

formação dos órgãos cordotonais no sistema nervoso periférico, destacando a importância do gene na formação do sistema nervoso em *Drosophila melanogaster*. ÓRGÃO FINANCIADOR: CNPq.

GMA036 - ESTUDO DA VARIABILIDADE DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL P EM POPULAÇÕES NATURAIS DE DROSOPHILA WILLISTONI. SASSI, A. K.; ROHDE, C.; HERÉDIA, F. e VALENTE, V. L. S. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre/RS. rohde@if.ufrgs.br

Elementos transponíveis (ou TEs) são seqüências de DNA capazes de mudar sua localização no genoma de seus hospedeiros. Estima-se que pelo menos 14% do genoma de *Drosophila* seja composto por diferentes famílias de TEs. Devido a sua capacidade replicativa, os TEs representam uma grande fonte de instabilidade genômica, estando sujeitos a diferentes pressões seletivas. No gênero *Drosophila*, as análises têm demonstrado que sua presença pode não estar diretamente relacionada com a filogenia das espécies que os portam, provavelmente como resultado de transferência horizontal (transferência entre duas diferentes espécies). Um dos casos mais bem estudados é o do elemento *P* de *Drosophila melanogaster*, sendo *D. willistoni* a provável espécie doadora. A seqüência de *P* entre estas duas espécies é praticamente idêntica (a diferença é de apenas uma base); entretanto, pouco se conhece sobre a distribuição de *P* em *D. willistoni*, ao contrário de *D. melanogaster*. Nosso objetivo é conhecer melhor o padrão genômico das inserções de *P* em *D. willistoni* através da técnica de *Southern blot*. Para tanto, estão sendo caracterizadas 15 populações naturais de *D. willistoni* de diferentes locais geográficos. Os resultados obtidos após clivagem com a enzima de restrição *Avall* indicam que as populações estudadas apresentam seqüências completas e deletadas de *P*. O número de cópias do elemento, gerados a partir da clivagem com a enzima *XhoI*, variou de 3 a 6 cópias entre as populações. Além disso, o padrão semelhante de bandas obtido sugere que alguns sítios de restrição parecem ser compartilhados pelas diferentes populações, de forma que a variação interpopulacional parece diminuir quanto maior a proximidade geográfica entre as populações. Financiamento: CNPq, FINEP, FAPERGS e PROPESQ-UFRGS.

GMA037 - EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF A β -GLUCOSIDASE FROM FERVIDOBACTERIUM SP. FUSED TO THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. LIMA, A. O. S.^{1,2}; DAVIS, D. F.³; SULLIVAN, R.²; YERNOOL, D. A.²; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.¹; EVELEIGH, D. E.² ¹Dept.

SP, Brazil. ²Dept. of Biochemistry and Microbiology, Cook College, Rutgers University, New Brunswick-NJ, USA.

anoslima@carpa.ciagri.usp

89-24AIN
SEPARATAS

Due to the facility of measuring *in vitro* and *in vivo* the activity of the Green Fluorescent Protein (GFP), this small polypeptide has been widely applied on the last few years with different purposes (cell localization, promoter activity, selection marker, folding report, etc). The objective of this research was to evaluate the influence of the GFP upon the β -glucosidase (*BglA*) of *Fervidobacterium* sp. activity when these proteins were expressed as a fusion in *Escherichia coli*. This is a part of a main project that involves the use of GFP as a quantitative report to aid the screening of mutated proteins. For that, the project followed 4 steps: construction of the expression vector, expression, purification and characterization of the fusion. The expression system was developed using as a backbone the pBADMyc-HisB plasmid (Invitrogen, CA-USA), which carries the inducible arabinose promoter and a 6X Histidine tag (His tag) that facilitate the protein purification. The *BglA* and GFP (mutant 309 produced in this project) genes were cloned into this vector by PCR using primers that carries specific restriction sites. Further, 2 spacers of different sizes (6 and 12 aminoacids) were inserted between the genes resulting in the vectors pBBGH and pBBLGH, respectively. Optimization of the fusion expression was conducted with both vectors at various arabinose concentrations. The highest activity (*BglA* activity measured against p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (PNPG) and GFP by fluorescence) was detected when the smaller spacer was used, however for both constructs, the optimal condition for induction was 0.1% of arabinose (culture density at 0.6 OD at 600nm) and 14h of incubation. Once established the expression conditions, *E. coli* cells harboring the pBBGH were cultivated and the fusion extracted (sonication, French press) and purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography. The purity of the fused protein was evaluated by SDS-PAGE and the characterization took into consideration the optimal pH and temperature as well as the substrate specificity of the β -glucosidase and the thermostability of the GFP. Comparing to the wild type cellulase, it was possible to detect an increase on the optimal temperature and a reduction on the specific activity against PNPG. It was also possible to observe an increase on the thermostability of the GFP when compared to the wild type protein. Financial support: CNPq, CAPES, USDA, NJ Marine Sciences

GMA038 - EVIDÊNCIA DE ALELO NULO PARA UM LOCO MICROSSATÉLITE EM UMA AMOSTRA DE NELORE. TAMBASCO, D.D.¹; JORGE, E.²; ALENCAR, M.M.³; COUTINHO, L.L.²; TAMBASCO, M.D.¹; REGITANO, L.C.A.¹ ¹Depto. Genética e Evolução - UFSCar, São Carlos - SP; ²Depto. Produção Animal - ESALQ, Piracicaba-SP; ³Embrapa-CPPSE, São Carlos-SP.

Os marcadores microssatélites, por seu alto grau de polimorfismo e codominância, têm sido largamente empregados na construção de mapas genéticos, na identificação de locos associados a caracteres quantitativos e em verificação de parentesco. Tais sequências repetitivas podem ser detectadas pela técnica de PCR. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado a possibilidade de ocorrência de alelos nulos, associados à não amplificação de um determinado alelo, que leva a um falso genótipo homozigoto. O objetivo do presente trabalho é demonstrar a possível ocorrência de um ou mais alelos nulos para o microssatélite BM1224 em uma amostra de Nelore. Em uma análise de 180 fêmeas dessa raça foi verificada ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg para este loco, caracterizada pelo excesso de homozigotos ($P < 0,001$). Além disso, foi observada nesta amostra, a presença de um alelo novo, raro e em homozigose. As progênes dessas fêmeas, resultantes de cruzamentos com touros das raças Angus, Canchim e Simental, foram analisadas quanto à sete marcadores moleculares. Na análise de segregação do microssatélite BM1224, foram considerados apenas os casos em que a paternidade foi confirmada para os demais marcadores, com uma probabilidade de exclusão combinada (PEC) de 0,97. Das 93 famílias consideradas, 33 (35,5%) apresentaram a possibilidade de ocorrência de alelo nulo para o marcador BM1224 nas fêmeas Nelore. Nesses casos, o filho homozigoto recebeu um alelo do pai, mas não apresentou o alelo da mãe homozigota. Das 65 mães que apresentaram-se homozigotas, 32 transmitiram seu alelo para o filho, e 33 não o fizeram. Para verificar a frequência do provável alelo nulo (necessário) na amostra de Nelore utilizada, os genótipos das 33 prováveis portadoras foram alterados de homozigotas para heterozigotas para tal alelo. Considerando a presença de apenas um alelo nulo, verificou-se uma frequência de 0,177. A existência de alelos nulos em alguns marcadores microssatélites deve ser considerada quando da sua utilização em estimativas de parâmetros tal como heterozigose, testes de paternidade e análises de ligação, pois existe a possibilidade de se estar trabalhando com um marcador não codominante. Apoio financeiro: FAPESP, Embrapa.

GMA039 - DETECÇÃO DE MICROSSATÉLITES NA ESPÉCIE DROSOPHILA SP. D (GRUPO REPLETA, CLUSTER BUZZATII). MACHADO, L. P. B.; MANFRIN, M. H. E SENE, F. M. Departamento de Genética - FMRP/USP. Ribeirão Preto-S.P. E-MAIL: lupaes@rgm.fmrp.usp.br

Os microssatélites são classes de marcadores de DNA que envolvem um número variável de repetições em tandem de 1 a 5 pares de bases. Entre os marcadores de DNA, a análise de microssatélites vem se mostrando uma ferramenta importante para estudos populacionais. O objetivo deste trabalho foi detectar sequências de microssatélites no genoma de *Drosophila sp. D* (anteriormente *D.*

serido "Tipo D") para análises populacionais. Foi extraído o DNA total de 40 indivíduos da linhagem H84P4 (Serana-SP). Em seguida, o DNA foi tratado com enzimas de restrição RSA I, Hae III e a combinação Alu I + RSA I. Os fragmentos de 300 a 500 pb foram recortados após PAGE a 5%, ligados ao plasmídeo pUC 18 Sma I, e clonados em bactérias XLICC e DH5 α . Foram obtidas 17 colônias de bactérias que continham plasmídeos com insertos de DNA; 15 insertos foram resultantes do tratamento do DNA total com a combinação de enzimas Alu I + RSA I, e 2 resultantes do tratamento com Hae III. Os plasmídeos com insertos de DNA foram purificados e submetidos a sequenciamento automático. Foram encontrados 12 loci de microssatélites, sendo 2 microssatélites perfeitos, CA₍₆₎ e TA₍₅₎, e 10 microssatélites imperfeitos, os 2 maiores encontrados foram TA₍₄₎-TG-TA₍₃₎-GAA-TA₍₂₎-TT-TA₍₁₎-TT-TA₍₅₎-AA-TA₍₈₎ e GT₍₁₄₎-AT-GT₍₄₎-GACT-GT₍₃₎. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que verificaram que os microssatélites dinucleotídeos são mais longos. A técnica de digestão de DNA com enzimas de restrição seguida de clonagem mostrou-se eficaz na detecção de loci de microssatélites. A combinação de enzimas, neste caso, mostrou-se mais eficiente para clonagem dos fragmentos de DNA, do que a ação individual das enzimas. Oligonucleotídeos foram desenhados para os loci de microssatélites encontrados. A análise de dois desses loci, a partir de isolamento e amplificação através de PCR, foi feita em gel denaturante de poliácridamida a 6% corado com prata. Os indivíduos de 5 populações naturais da espécie *Drosophila sp. D* analisados apresentaram bandas de aproximadamente 300 pb, apenas uma população, de uma área de contato entre as espécies *Drosophila sp. D* e *D. serido*, apresentou uma banda com cerca de 250 pb. A amplificação do DNA de outra população apresentou duas bandas, uma com cerca de 200 pb, e outra com aproximadamente 300 pb. Apoio Financeiro: CAPES, FAPESP, CNPq, FINEP e USP.

GMA040 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO NÚMERO DE CÓPIAS E INTEGRIDADE DOS ELEMENTOS P EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE DROSOPHILA MELANOGASTER. RUIZ, M. T.¹, MANZATO, J. A.², CARARETO, C. M.A.¹. ¹Depto de Biologia - Laboratório de Evolução Molecular de Insetos. ²Depto da Ciência da Computação, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto. e-mail: mari@bio.ibilce.unesp.br

O sistema P-M de disgenesia híbrida mostra pronunciada variação geográfica em populações naturais de *Drosophila melanogaster*. Foram estudadas neste trabalho linhagens brasileiras procedentes de diferentes regiões geográficas, classificadas fenotipicamente como P moderadas (MA, PI, MG e SP), Q (PR, RS₁, RS₂) e M'(SC), com o objetivo de verificar a integridade e o número de cópias dos elementos P nestas linhagens. O número de cópias foi avaliado através de análise de Southern pela digestão