Heredity* **84**: 152-160.
- Rigaud, T., Moreau, J. & Juchault, P. 1999. *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. *Heredity* **83**: 469-475.
- Sakaguchi, B. & Poulson, D. F. 1963. Interspecific transfer of the "sex-ratio" condition from *Drosophila willistoni* to *D. melanogaster*. *Genetics* **48**: 841-861.
- Werren, J. H., Skinner, S. W. & Huger, A. M. 1986. Male-killing bacteria in a parasitic wasp. *Science* **231**: 990-992.
- Werren, J.H. 1987. The coevolution of autosomal and cytoplasmic sex ratio factors. *J. Theor. Biol.* **124**: 317-334.
- Werren, J. H., Nur, U. & Wu, C. I. 1988. Selfish genetic elements. *Trends Ecol Evol* **3**: 297-302.
- Williamson, D. L. & Poulson, D. F. 1979. Sex ratio organisms (spiroplasmas) of *Drosophila*. Pp. 175-208. In R. F. Whitcomb & J. G. Tully (eds.), *The Mycoplasmas*, Vol. 3. Academic Press, New York.
- Yamada, M. A., Watanabe, T. K. & Koana, T. 1985. Absence of resistance genes against male-killing action of the SRO in *Drosophila melanogaster*. *Jap. J. Genet.* **60**: 93-102.

Tabelas

Tabela 1. Localidade, data de coleta e número de estirpe por localidade das estirpe fornecedoras de machos do experimento.

| Localidade | Data de coleta | Estoques de <i>D. melanogaster</i> |
|------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Campinas, SP | Várias datas | 16 |
| Atibaia | 18/08/1997 | 2 |
| Brasília, DF | 10/09/1999 | 3 |
| Rio de Janeiro, RJ | 10/11/1999 | 2 |
| Rio de Janeiro, RJ | 22/11/1999 | 9 |
| Recife, PE | 06 e 07/01/2000 | 24 |
| São José da Coroa Grande, PE | 06 e 07/01/2000 | 12 |
| TOTAL | | 68 |

Tabela 2. Número de ♀ e ♂, % de ♂, número de gerações desde origem da estirpe, número de fêmeas produzindo fêmeas **SR** e normais.

| Estirpe | ♀ | ♂ | % ♂ | Gerações | ♀♀ SR | ♀♀ normais | % transmissão |
|---------|-------|------------------|------|----------|--------------|----------------|---------------|
| SRO-39 | 12480 | 95 ^a | 0.76 | 22 | 97 | 2 ^b | 97.98 |
| XRJ-10 | 8120 | 296 ^a | 3.52 | 21 | 84 | 3 ^b | 96.55 |

^a Proporções de ♀ e ♂ entre as linhagens: $\chi^2 = 210.35$; G. L. = 1; P = 0.000.

^b Eficiência de transmissão (H₀: proporção entre fêmeas **SR** e normais iguais entre as estirpes).
Teste exato de Fisher; P = 0.343

Tabela 3a. Resultados da análise categórica (procedimento CatMod, SAS Institute) para a proporção de machos no conjunto total de dados, por estirpe, por geração e para a interação estirpe*geração.

| Fonte de Variação | g. l. | Chi-Quadrado | Prob |
|-------------------|-------|--------------|--------|
| Intercepto | 1 | 13539.73 | 0.0000 |
| Estirpe | 68 | 223.47 | 0.0000 |
| Geração | 3 | 184.09 | 0.0000 |
| Est*Ger | 204 | 1368.73 | 0.0000 |

Tabela 3b. Resultados da análise categórica (procedimento CatMod, SAS Institute) para a proporção de machos no conjunto de estirpe de Campinas (Figura 3), por estirpe, por geração e para a interação estirpe*geração.

| Fonte | g. l. | Chi-Quadrado | Prob |
|------------|-------|--------------|--------|
| Intercepto | 1 | 3141.57 | 0.0000 |
| Estirpe | 15 | 50.97 | 0.0000 |
| Geração | 3 | 212.39 | 0.0000 |
| Est*Ger | 45 | 305.29 | 0.0000 |

Tabela 3c. Resultados da análise categórica (procedimento CatMod, SAS Institute) para a proporção de machos no conjunto de estirpes de São José da Coroa Grande (Figura 3), por estirpe, por geração e para a interação estirpe*geração.

| Fonte | g. l. | Chi-Quadrado | Prob |
|------------|-------|--------------|--------|
| Intercepto | 1 | 2150.47 | 0.0000 |
| Estirpe | 11 | 20.43 | 0.0398 |
| Geração | 3 | 100.10 | 0.0000 |
| Est*Ger | 33 | 113.49 | 0.0000 |

Tabela 3d. Resultados da análise categórica (procedimento CatMod, SAS Institute) para a proporção de machos no conjunto de estirpes de Recife (Figura 3), por estirpe, por geração e para a interação estirpe*geração.

| Fonte | g. l. | Chi-Quadrado | Prob |
|------------|-------|--------------|--------|
| Intercepto | 1 | 4942.93 | 0.0000 |
| Estirpe | 23 | 68.76 | 0.0000 |
| Geração | 3 | 27.64 | 0.0000 |
| Est*Ger | 69 | 475.34 | 0.0000 |

Tabela 3e. Resultados da análise categórica (procedimento CatMod, SAS Institute) para a proporção de machos no conjunto de estirpes do Rio de Janeiro (Figura 3), por estirpe, por geração e para a interação estirpe*geração.

| Fonte | g. l. | Chi-Quadrado | Prob |
|------------|-------|--------------|--------|
| Intercepto | 1 | 2275.62 | 0.0000 |
| Estirpe | 10 | 36.87 | 0.0001 |
| Geração | 3 | 15.60 | 0.0014 |
| Est*Ger | 30 | 214.50 | 0.0000 |

Tabela 3f. Resultados da análise categórica (procedimento CatMod, SAS Institute) para a proporção de machos no conjunto de estirpes de Atibaia e Brasília e a estirpe Canton-S (Figura 3), por estirpe, por geração e para a interação estirpe*geração.

| Fonte | g. l. | Chi-Quadrado | Prob |
|------------|-------|--------------|--------|
| Intercepto | 1 | 1126.46 | 0.0000 |
| Estirpe | 5 | 20.20 | 0.0011 |
| Geração | 3 | 9.41 | 0.0243 |
| Est*Ger | 15 | 52.00 | 0.0000 |

Tabela 4. Testes de Kruskal-Wallis comparando os repiques e o total dos repiques entre gerações. Na segunda coluna estão os valores do teste para cada repique. Dentro de cada célula da terceira à oitava colunas está a probabilidade correspondente ao contraste assinalado.

| | Kruskal-Wallis (H) | F1 e F2 | F1 e F3 | F1 e F4 | F2 e F3 | F2 e F4 | F3 e F4 |
|-----------|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Repique 1 | 45.9519 ^a | 0.5543 | 0.0000 | 0.0087 | 0.0003 | 0.0013 | 0.0000 |
| Repique 2 | 11.5798 ^b | 0.0013 | 0.0690 | 0.4235 | 0.1613 | 0.0156 | 0.3087 |
| Repique3 | 1.5780 ^c | - | - | - | - | - | - |
| Total | 45.7585 ^a | 0.1108 | 0.0000 | 0.0163 | 0.0100 | 0.0001 | 0.0000 |

^a P = 0.000; G. L. = 3

^b P = 0.009; G. L. = 3

^c P = 0.664; G. L. = 3

Tabela 5. Teste de Friedman comparando os repiques dentro de cada geração

| | Friedman (Fr) | Diferença entre repiques 1 e 2 | Diferença entre repiques 1 e 3 | Diferença entre repiques 2 e 3 |
|----|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| F1 | 52.2609 ^a | 72 (p < 0.05) | 75 (p < 0.05) | 3 (p > 0.05) |
| F2 | 39.6594 ^a | 53.5 (p < 0.05) | 71 (p < 0.05) | 17.5 (p > 0.05) |
| F3 | 92.7247 ^a | 92 (p < 0.05) | 103 (p < 0.05) | 11 (p > 0.05) |
| F4 | 25.7174 ^a | 46.5 (p < 0.05) | 55.5 (p < 0.05) | 9 (p > 0.05) |

^a P = 0.0000; G. L. = 2

Tabela 6. Número de proles **SR** e normais das fêmeas do primeiro e terceiro repique, cruzadas individualmente com machos Canton-S.

| | Fêmeas SR | Fêmeas normais | Eficiência de transmissão |
|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Primeiro repique | 22 (1380 ♀, 156 ♂ ^b) | 42 ^a (2103 ♀, 1694 ♂) | 34.37 % |
| Terceiro repique | 66 (5555 ♀, 34 ♂ ^b) | 0 ^a | 100 % |

^a Eficiência de transmissão (H_0 : proporção entre fêmeas **SR** e normais iguais entre os repiques). Teste exato de Fisher: $P = 0.000$

^b Proporções de ♀ e ♂ entre as fêmeas **SR** do primeiro e terceiro repique: $\chi^2 = 423.18$; G. L. = 1; $P = 0.000$.

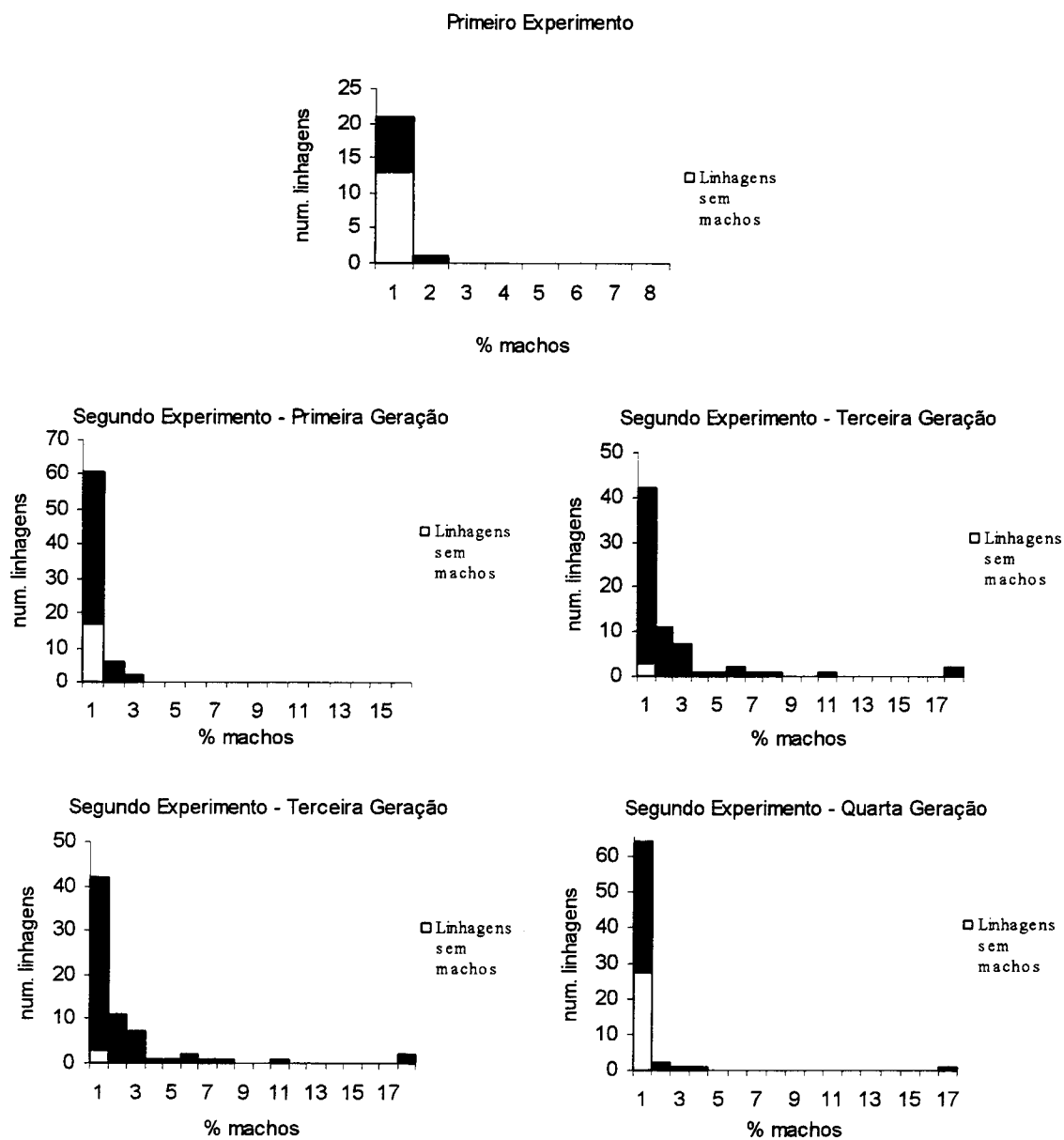


Figura 1. Número de linhagens apresentando até 1%, até 2%, *etc.*, do primeiro experimento (número de linhagens = 22) e das quatro gerações do segundo experimento (número de linhagens = 69). Em branco, o número de linhagens sem machos. As escalas são diferentes entre os gráficos.

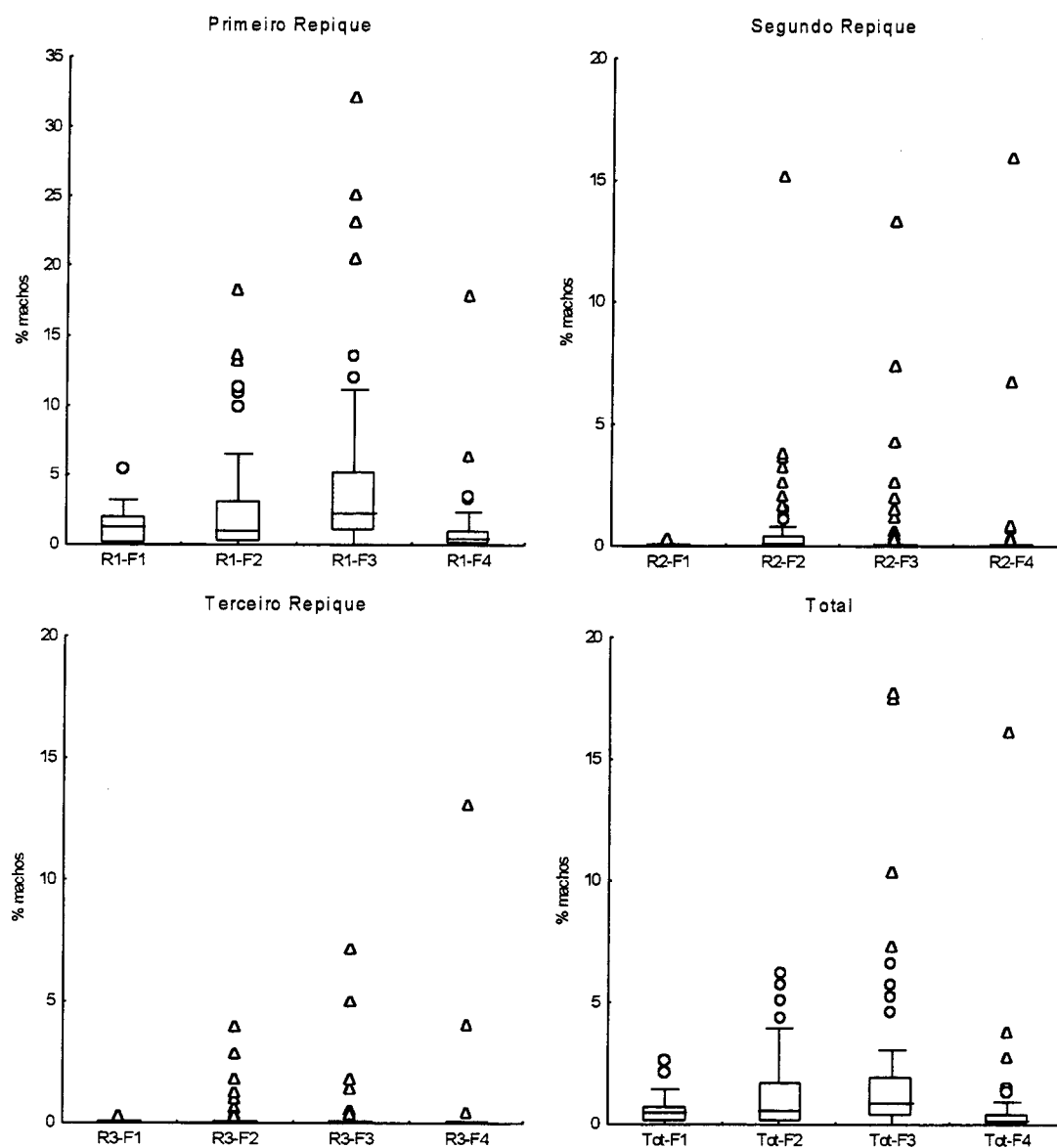


Figura 2. “Box-plots” dos três repiques (R1, R2, R3) e do total (Tot) de repiques, apresentando nos box a porcentagem de machos para cada uma das quatro gerações (F1, F2, F3, F4). A linha do meio no box representa a mediana; a linha inferior, o primeiro quartil e a superior, o terceiro quartil. Círculos representam valores desviantes (“outliers”) – entre 1.5 e 3 vezes o valor do “box” – e triângulos representam valores extremos – acima de 3 vezes o valor do “box”.

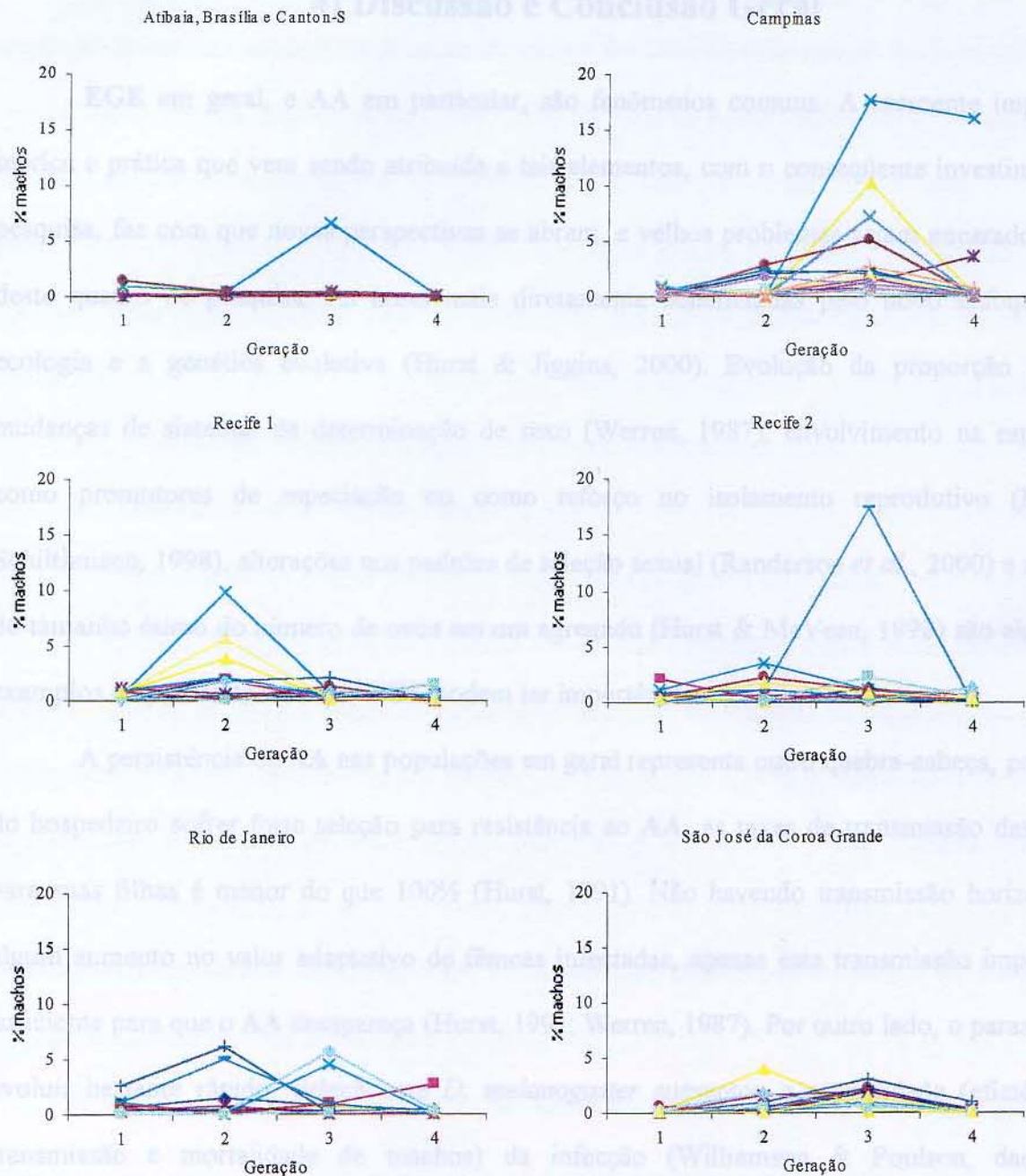


Figura 3. Proporção de machos nas quatro gerações para cada estirpe, separadas em: a) Atibaia, Brasília e Canton-S (6 estirpes), b) Campinas (16 estirpes), c) Recife 1 (12 estirpes), d) Recife 2 (12 estirpes), e) Rio de Janeiro (11 estirpes) e f) São José da Coroa Grande (12 estirpes). Cada linha representa uma estirpe diferente.

4) Discussão e Conclusão Geral

EGE em geral, e **AA** em particular, são fenômenos comuns. A crescente importância teórica e prática que vem sendo atribuída a tais elementos, com o conseqüente investimento em pesquisa, faz com que novas perspectivas se abram, e velhos problemas sejam encarados dentro deste quadro de pesquisa. As áreas mais diretamente beneficiadas pelo novo enfoque são a ecologia e a genética evolutiva (Hurst & Jiggins, 2000). Evolução da proporção sexual e mudanças de sistemas de determinação de sexo (Werren, 1987), envolvimento na especiação, como promotores de especiação ou como reforço no isolamento reprodutivo (Hurst & Schilthuizen, 1998), alterações nos padrões de seleção sexual (Randerson *et al.*, 2000) e alteração do tamanho ótimo do número de ovos em um agregado (Hurst & McVean, 1998) são alguns dos exemplos de problemas em que **EGE** podem ter importância.

A persistência de **AA** nas populações em geral representa outro quebra-cabeça, pois, além do hospedeiro sofrer forte seleção para resistência ao **AA**, as taxas de transmissão das fêmeas para suas filhas é menor do que 100% (Hurst, 1991). Não havendo transmissão horizontal ou algum aumento no valor adaptativo de fêmeas infectadas, apenas esta transmissão imperfeita é suficiente para que o **AA** desapareça (Hurst, 1991; Werren, 1987). Por outro lado, o parasita pode evoluir bastante rápido. Seleção em *D. melanogaster* aumentou a estabilidade (eficiência de transmissão e mortalidade de machos) da infecção (Williamson & Poulson, dados não publicados, *apud* Counce & Poulson, 1966). Em *D. willistoni*, fêmeas de uma linhagem foram usadas como receptoras em um experimento de transmissão artificial do **AA** desta espécie para linhagens não infectadas. Após algumas gerações de transmissão incerta e ineficiente, a transmissão ganhou estabilidade e eficiência. Apenas posteriormente, quando fêmeas **SR** padrão foram cruzadas por algumas gerações com machos da mesma linhagem usada como receptora do

experimento de transmissão do **SR**, descobriu-se que a linhagem receptora era resistente, pois a proporção de machos subia gradualmente até chegar em 50% (Williamson & Poulson, 1979).

Apesar de, em *Drosophila*, as frequências do **AA** no campo serem relativamente baixas, em torno de 10% ou menores, elas são persistentes ao longo do tempo (Cavalcanti *et al.*, 1958; Ikeda, 1970; Williamson & Poulson, 1979). Em outros grupos de insetos, frequências bastante altas são observadas. Existem três hipóteses para explicar a permanência de um **AA** numa população:

1. Transmissão horizontal causada pela morte dos machos.
2. Diminuição do endocruzamento.
3. Diminuição da competição entre fêmeas das progênes infectadas.

A ecologia de alguns grupos é bastante consistente com uma ou mais destas hipóteses. Por exemplo, em besouros coccinelídeos (joaninhas predadoras de afídeos), as larvas recém-nascidas podem canibalizar os ovos de machos mortos. Uma larva que comeu um ovo antes de sair atrás de presas tem maior taxa de sobrevivência (Majerus & Hurst, 1997). Em *Nasonia vitripennis* (uma vespa parasitóide), além das fêmeas serem maiores e terem maior fertilidade com a diminuição da competição, há transmissão horizontal para fêmeas não infectadas em hospedeiros com alta densidade de vespas (Skinner, 1985).

Porém, em *Drosophila* nenhuma das hipóteses parece ser muito consistente (Hurst & Majerus, 1993). Criando-se moscas infectadas e normais juntas, nunca houve contaminação de moscas normais (Williamson & Poulson, 1979). Mesmo em condições de alta densidade em populações de laboratório, que provavelmente favorecem a transmissão horizontal, as fêmeas **SR** diminuíram de frequência (Ikeda, 1970; Ebbert, 1995). Apenas em uma ocasião (Carvalho & da Cruz, 1962), o **SR** de *D. willistoni* foi transmitido para moscas adultas normais de uma maneira menos artificial do que injeções, através de ingestão de macerados de moscas **SR**. Tentativas de

repetir o experimento não tiveram sucesso (Williamson & Poulson, 1979). A própria lógica evolutiva de AA parece indicar que transmissão horizontal não tem importância (Hurst, 1991). Apesar disto, Ebbert (1995) aponta que a transmissão horizontal é uma possibilidade largamente menosprezada e praticamente não explorada., nos casos de AA precoces.

Apesar de em geral espécies de *Drosophila* sofrerem depressão por endocruzamento, o grau de endocruzamento no campo é incerto e difícil de medir. Além desta dificuldade metodológica, existem outras características da história de vida de *D. melanogaster* que diminuem o endocruzamento. Por exemplo, as fêmeas de *D. melanogaster* eclodem das pupas antes dos machos (Nunney, 1983), e as fêmeas amadurecem sexualmente entre dois e quatro dias após eclodirem das pupas (Manning, 1967; Markow, 1996), e, enquanto estão imaturas, as fêmeas recusam acasalar-se com os machos. Já para avaliar a relevância da hipótese da diminuição da competição, é necessário saber se a competição entre as larvas é significativa, e se a competição se dá entre larvas aparentadas. Estes aspectos da ecologia de *D. melanogaster* ainda são pouco estudados e incertos.

Em *Drosophila melanogaster*, um AA nunca havia sido descrito antes em populações naturais (Fitz-Earle & Sakaguchi, 1986; Hurst, 1993), e pensava-se que a espécie não seria favorável à invasão e manutenção de um AA (Hurst, 1993). Apesar de termos encontrado e descrito um AA em *D. melanogaster*, talvez aquela afirmação não seja falsa, pois apenas uma mosca SR foi coletada. Só o fato de um AA nunca ter sido descrito antes em *D. melanogaster* já é bastante intrigante, tendo em vista que ela é um dos principais modelos em biologia, inclusive da genética de populações (Rubin, 1988). Para complicar, os dados que obtivemos sobre eficiência de transmissão e resistência ao AA em *D. melanogaster* sugerem que o destino do AA será, provavelmente, a extinção. A questão de se tal AA é um fato extraordinário ou se ele tem

importância populacional em *D. melanogaster* persiste, e poderá ser resolvida com novas abordagens de análise e coletas.

A natureza do **AA** de *D. melanogaster* ainda é desconhecida, e existem três hipóteses para explicá-la: a infecção é antiga, mas nunca foi detectada antes, provavelmente por apresentar frequência muito baixa; a infecção é recente, transmitida naturalmente ou por experimentos de laboratório; ou a bactéria acabou de adquirir a característica (evolução). A identificação da provável bactéria poderá ajudar a responder esta questão. A posição filogenética da bactéria pode resolver a origem evolutiva da característica, principalmente se o **AA** de *D. melanogaster* for o mesmo de alguma outra espécie de inseto. Finalmente, ainda existe a possibilidade de o **SR** de *D. melanogaster* ter sido originado por interferência humana, em experimentos anteriores. Nestes experimentos, os **SR** de *D. willistoni*, *D. nebulosa*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* foram transmitidos para *D. melanogaster* artificialmente, através de injeções de extratos de moscas **SR** em moscas saudáveis (Williamson & Poulson, 1979).

5) Bibliografia

- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Andreadis, T. G. 1999. Epizootiology of *Amblyospora stimuli* (Microsporida: Amblyosporidae) infections in field populations of a univoltine mosquito, *aedes stimulans* (Diptera: Culicidae), inhabiting a temporary vernal pool. *J. Invert. Pathol.* **74**: 198-205.
- Barros, R. 1949. Um caso de alteração na proporção entre os sexos em *Drosophila mercatorum pararepleta*. *Cien. Cult.* **1**: 107-110.
- Bull, J. J. & Charnov, E. L. 1988. How fundamental are Fisherian sex ratios? Oxford Surveys in Evolutionary Biology **5**, pp 96-135.
- Buzzatti-Traverso, A. 1941. An extreme case of sex ratio in *Drosophila bilineata*. *Drosophila Inform. Serv.* **14**: 49.
- Carson, H. L. 1956. A female-producing strain of *Drosophila borealis* Patterson. *Drosophila Inform. Serv.* **30**: 109-110.
- Carvalho, A. B. & Vaz, S.C. 1999. Are Drosophila SR drive chromosomes always balanced? *Heredity* **83**: 221-228.
- Carvalho, A. B., Peixoto, A. A. & Klaczko, L. B. 1989. Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **62**: 425-428.
- Carvalho, G. G. & da Cruz, M. P. 1962. Transfer of sex-ratio factor in *Drosophila willistoni* by ingestion. *Science* **138**: 51.
- Cavalcanti, A. G. L., Falcão, D. N. & Castro, L. E. 1958. The interaction of nuclear and cytoplasmic factors in the inheritance of the "sex-ratio" character in *Drosophila prosaltans*. Univ. Brasil Publ. Fac. Nac. Filosof. Série Científica, No. 1.
- Cavalcanti, A. G. L., Falcão, D. N. & Castro, L. E. 1957. Sex-ratio in *Drosophila prosaltans*, a character due to interaction between nuclear genes and a cytoplasmic factor. *Am. Naturalist* **91**: 321-325.
- Cosmides, L. & Tooby, J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *J. Theor. Biol.* **89**: 83-129.
- Counce, S. J. & Poulson, D. F. 1966. The expression of maternally-transmitted sex ratio distortion (SR) in two strains of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **37**: 364-390.
- Crow, J. F. 1988. The ultraselfish gene. *Genetics* **118**: 389-391.

- Dunn, A. M., Hatcher, M. J., Terry, R. S. & Tofts, C. 1995. Evolutionary ecology of vertically transmitted parasites: transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni*. *Parasitology* **111**: S91-S109.
- Ebbert, M. A. 1995. Variable effects of crowding on *Drosophila* hosts of male-lethal and non-male-lethal *Spiroplasmas* in laboratory populations. *Heredity* **74**: 227-240.
- Ebbert, M. A. 1991. The interaction phenotype in the *Drosophila willistoni*-spiroplasma symbiosis. *Evolution* **45**: 971-988.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fitz-Earle, M. & Sakaguchi, B. 1986. Sex ratio distortion in populations and its possible role in insect suppression: experimental studies with strains of *Drosophila melanogaster* carrying cytoplasmically-inherited male-killing spiroplasmas. *Jap. J. Genet.* **61**: 447-460.
- Gershenson, S. 1928. A new sex-ratio abnormality in *Drosophila obscura*. *Genetics* **13**: 488-507.
- Hackett, K. J., Lynn, D. E., Williamson, D. L., Ginsberg, A. S. & Whitcomb, R. F. 1986. Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio spiroplasma. *Science* **232**: 1253-1255.
- Hamilton, W. D. 1967. Extraordinary sex ratios. *Science* **156**: 477-488.
- Hartl, D. L. & Hartung, N. 1975. High frequency of one element of *segregation distorter* in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **29**: 512-518.
- Hoffman, A. A., Hercus, M. & Dagher, H. 1998. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **148**: 221-231.
- Howard, H. W. 1942. The genetics of *Armadillidium vulgare* Latr. II. Studies on the inheritance of monogeny and amphogeny. *J. Genet.* **44**: 143-159.
- Hurst, G. D. D. & Jiggins, F. M. 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 329-336.
- Hurst, G. D. D., Johnson, A. P., von der Schulenburg, J. H. G. & Fuyama Y. 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* **156**: 699-709.
- Hurst, G. D. D. & McVean, G. A. T. 1998. Parasitic male-killing bacteria and the evolution of clutch size. *Ecol. Entomol.* **23**: 350-353.
- Hurst, G. D. D. & Majerus, M. E. N. 1993. Why do maternally inherited microorganisms kill males? *Heredity* **71**: 81-95.

- Hurst, G. D. D. & Schilthuisen, M. 1998. Selfish genetic elements and speciation. *Heredity* **80**: 2-8.
- Hurst, G. D. D., Hammarton, T. C., Obrycki, J. J., Majerus, T. M. O., Walker, L. E., Bertrand, D. & Majerus, M. E. N. 1996a. Male-killing bacterium in a fifth ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Heredity* **77**: 177-185.
- Hurst, L. D., Atlan, A. & Bengtsson, B. O. 1996b. Genetic conflicts. *Q. Rev. Biol.* **71**: 317-364.
- Hurst, L. D. 1993. The incidences and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.* **68**: 121-193.
- Hurst, L. D. 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. *Proc R. Soc. Lond. B* **244**: 91-99.
- Ikeda, H. 1970. Cytoplasmically-inherited 'sex-ratio' condition in natural and experimental populations of *Drosophila bifasciata*. *Genetics* **65**: 311-333.
- Jaenike, J. 1996. Sex-ratio meiotic drive in the *Drosophila quinaria* group. *Am. Naturalist* **148**: 237-254.
- Juchault, P., Rigaud, T. & Mocquard, J. P. 1992. Evolution of sex-determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Isopoda): competition between two feminising parasitic sex factors. *Heredity* **69**: 382-390.
- Kidwell, M. G. 1992. Horizontal transfer of *P* elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica* **86**: 275-286.
- Magni, G. E. 1953. 'Sex-ratio': a non-Mendelian character in *Drosophila bifasciata*. *Nature* **4367**: 81.
- Majerus, M. E. N. & Hurst, G. D. D. 1997. Ladybirds as a model system for the study of male-killing symbionts. *Entomophaga* **42**: 13-20.
- Malogolowkin, C. 1959. Temperature effects on maternally inherited sex-ratio conditions in *Drosophila willistoni* and *Drosophila equinoxialis*. *Am. Naturalist* **93**: 365-368.
- Malogolowkin, C. 1958. Maternally inherited "sex-ratio" conditions in *Drosophila willistoni* and *Drosophila paulistorum*. *Genetics* **43**: 274-286.
- Malogolowkin, C. & Poulson, D. F. 1957. Infective transfer of maternally inherited abnormal sex-ratio in *Drosophila willistoni*. *Science* **126**: 32.
- Manning, A. 1967. The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Anim. Behav.* **15**: 239-250.

- Markow, T. A. 1996. Evolution of *Drosophila* mating systems. *Evol. Biol.* **29**: 73-106.
- Moriwaki, D. & Kitagawa, O. 1954. "Female- producing female" of *Drosophila bifasciata* found in Japan. *Drosophila Inform. Serv.* **28**: 137-138.
- Nunney, L. 1983. Sex differences in larval competition in *Drosophila melanogaster*? The testing of a competition model and its relevance to frequency-dependent selection. *Am. Naturalist* **121**: 67-93.
- Poulson, D. F. 1966. Further cases of maternal SR in *Drosophila* species. *Drosophila Inform. Serv.* **41**: 77.
- Poulson, D. F. 1963. Cytoplasmic inheritance and hereditary infections in *Drosophila*. Pp. 404-424. In W. J. Burdette (ed.), *Methodology in basic genetics*. Holden-Day, San Francisco, California.
- Randerson, J. P., Jiggins, F. M. & Hurst, L. D. 2000. Male killing can select for male mate choice: a novel solution to the paradox of the lek. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 867-874.
- Rubin, G. M. 1988. *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* **240**: 1453-1459.
- Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J. & Vernet, P. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmatic conflict. *Trends Ecol. Evol.* **9**: 431-435.
- Schilthuizen, M. & Stouthamer, R. 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**: 361-366.
- Skinner, S. W. 1985. Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting the sex ratio of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Genetics* **109**: 745-759.
- Smith, N. G. C. 1998. The dynamics of maternall-effect selfish genetic elements. *J. Theor. Biol.* **191**: 173-180.
- Stouthamer, R. & Werren, J. H. 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Invert. Pathol.* **61**: 6-9.
- Sturtevant, A. H. & Dobzhansky, T. 1936. Geographical distribution and cytology of 'sex ratio' in *Drosophila pseudoobscura* and related species. *Genetics* **21**: 473-490.
- Sweeney, A. W., Grahah, M. F. & Hazard, E. I. 1988. Life cicle of *Ambliospora dyxenoides* sp. nov. in mosquito *Culex annulirostris* and the copepod *Mesdocyclops albicans*. *J. Invert. Pathol.* **51**: 46-57.
- Toft, C. A. & Karter, A. J. 1990. Parasite-host coevolution. *Trends Ecol. Evol.* **5**: 326-329.

- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* **48**: 1500-1513.
- Vaz, S. C., Vibranovski, M. D. & Carvalho, A. B. 1998. Sex-ratio citoplasmático em *Drosophila roehrae*. *Genet. Mol. Biol* **21** (Suppl.): 260.
- Vossbrinck C. R., Maddox J. V., Friedman S., Debrunnervossbrinck, B. A. & Woese, C. R. 1987. Ribosomal-RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* **326**: 411-414
- Werren, J. H., Skinner, S. W. & Huger, A. M. 1986. Male-killing bacteria in a parasitic wasp. *Science* **232**: 990-992.
- Werren, J. H. 1987. The coevolution of autosomal and cytoplasmic sex ratio factors. *J. Theor. Biol.* **124**: 317-334.
- Werren, J. H., Nur, U. & Wu, C. I. 1988. Selfish genetic elements. *Trends Ecol Evol* **3**: 297-302.
- Williamson, D. L. & Poulson, D. F. 1979. Sex ratio organisms (spiroplasmas) of *Drosophila*. Pp. 175-208. In R. F. Whitcomb & J. G. Tully (eds.), *The Mycoplasmas*, Vol. 3. Academic Press, New York.