

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Polimorfismos de DNA Mitocondrial em Populações
Naturais e Filogeografia de duas Espécies Críticas do
Grupo *willistoni*: *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum*.**

André Schnorr

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
UFRGS como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky

Co-orientadora: Dra. Karen Luisa Haag

Porto Alegre

Fevereiro de 2003

*Aos meus pais,
Raul Francisco Schnorr e Claride Elisa Schnorr.*

Agradecimentos

Muitas pessoas foram de extrema importância para a realização deste trabalho de mestrado. O apoio dos amigos, colegas e orientadores foi fundamental para superar as dificuldades. Foi um privilégio poder conviver, aprender e fazer amizade com excelentes professores e pesquisadores. Vocês foram e sempre serão uma inesgotável fonte de inspiração.

Mas mais especificamente, gostaria de agradecer:

À Professora Doutora Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky (Verinha), minha orientadora e segunda mãe. Vera, talvez eu não tenha deixado isso claro, mas ter sido teu orientado foi uma experiência realmente maravilhosa. Muito obrigado por permitir que eu fizesse parte do teu grupo de pesquisa. A tua paciência, a tua inteligência, o teu carinho e amor à ciência e à formação de cientistas bem como o teu jogo de cintura tem feito e continuará a fazer do Laboratório de *Drosophila* um exemplo de como fazer ciência com qualidade.

À Professora Doutora Karen Luisa Haag, minha co-orientadora, com certeza um grande exemplo. Obrigado por ter sempre apostado em mim, desde a minha graduação. Obrigado pelos ensinamentos, pela amizade, e por toda a ajuda e esforço para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus pais, Raul Francisco Schnorr e Claride Elisa Schnorr, os principais responsáveis por tudo isso. Não apenas por terem me gerado, mas também por todo o carinho e apoio que me deram, permitindo que eu tivesse uma boa formação.

Aos meus outros orientadores do tempo da graduação, Dr. Renato Zamora Flores e Dra. Maria Clara Gimmler da Luz, fundamentais, cada um do seu modo, pela minha formação científica.

Aos vários bons professores que tive nesta Universidade, em especial ao professor Aldo Mellender de Araújo, à Marion Schiengold e à Helga Winge.

Aos colegas do Laboratório de *Drosophila*. Todos eles, mas em especial à Adriana Sassi, Ana Lauer Garcia, Chirlei Cíntia Klein, Cláudia Rohde, Fabiana

Herédia, Fabiano Torres, Lizandra Robe, Luciano Basso, Luis da Fonte, Marco Gottschalk, Marícia Fantinel, Marisa Colares, Mônica Blauth, Norma Machado, Rodolfo Ribas, Rosane Garcia, Tiago Degrandi e Victor Valiati. Foi uma honra conviver com vocês todos estes dois anos. Muito dos méritos deste trabalho são devido a vocês. É bem o tipinho de vocês fazerem do nosso laboratório o lugar mais agradável de se trabalhar e trocar experiências. A amizade de vocês é para umas cinco gerações (agradecimentos mais detalhados serão dados na forma de autógrafos depois, senão esta sessão se tornaria uma outra dissertação).

Ao pessoal da turminha fraca, acho que conseguimos superar as dificuldades, não?

Ao Leonardo, Clarisse, Adriano, Lígia, Tatinha, Edenir, Tati Bressel, Fabi, Ana Helena, Maísa, Cris.

Ao Andres, Ed, Janaína, Alessandra, Juliane, Lia, Valesca, Vanina, Vanessa, Tarik, Angela, Gabi, Taia, Andrea, Martin, Jaqueline, Valéria, Aline, Nicole, Daisy, Patrícia, Nico.

Ao meu grande amigo e fonte de uma certa inveja (no bom sentido) intelectual, Nelson Jurandi Rosa Fagundes.

Aos funcionários do Laboratório de *Drosophila*: Berenice, Daniela, Marcelo, Dona Jane, Helena, Dona Nena e Maria.

Ao Grande Elmo, o super-herói do Departamento de Genética.

À todos os que eu esqueci (sim, à você eu também agradeço).

E, claro, ao CNPq.

Sumário

Dedicatória	II
Agradecimentos	III
Sumário	V
Resumo	VI
Abstract	VII
1. Introdução	01
1.1. O Grupo <i>willistoni</i> de Espécies Crípticas	01
1.1.1. <i>Populações Urbanas de D. willistoni e D. paulistorum</i>	08
1.2. DNA Mitocondrial	09
1.2.1. <i>Características do DNA Mitocondrial</i>	09
1.2.2. <i>Polimorfismos de DNA Mitocondrial em Populações Naturais</i>	11
1.2.3. <i>Evolução do DNA Mitocondrial</i>	13
2. Objetivos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Material Biológico	17
3.2. Eletroforese da Enzima Fosfatase Ácida	18
3.3. Extração de DNA Genômico	20
3.4. Amplificação por PCR do Gene Citocromo oxidase c Subunidade I	20
3.5. Seqüenciamento	21
3.6. Análise dos Dados	21
3.6.1. <i>Edição e Alinhamento das Seqüências</i>	21
3.6.2. <i>Análise do Polimorfismo das Populações</i>	22
3.6.3. <i>Teste de Seleção</i>	22
3.6.4. <i>Análise Filogenética</i>	23
4. Resultados	24
4.1. Resultados das Coletas	24
4.2. PCR e Purificação das Amostras para Seqüenciamento	25
4.3. Edição e Alinhamento das Seqüências Obtidas	26
4.4. Polimorfismos em Populações Urbanas de <i>D. willistoni</i>	40
4.5. Polimorfismos em Populações de <i>D. willistoni</i> e <i>D. paulistorum</i>	40
4.6. Testes de Seleção	41
4.7. Análise Filogenética	43
5. Discussão, Conclusões e Perspectivas	47
5.1. <i>Freqüência Relativa das Espécies do Grupo willistoni</i>	47
5.2. <i>Polimorfismo e Urbanização</i>	48
5.3. <i>Sistemática Molecular</i>	49
5.4. <i>Filogeografia das duas Espécies</i>	51
6. Referências Bibliográficas	52
Anexo I	65
Anexo II	66

Resumo

A existência de polimorfismos de DNA mitocondrial analisados por um fragmento de 1413 nucleotídeos do gene COI (correspondente à 92% do gene) foi investigada em três populações de *Drosophila willistoni* e uma de *Drosophila paulistorum*. Este marcador foi utilizado para o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes populações (naturais e de laboratório, bem como algumas das semi-espécies de *Drosophila paulistorum*).

Para realizar este estudo foram feitas três coletas em três locais, de abril a setembro de 2002, nas cidades de Porto Alegre e Viamão. Surpreendentemente, com base em estudos anteriores, verificou-se uma queda expressiva na frequência de aparecimento de *D. paulistorum* provavelmente como consequência da recente invasão das assembléias locais de drosofilídeos pela mosca africana *Zaprionus indianus*, que, desde 1999, tem se espalhado rapidamente pela América do Sul.

A análise da diversidade nucleotídica revelou uma não estruturação das populações de *D. willistoni* de Porto Alegre e arredores. Este resultado vai de encontro com o que foi achado em estudos anteriores, utilizando marcadores nucleares, cromossômicos, morfométricos e comportamentais. Para explicar esta diferença, alguns testes para diferentes modelos seletivos foram realizados, e os resultados sugerem que estas seqüências estariam sofrendo seleção purificadora, evitando a diversificação destas populações neste nível.

Ao contrário do que se tem encontrado em outros drosofilídeos, o marcador por nós utilizado para *D. willistoni* e *D. paulistorum*, não foi sensível o suficiente para resolver a filogeografia do grupo. Apesar disto, este marcador mostrou-se útil para separar as espécies, podendo ser utilizado em estudos posteriores.

Abstract

The existence of mitochondrial DNA polymorphisms analyzed by a fragment of 1413 nucleotides of COI gene (corresponding to 92% of the gene) was investigated in three populations of *Drosophila willistoni* and one of *Drosophila paulistorum*. This marker was used to establish the phylogenetic relationships between different populations (natural and laboratory individuals, as well as, some of the semi-species of *Drosophila paulistorum*).

To perform this study, we collected flies in three different places, from April to September of 2002, in the cities of Porto Alegre and Viamão. Surprisingly, based on previous works, an expressive decrease in the frequency of appearance of *D. paulistorum* was observed, probably as a consequence of the recent invasion of the local assemblies of drosophilids, by the African fly *Zaprionus indianus*, that has dispersed quickly in South America since 1999.

Analysis of nucleotide diversity showed a non-subdivided population of *D. willistoni* in Porto Alegre and surroundings. This result disagrees with previous studies, when nuclear, chromosomal, morphometric and behavioural markers were used. To explain this difference, some tests for different selective models had been carried through, and the results found suggest that these sequences would be undergoing purifying selection, preventing the diversification of this sequence, at this level.

In contrast to what has been found in other drosophilids, this gene was not sensible enough to resolve the phylogeography of this group of species. In despite of that, this marker was helpful to separate the species studied, being able to be used for further studies.

1. Introdução

1.1. O Grupo *willistoni* de espécies crípticas

Em 1896, Samuel Wendell Williston, estudando dípteros da ilha de São Vicente, no Caribe, descreveu uma nova espécie, à qual deu o nome de *Drosophila pallida*. Como este nome já pertencia à outra mosca, Sturtevant mudou-o para *willistoni*, em 1916. Em 1943, Dobzhansky & Pavan examinaram uma série de culturas de moscas que se encaixavam na descrição de *D. willistoni*, descendentes de progenitores coletados no Estado de São Paulo, Brasil. Estas culturas pertenciam a duas classes, diferindo no tamanho corporal. O estudo dos cromossomos das glândulas salivares mostrou também diferenças entre estas duas classes. Este estudo revelou que, apesar de muito similares morfologicamente, estas duas classes possuíam certa diferenciação. As moscas do tipo maior, que apareciam menos freqüentemente, Dobzhansky & Pavan denominaram *Drosophila paulista*. Estudos posteriores de Burla *et al.* (1949) mostraram que houve uma confusão na nomenclatura destas duas espécies, pois de acordo com as Regras de Nomenclatura, o nome *willistoni* deveria pertencer à espécie de tamanho maior. Desta forma, *D. paulista* passou a ser um sinônimo de *D. willistoni*, e *D. willistoni* passou a ser sinônimo de *D. paulistorum*. Logo após, mais três espécies morfologicamente similares, mas reprodutivamente isoladas, foram adicionadas ao grupo: *D. equinoxialis* Dobzhansky (1946) da Amazônia (duas subespécies descritas por Ayala *et al.*, 1974; *equinoxialis* e *caribbensis*), *D. tropicalis* Burla *et al.* (1949) da região central do Brasil (duas subespécies descritas por Townsend, 1954; *tropicalis* e *cubana*) e *D. insularis* Dobzhansky *et al.* (1957) das Antilhas.

Foram descritas seis semi-espécies para *D. paulistorum* (Dobzhansky & Spassky, 1959): Andino-Brasileira, Amazônica, Centro-Americana, Orinocana, Transicional e Guianense. Elas são idênticas morfologicamente, possuem um forte isolamento reprodutivo (etológico), e, quando ocorre a produção de híbridos, a descendência é constituída de fêmeas férteis, porém os machos híbridos são

estéreis. Além disso, a distribuição geográfica destes taxa, apresenta áreas de sobreposição. Uma das seis semi-espécies (Guianense) foi posteriormente descrita como uma espécie distinta por Kastritsis & Dobzhansky (1967) e recebeu o nome de *D. pavlovskiana*. Em 1970, uma nova semi-espécie foi descrita para *D. paulistorum* por Perez-Salas *et al.* (semi-espécie Interior).

As espécies crípticas não são facilmente distinguíveis morfologicamente, mas não são necessariamente idênticas. Burla *et al.* (1949) descreveram algumas diferenças médias no tamanho do corpo, no formato dos palpos, da espermateca e do hipândrio. Spassky (1957) descreveu algumas diferenças diagnósticas na genitália do macho. Desta forma, os machos podem ser identificados diretamente e as fêmeas, indiretamente, pela sua progênie. Estas espécies podem ser reconhecidas também pelo padrão dos cromossomos politênicos (Burla *et al.*, 1949; Dobzhansky 1950; Dobzhansky *et al.*, 1957; Dobzhansky & Pavlovsky, 1962; Kastritsis, 1966; Kastritsis & Dobzhansky, 1967), por variação de aloenzimas (Ayala & Powell, 1972; Ayala *et al.*, 1972a, 1972b), por cruzamentos (Burla *et al.*, 1949; Dobzhansky *et al.*, 1957; Dobzhansky & Powell, 1975; Ehrman & Powell, 1982; Cordeiro & Winge, 1995) e pela caracterização espécie-específica do som produzido pelos batimentos das asas dos machos durante a corte sexual (Ritchie & Gleason, 1995, Valiati, 1999). As semi-espécies só são reconhecíveis por cruzamentos ou cromossomos.

A distribuição das espécies crípticas do grupo *willistoni* foi compilada e revisada por Spassky *et al.* (1971) e atualizada por Dobzhansky & Powell (1975). Este grupo de drosofilídeos é essencialmente Neotropical. A distribuição destas espécies se sobrepõe em muitas áreas (Figura 1.1). *D. willistoni* possui a maior distribuição, sendo encontrada desde o México e Flórida até o Sul do Brasil, Uruguai e Norte da Argentina, e da costa Oeste até a Leste das Américas, e é encontrada em simpatria com todas as suas crípticas. *D. paulistorum* se distribui mais ao sul do que *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*, e em muitas áreas da América do Sul e Central estas quatro espécies se encontram em simpatria. *D. insularis* e *D. pavlovskiana* possuem a menor distribuição do grupo, sendo encontradas nas Antilhas e Guiana, respectivamente.



Figura 1.1. Mapa da Distribuição Geográfica das Espécies do Grupo Críptico da *Drosophila willistoni*

De acordo com os estudos de Spassky *et al.* (1971); Winge (1971); Dobzhansky & Powell (1975); Ehrman & Powell, 1982) e Santos & Valente (1990). Mapa gentilmente cedido por Ana Lauer Garcia.

As semi-espécies de *D. paulistorum* apresentam ampla sobreposição de áreas de distribuição, na América do Sul, ao norte do equador (Figura 1.2), apesar de, mesmo nessas áreas, nem sempre serem realmente simpátricas. Os trabalhos de Malogolowkin-Cohen *et al.* (1965) e de Ehrman (1965) mostraram que populações simpátricas de semi-espécies diferentes são isoladas sexualmente, sendo sempre mais isoladas do que as populações alopátricas das mesmas semi-espécies. Foi demonstrado que isto ocorre por um forte isolamento etológico. Apesar de machos cortejarem as fêmeas de outras semi-espécies, em cruzamentos confinados de laboratório, estas não respondem à corte. As poucas fêmeas que foram inseminadas produziram uma descendência híbrida de fêmeas férteis e machos estéreis (Dobzhansky, 1970).

Estudos de cruzamento entre as espécies mostraram que o isolamento reprodutivo é completo (Dobzhansky & Powell, 1975), embora Winge & Cordeiro (1963) e Valiati (1999) encontraram híbridos férteis no cruzamento entre linhagens de *D. willistoni* e *D. paulistorum* do sul do Brasil. A distribuição das semi-espécies de *D. paulistorum* parece ser resultado das áreas de refúgio formadas durante o período seco do Pleistoceno e pós-Pleistoceno, quando as populações de *Drosophila* subdivididas ficaram isoladas entre si por longo tempo, propiciando sua diferenciação (Spassky *et al.*, 1971).

O cariótipo básico das espécies crípticas e não-crípticas do grupo *willistoni* de *Drosophila* é constituído de dois pares de cromossomos metacêntricos (o par sexual e o segundo cromossomo) e de um par acrocêntrico (terceiro cromossomo) (Metz, 1916; Sturtevant & Novitski, 1941; Dobzhansky, 1950; Patterson & Stone, 1952). Dobzhansky publicou em 1950 o mapa dos cromossomos politênicos de *D. willistoni* definindo a nomenclatura dos mesmos. O cromossomo sexual é chamado de XL e XR (braço esquerdo e direito, respectivamente), IIL e IIR representam o braço esquerdo e direito do segundo cromossomo e III corresponde ao cromossomo acrocêntrico. Um possível quarto cromossomo foi descrito por Rohde (2000) ao analisar os cromossomos politênicos de *D. willistoni*. Este cromossomo foi encontrado ligado à heterocromatina do cromossomo XL ou junto às bases dos dois braços do cromossomo X, mas ausente nos núcleos das células em divisão mitótica do



Figura 1.2. Mapa da América com a distribuição geográfica da superespécie *D. paulistorum*. Cada um dos símbolos coloridos representa locais onde foram encontradas cada uma das seis diferentes semi-espécies de *D. paulistorum*, de acordo com os estudos de Spassky *et al.* (1971); Winge (1971); Dobzhansky & Powell (1975), Ehrman & Powell (1982) e Santos & Valente (1990). Mapa gentilmente cedido por Ana Lauer Garcia.

gânglio cerebral. Estrutura similar foi encontrada nas outras espécies do grupo *willistoni* e poderiam corresponder ao quarto cromossomo de *D. melanogaster*, embora esta homologia não tenha sido ainda bem resolvida.

O grupo *willistoni* tem sido foco de particular interesse pelo seu alto grau de polimorfismo cromossômico. *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* têm sido ambas reconhecidas como as espécies de drosofilídeos mais polimórficas cromossomicamente e que melhor exploram este polimorfismo (revisado por Ehrman & Powell, 1982 e Krimbas & Powell, 1992). O número de variantes cromossômicas que segregam nas populações naturais de *D. willistoni* é bastante confuso. Durante os anos 50, uma série de trabalhos descreveram novas inversões (Burla *et al.*, 1949; Da Cunha *et al.*, 1950; Townsend, 1952; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Da Cunha, 1955; Dobzhansky, 1957; Da Cunha *et al.*, 1959). Alguns trabalhos realizados em nosso laboratório (Valente & Morales, 1985; Valente & Araújo, 1985, 1986; Valente *et al.*, 1993), bem como observações feitas pelo Dr. Antônio R. Cordeiro (dados não publicados), sugerem que podem ocorrer mais de 70 inversões segregando nas populações naturais. Rohde (2000), analisando 22 populações *D. willistoni*, confeccionou um novo fotomapa para a espécie (baseado no mapa de referência de Dobzhansky, 1950 e no fotomapa de Regner *et al.*, 1996) e realizou uma descrição completa das inversões presentes em homozigose e heterozigose nestas populações. Pela primeira vez foram descritas inversões no estado homozigoto para esta espécie, além de uma nova e endêmica inversão pericêntrica. Este mapa facilita o estudo das inversões nesta espécie, uma vez que os fotomaps de cromossomos politênicos, confeccionados com fotomicrografias, são mais precisos que os desenhados em câmara clara, pois permitem o registro mais fiel e a observação com maior detalhamento de bandas e regiões consideradas marcadoras. Ayala & Powell (1972), analisando polimorfismo enzimático, verificaram que 58% das populações estudadas eram polimórficas para 28 locos.

D. paulistorum apresenta um alto grau de heterozigose estrutural em seus cromossomos. Kastritsis (1969) descreveu um total de 85 arranjos cromossômicos entre as seis semi-espécies. Valiati & Valente (1997), analisando populações urbanas de *D. paulistorum* em Porto Alegre, encontrou 23 inversões

nos diferentes braços cromossômicos. Destas, 14 são novos arranjos que não haviam sido descritos entre os 85 mencionados por Kastritsis (1969). Santos & Valente (1990) já haviam caracterizado estas mesmas populações como tendo um grande número de diferentes inversões entre os anos de 1985 e 1986. Garcia (2002) confeccionou um fotomapa para *D. paulistorum*. Neste fotomapa, cada seção e subseção são correspondentes às de *D. willistoni*. Isto possibilitou analisar as homologias entre as duas espécies em relação ao padrão de bandas dos cromossomos politênicos e permitiu que fossem inferidos os arranjos cromossômicos hipotéticos ancestrais ou derivados, em relação aos dois braços do cromossomo II, que provavelmente originaram os arranjos que hoje segregam em ambas as espécies.

A filogenia das espécies crípticas do grupo *willistoni* ainda não está bem resolvida. Até hoje, apenas três estudos foram publicados sobre a filogenia do grupo, Spassky *et al.* (1971) descreveram as relações evolutivas entre as espécies baseadas nas evidências biogeográficas e grau de isolamento reprodutivo. Ayala *et al.* (1974) construíram um dendograma baseado na diferenciação genética em 36 loci de alozimas. Gleason *et al.* (1998) analisaram seqüências de dois genes nucleares (*Adh* e *per*) e um fragmento de 495 pb do gene mitocondrial Citocromo c oxidase I. Neste estudo, eles revelaram um conflito entre os conceitos biológico e filogenético de espécies. Pelo conceito biológico de espécie uma linhagem, denominada Carmody, é considerada intermediária entre *D. equinoxialis* e *D. paulistorum*. Já pela análise filogenética, a espécie intermediária deveria ser *D. equinoxialis*. Esta linhagem foi descrita por Carmody em 1965, e é considerada uma categoria anômala. Experimentos de cruzamentos entre indivíduos assim classificados, coletados em Girardot, na Colômbia e Belém, no Brasil, mostraram que estes indivíduos são interférteis, e, embora apresentem isolamento pré-reprodutivo com *D. equinoxialis* e *D. paulistorum*, também podem produzir prole com estas. Outro conflito que surge desta análise ocorre com *D. pavlovskiana*, que formou um grupo monofilético com *D. paulistorum* neste estudo. Os autores lembram que existem ainda poucos dados moleculares sobre este grupo de espécies, e que para a solução destes conflitos, um maior número de seqüências deve ser analisada.

1.1.1 Populações urbanas de *D. willistoni* e *D. paulistorum*

Os primeiros estudos sobre o potencial do ambiente urbano em promover mudanças evolutivas em populações de *Drosophila* foram realizados por Dubinin & Tiniakov (1945, 1946a, 1946b, 1947) com a espécie cosmopolita *D. funebris* em cidades russas; Brncic (1989), com a espécie *D. pavani* do Chile; Singh & Das (1990), com *D. melanogaster* de áreas rurais e urbanas da Índia. Gottschalk (2002) estudou a comunidade de drosofilídeos de Florianópolis e Ferreira (2002), a de Brasília. Valente *et al.*, (1989) vêm estudando populações de *D. willistoni* e *D. paulistorum* da cidade de Porto Alegre.

A maioria da literatura disponível sobre o grupo *willistoni* de espécies crípticas afirma que estas moscas não ocorrem em ambientes perturbados pelo homem (revisado em Ehrman & Powell, 1982). Porém, vários trabalhos têm sido publicados pelo nosso grupo sobre a ocorrência de populações de *D. willistoni* e *D. paulistorum* perfeitamente integradas às comunidades de Drosophilidae na área urbana de Porto Alegre (30°02, S; 51°14, W). Estes trabalhos incluem estudos de polimorfismos cromossômicos (Santos & Valente, 1990; Valente *et al.*, 1993; Regner & Valente, 1993; Valiati & Valente, 1997) aspectos ecológicos (Santos & Valente, 1990; Valiati & Valente, 1996) e comportamentais (Regner & Valente, 1993).

Foi constatado que *D. paulistorum* tem preferência por frutos cítricos e exóticos, enquanto a sua críptica, *D. willistoni*, é encontrada mais freqüentemente em frutos nativos; trata-se, possivelmente, de uma estratégia para evitar competição (Santos & Valente, 1990).

Ao contrário do que foi encontrado para *D. funebris* por Dubinin & Tiniakov (1946a,b, 1947) e Borisov (1969), *D. willistoni* apresentou um gradiente de aumento de heterozigosidade do centro para a periferia em ambientes urbanos de Porto Alegre (Valente *et al.*, 1993). Este fato deve estar relacionado à pressões seletivas graduais impostas pela urbanização. Os dados deste trabalho corroboram a idéia de Townsend (1952) de que existe uma diminuição considerável de variabilidade cromossômica em populações marginais de

Drosophila, pois foi encontrada uma perda de parte de polimorfismos de inversão em populações urbanas quando comparadas a não-urbanas.

Populações de *D. willistoni* analisadas quanto ao comportamento de acasalamento apresentam um aumento na frequência e velocidade da corte e cópula nos locais com um maior nível de urbanização, em relação aos indivíduos de zonas menos urbanizadas (Regner, 1992; Regner & Valente, 1993).

Apesar do ceticismo de Dobzhansky & Powell (1975), os resultados de cruzamentos entre populações marginais e urbanas de *D. willistoni* e *D. paulistorum* mostraram que estas populações possuem indivíduos com genótipos que permitem a formação de híbridos interespecíficos, apesar do forte isolamento sexual entre elas (Winge & Cordeiro, 1960, 1963; Cordeiro, 1968; Cordeiro & Winge, 1995). Recentemente, Valiati (1999) corroborou os achados anteriores encontrando híbridos interespecíficos na F1 de cruzamentos entre linhagens de *D. willistoni* e *D. paulistorum* procedentes do Estado do Rio Grande do Sul. A condição híbrida foi caracterizada por diversos marcadores: citogenéticos, isoenzimáticos, morfológicos e comportamentais. Em experimentos de laboratório foram produzidos híbridos que chegaram à fase adulta, sendo as fêmeas férteis quando retrocruzadas e os machos estéreis (Valiati, 1999). A produção destes híbridos em ambiente urbano pode estar relacionada com o aumento da velocidade de acasalamento relatado por Regner & Valente (1993), onde as fêmeas poderiam acabar aceitando erroneamente a corte de um macho da outra espécie.

Estes resultados demonstram que as populações marginais e urbanas do Sul do Brasil são geneticamente diferenciadas das populações centrais e selvagens e tornam estas populações materiais ricos para estudos de evolução.

1.1. DNA mitocondrial

1.1.1. Características do DNA mitocondrial

O material genético das mitocôndrias é constituído de uma molécula de DNA circular, presente em várias cópias, em geral iguais, mas algumas cópias podem

apresentar diferenças na seqüência de nucleotídeos (heteroplasmia). Existe muita variação no tamanho do DNA mitocondrial (DNAm_t) entre os seres vivos. Via de regra, o genoma mitocondrial de vegetais é grande, com espaçadores e íntrons, podendo chegar a extremos de 2500kb, como é o caso do melão (Brown, 1992). Entretanto, o de animais é enxuto, variando entre 14kb a 16kb. O número de proteínas codificadas também varia muito, chegando a extremos como em *Reclinomonas americana*, com 67 genes codificadores de proteínas, ou como em *Plasmodium falciparum*, com apenas 3 genes codificadores de proteínas (Gray, 1999). Esta pequena quantidade de proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial, comparada com os cerca de 1.600 proteínas do seu possível ancestral α -proteobacteria, pode ser explicada por pelo menos dois modos de perda genética (Berg & Kurland, 2000). Primeiro, a perda de genes não essenciais ou redundantes com o genoma nuclear do hospedeiro. Segundo, pela transferência de genes da mitocôndria para o núcleo. Esta transferência pode ser vantajosa, pois é sabido que genomas assexuados acumulam mutações deletérias e subletais mais rápido que genomas sexuados, estando estes genes mais protegidos no núcleo. Os processos pelos quais a transferência ocorre ainda não são bem compreendidos.

Henze & Martin (2001) revisam os mecanismos possíveis da transferência em plantas. Em alguns casos, os genes encontrados no núcleo não apresentam os íntrons de suas contrapartes mitocondriais, de onde se supõe que a transferência se deu por um intermediário de cDNA. Foi encontrado em *Arabidopsis thaliana* evidências de transferência direta de DNA (Lin *et al.*, 1999; Stupar *et al.*, 2001). Estes pesquisadores encontram no cromossomo 2 desta espécie, uma região de 620kb que representa uma cópia inteira do genoma mitocondrial (de 270kb) com algumas duplicações internas de segmentos grandes. Além disso, esta seqüência é 99% idêntica no nível nucleotídico ao genoma mitocondrial, sugerindo que esta transferência é bem recente.

Seu conteúdo e organização, em animais, são muito conservados. Em geral, o genoma mitocondrial codifica dois RNAs ribossomais, 22 RNAs transportadores e 13 RNAs mensageiros, que codificam enzimas da cadeia respiratória e componentes da membrana interna. Porém muitas enzimas que atuam dentro da

mitocôndria são produzidas pelo núcleo. Excetuando alguns fungos (Grivell, 1983) e algumas plantas (LaRoche, 1997), os genes do DNAm_t não são interrompidos por íntrons. A replicação, a transcrição e a tradução ocorrem dentro da mitocôndria, embora dependa, pelo menos em parte, de produtos codificados pelo genoma nuclear (Wong & Clayton, 1985 e Yiang & Wong, 1991). O estudo dos tRNAs mitocondriais demonstrou que o código genético não é universal, pelo menos entre o genoma nuclear e o genoma mitocondrial. Alguns códons do genoma mitocondrial codificam outros aminoácidos em relação ao código genético do genoma nuclear. Existe também variação entre organismos para o código genético mitocondrial.

O DNAm_t possui várias características distintivas de outros genomas que o tornam um ótimo marcador molecular para estudos filogenéticos e populacionais. O genoma mitocondrial possui um modo direto de transmissão genética, sem recombinação ou outros rearranjos genéticos e, portanto, a determinação dos haplótipos é inequívoca. Ele evolui rapidamente, cerca de 5 a 10 vezes mais rápido que o genoma nuclear, e por ser herdado matrilinearmente, pode ser usado como marcador diferencial entre os sexos para estimar fluxo gênico. Os genomas mitocondrial e nuclear possuem modos de evolução distintos. Powell (1983), estudando isolinhagens de *D. pseudoobscura* e *D. persimilis*, encontrou fluxo gênico citoplasmático na ausência de fluxo gênico nuclear. O autor sugere que os dois genomas estariam sob pressões seletivas diferentes em relação à introgressão dos mesmos.

1.1.2. Polimorfismos de DNA mitocondrial em populações naturais

Levando em consideração o fato do DNAm_t ser haplóide, sem recombinação e ser herdado maternamente, modelos matemáticos foram desenvolvidos especialmente para genomas extranucleares para estimar o grau de polimorfismo em populações naturais (Nei, 1987; Nei & Li, 1979; Nei & Miller, 1990 e Takahata, 1983). A possibilidade de amplificar regiões específicas do genoma mitocondrial, através da técnica de PCR (Mullis, 1990), permite utilizar seqüências de evolução

rápida para análise de polimorfismos nas populações. Técnicas baseadas em PCR para estimar indiretamente a variabilidade de nucleotídeos têm sido amplamente empregadas, como RFLP (polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição, Grodzicker *et al.*, 1974; Nei, 1987) e SSCP (polimorfismos de conformação da fita simples de DNA, Orita *et al.*, 1989), embora, com o avanço das tecnologias de seqüenciamento, muitos trabalhos têm sido realizados com as seqüências obtidas diretamente.

Efeitos estocásticos, como redução do tamanho populacional por eventos de extinção e recolonização, são mais pronunciados no genoma mitocondrial, pois o tamanho efetivo para genes citoplasmáticos é quatro vezes menor do que para genes nucleares (Awise *et al.*, 1984; Ball Jr *et al.*, 1990; Birky Jr. *et al.*, 1983 e Tajima, 1989).

Para polimorfismos de DNA nuclear, demonstrou-se matematicamente que populações de organismos com baixas taxas de migração têm variabilidade menor (Tajima, 1990). Porém, para o DNAm não há necessariamente esta correspondência. Em espécies cuja dispersão é mediada pelas fêmeas, esta relação será verdadeira, mas quando as fêmeas são mais sedentárias do que os machos, ela não é válida. Assim, o DNAm funciona como um marcador de dispersão diferencial entre os sexos. Diversos métodos para estimativa de fluxo gênico (N_m - o número de indivíduos migrantes por geração) baseados em polimorfismos de DNAm foram estabelecidos, por exemplo aqueles baseados nos coeficientes G_{st} (Nei, 1987) e F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) adaptados por Takahata & Palumbi (1985) e por Weir (1990), respectivamente. Ignorando-se as mutações e considerando que haja equilíbrio entre migração e deriva genética, é esperado que F_{ST} (ou qualquer estimador equivalente como G_{ST}) seja igual a $1/(4N_m+1)$ para cromossomos autossômicos e $1/(N_m+1)$ para marcadores uniparentais como o mtDNA. Além disso, Slatkin & Maddison (1989 e 1990) utilizaram o conceito de filogenias de alelos (Awise *et al.*, 1987) como um método alternativo de estimar N_m .

1.1.3. Evolução do DNA mitocondrial

Simon *et al.* (1994) apresentam uma revisão da evolução de seqüências de DNA mitocondrial, bem como sua utilidade para a construção de árvores filogenéticas. Os genes do DNA mitocondrial evoluem de acordo com a sua estrutura e função.

Os genes ribossomais mitocondriais são mais simples do que os genes ribossomais nucleares. Sítios altamente conservados estão associados com regiões onde se ligam as proteínas ribossomais, onde ocorre a ligação de tRNA e do núcleo de hélices (Noller *et al.*, 1990). Os domínios dos rRNAs evoluem em taxas diferentes, dependendo da sua função. Por exemplo, no rRNA 12S, a metade 5' (domínios 1 e 2) tem muito menos seqüências de nucleotídeos conservados do que a metade 3' (domínios 3 e 4) (Clary & Wolstenholme, 1985; De Rijk *et al.*, 1993; Van de Peer *et al.*, 1993).

Os genes de RNA transportadores mitocondriais são menos rígidos em função e estrutura do que suas contrapartes nucleares e, por isso, evoluem em taxas mais altas (Wilson *et al.*, 1985). Contudo, tRNAs mitocondriais evoluem mais devagar do que genes mitocondriais codificantes de proteínas (Bibb *et al.*, 1981; Wolstenholme & Clary, 1985; Kumazawa & Nishida, 1993). Gadaleta *et al.* (1989) mostraram que o grau de conservação de diferentes regiões funcionais dentro dos tRNAs variava, sendo a mais conservada a alça do anti-códon. A metade 5' é mais conservada que a metade 3' e o número de nucleotídeos que compõe o tronco de cada tRNA também é altamente conservado (Kumazawa & Nishida, 1993). Diferenças de tamanho e seqüência têm sido encontradas nos laços D e T (Wolstenholme *et al.*, 1987). A taxa de evolução varia entre os diferentes tRNAs. Comparando um lepidóptero com uma mosca, Pashley & Ke (1992) constataram que para o tRNA valina, apenas 20% dos sítios apresentavam diferenças, enquanto que para o tRNA leucina, 35% dos sítios eram diferentes. Este tipo de diferença também foi encontrado por Nigro *et al.* (1991) ao estudar três tRNAs de sete diferentes espécies de *Drosophila* do grupo *melanogaster*. Ojala *et al.* (1981) propõem que isto pode ocorrer como resultado do fato de que

tRNAs adjacentes a genes codificantes de proteínas desempenham um papel no processamento das proteínas.

O DNA mitocondrial de animais apresenta poucas regiões não-codificantes. Uma exceção é a região controladora (ou região rica em A+T), responsável pela origem da replicação. Esta região é hipervariável e usada para analisar eventos muito recentes de divergência evolutiva. Porém, como é rica em A+T, a taxa de substituições múltiplas deve ser alta e de difícil detecção, por possuir apenas dois nucleotídeos disponíveis para substituições. Além disso, apresenta uma grande variação de comprimento, que é causada, provavelmente, pela presença ou ausência de blocos de seqüências repetidas (Rand & Harrison, 1989). O número de repetições pode fornecer informações úteis para estudos filogenéticos.

Em genes mitocondriais codificantes de proteínas, posições silenciosas do códon variam mais do que em genes nucleares, porque um padrão de reconhecimento de códons expandido permite que um único tRNA possa decodificar 4 códons (Gray, 1989). Genes que possuem mais códons quatro vezes degenerados do que códons duas vezes degenerados evoluem mais rápido. Sítios silenciosos evoluem em taxas similares entre os diferentes genes, embora as taxas de substituição de aminoácidos variem substancialmente (Nigro *et al.*, 1991).

O gene da citocromo c oxidase subunidade I (COI) possui algumas características que o tornam adequado como marcador molecular para estudos evolutivos (Lunt *et al.* 1996). Primeiro, COI tem sido relativamente bem estudado bioquimicamente e o seu tamanho e estrutura parecem ser conservados em todos os organismos investigados (Saraste, 1990). Estudos de mutantes têm sido usados para mapear os centros ativos da subunidade (Gennis, 1992), o que permite relacionar a evolução de seqüências com a função na proteína. Resíduos de aminoácidos nos centros ativos, que são altamente conservados, não dominam toda a molécula de COI, permitindo variação em algumas regiões. Segundo, COI é o maior gene das subunidades da citocromo c oxidase, e tem praticamente o dobro do tamanho comparado com as subunidades II e III (Clary & Wolstenholme, 1985). Vários estudos utilizando o gene da COI têm sido

realizados para testar hipóteses filogenéticas em diversos grupos de drosofilídeos. Alguns exemplos são encontrados com o grupo da *Drosophila saltans* (O'Grady *et al.*, 1998), da *Drosophila obscura* (O'Grady, 1999), da *Drosophila takahashii* e *montium* (Goto *et al.*, 2000), da *Drosophila buzzatii* (Manfrin, 2001). Goto & Kimura (2001) salienta a utilidade deste marcador para o estabelecimento da filogenia de *Drosophila melanogaster*. De Brito *et al.* (2002) realizaram uma análise cladística de populações de *Drosophila serido* utilizando seqüências deste gene. Com isso, os autores verificaram um evento antigo de fragmentação, separando populações da região central e nordeste do Brasil das populações da região central e sul do Brasil. Este trabalho ajudou a traçar um panorama histórico da evolução e distribuição deste táxon.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

1. Analisar a variabilidade do DNA mitocondrial através do gene da citocromo c oxidase em populações naturais de *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* de distribuição selvagem, marginal e urbana.
2. Avaliar o potencial taxonômico do gene COI como marcador molecular para distinguir as duas espécies crípticas.
3. Caracterizar a história filogeográfica do par de espécies na sua área de distribuição.

3. Material e Métodos

3.1 Material Biológico

As moscas utilizadas no presente trabalho foram coletadas em três locais nas cidades de Porto Alegre (Parque Farroupilha e Jardim Botânico) e Viamão (Parque Estadual de Itapuã). Também foram coletadas moscas no Parque Gabriel Knijnik, mas os resultados obtidos não são apresentados neste trabalho (Anexo I). As coletas foram trimestrais entre abril e setembro de 2002. Insetos sobrevoando frutos fermentados foram coletados com rede entomológica, e em laboratório foram realizadas a identificação e separação dos mesmos. Amostras de frutos fermentados foram também coletadas e armazenadas em tubos de vidro com vermiculita em câmara à 25^o C. Conforme as moscas eclodiam, estas foram também identificadas e separadas. Fêmeas adultas do grupo *willistoni* foram separadas e colocadas uma à uma em diferentes tubos de vidro com meio de cultura, estabelecendo-se assim linhagens iso-fêmeas.

Também foram utilizadas moscas mantidas em laboratório de diferentes procedências (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Local de coleta e código das linhagens mantidas em laboratório utilizadas.

Espécie	Local de Coleta	Código	Ano de Coleta
<i>D. willistoni</i>	Ilha de Ratones Grande, Santa Catarina	DWsc	1997
<i>D. willistoni</i>	Ribeirão Preto, São Paulo	DWrib	1995
<i>D. willistoni</i>	Belém, Pará	DWpara	1997
<i>D. willistoni</i>	Apazapan, México	DWmex	1998
<i>D. willistoni</i>	Coronilla, Uruguai	DWcor	1994
<i>D. paulistorum</i> + (semi-espécie Amazônica)	Belém, Pará	DPamazonica	*
<i>D. paulistorum</i> + (semi-espécie Interior)	Llanos, Colômbia	DPinterior	1958
<i>D. paulistorum</i> + (semi-espécie Orinocana)	Georgetown, Guiana Britânica	DPorinocana	*

+ Linhagens gentilmente cedidas pela Dra. Lee Ehrman (Division of Natural Sciences, New York, USA)

* Linhagens mantidas em laboratório há mais de 40 anos

3.2 Eletroforese da enzima fosfatase ácida

O reconhecimento das duas espécies crípticas recém coletadas foi feito através do padrão eletroforético da enzima fosfatase ácida (*Acph*) que apresenta alelos diagnósticos das diferentes espécies (Figura 3.1), e confirmados por citogenética dos padrões de bandas dos cromossomos politênicos da prole pela doutoranda Ana Lauer Garcia (Figura 3.2).

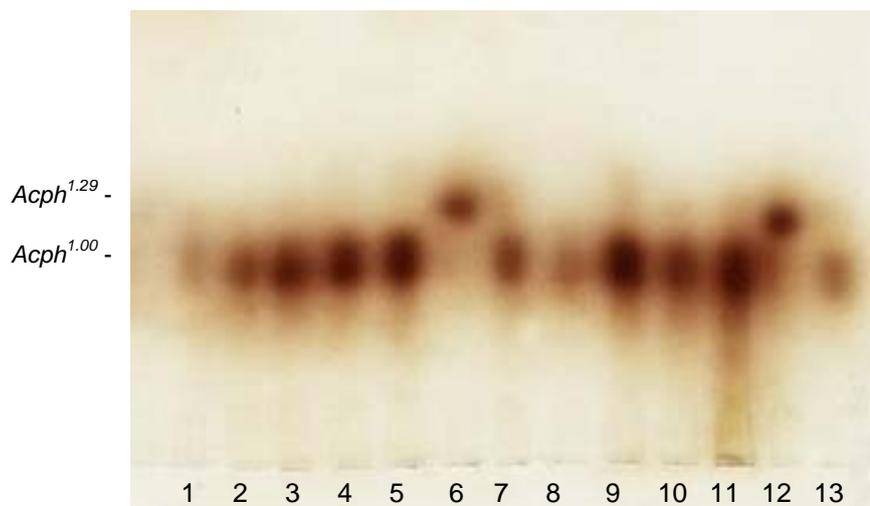


Figura 3.1: Revelação do sistema da fosfatase ácida em gel de poliacrilamida 6% em tampão Huttel & Bush (1972) mostrando a separação das espécies. 1-5 e 7-11 *D. willistoni*; 6 *D. paulistorum*; 12 *D. paulistorum* controle; 13 *D. willistoni* controle.

A determinação das espécies foi feita por eletroforese da fosfatase ácida (*Acph*). Valiati (1999) demonstrou que este sistema pode ser usado como diagnóstico entre as duas espécies. Em populações do sul do Brasil, todas as *D. willistoni* estudadas eram homozigotas para o alelo lento, *Acph*^{1.00}, e todas as *D. paulistorum* estudadas eram homozigotas para o alelo rápido, *Acph*^{1.29}.

Para a realização da eletroforese, as amostras, em tampão Huettel & Bush (1972), foram aplicadas em gel de acrilamida 6% e incubadas por uma hora em ácido bórico 0,25M. Os géis foram corados com 0,05g de corante fast blue RR, 0,05g de α -naftil fosfato ácido de sódio em 100ml de tampão acetato 0,2M pH 5,0 por uma hora e meia, a 37°C.

Drosophila willistoni

Drosophila paulistorum

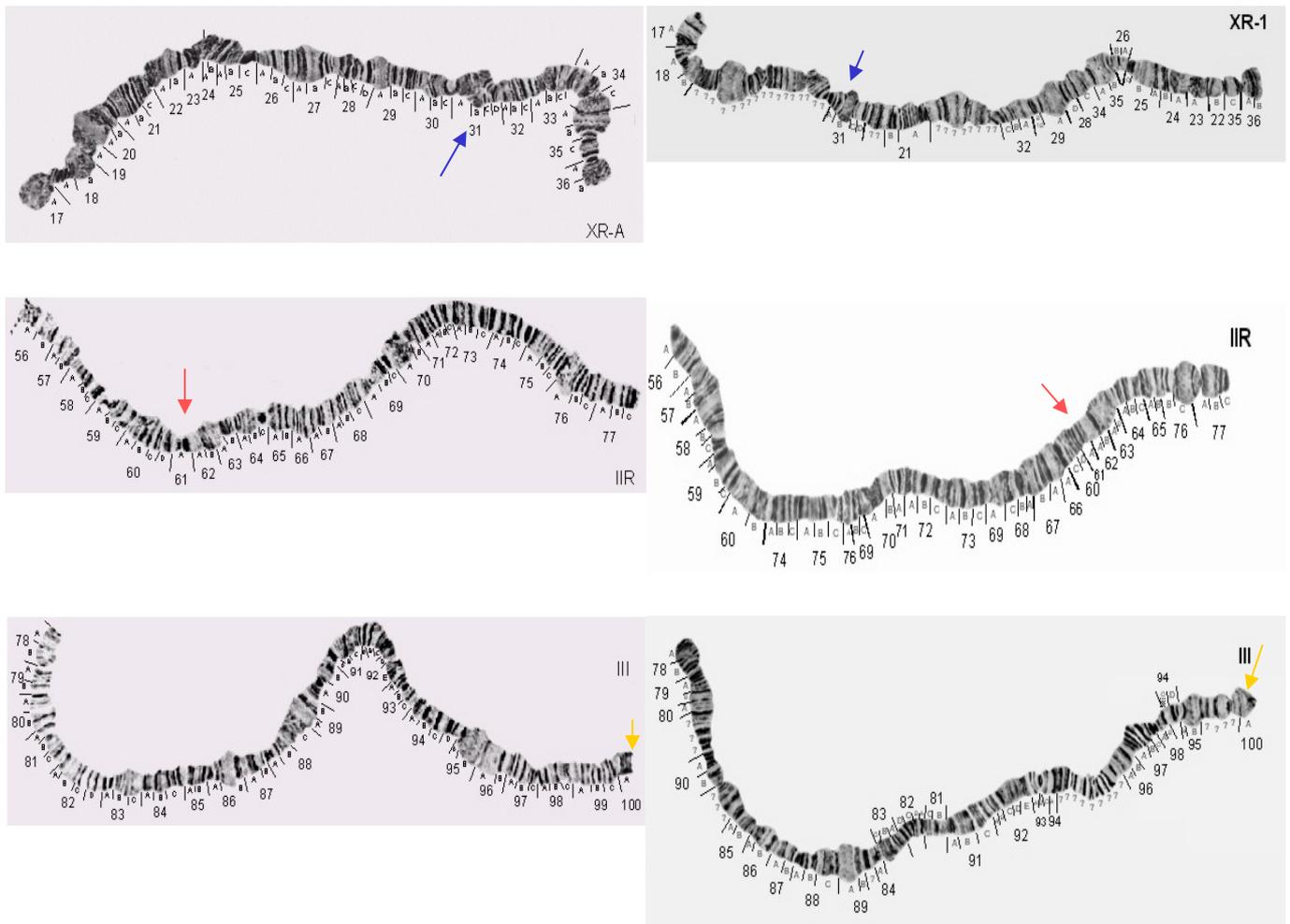


Figura 3.2: Fotomapa dos cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* Rohde (2000) e *Drosophila paulistorum* Garcia (2002). As setas indicam os locais diagnósticos para diferenciar as duas espécies.

3.3 Extração de DNA genômico

O DNA total foi extraído a partir de moscas adultas. Cerca de 4 moscas adultas de uma mesma isolinhagem foram maceradas e incubadas à 55°C por uma hora e meia em tampão de lise (100mM Tris HCl; 100mM EDTA; SDS 1%; 60mM NaCl) e 0,11mg/ml de proteinase K. Logo após, foram tratadas com 0,013mg/ml de RNase por 30 minutos à 37°C. A extração foi feita com acetato de amônio 2,6M, centrifugando-se as amostras por 20min a 13000rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi então precipitado em 1 volume de isopropanol e ressuspenso em 20ml de água MiliQ. A quantificação foi feita em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e, como padrão de comparação, foi utilizado DNA de fago λ (Life Technologies).

3.4 Amplificação por PCR do gene citocromo c oxidase subunidade I

Inicialmente, foram testados outros marcadores (Anexo II), mas, após alguns testes, escolheu-se trabalhar com o gene da COI.

Os iniciadores para a PCR foram desenhados a partir da seqüência de *D. yakuba* (Clary *et al.*, 1982; número de acesso no GenBank: NC_001322). Para a amplificação do gene inteiro da COI foram utilizados iniciadores que anelam em genes adjacentes ao mesmo. A seqüência dos iniciadores é:

Tyr1435-F 5' TAC AAT CTA TCG CCT AAA CT 3' (Tm=51,2°C)

Leu3023-R 5' TAA ATC CAT TGC ACT AAT CT 3' (Tm=49,1°C)

As PCRs foram realizadas em volume final de 60 μ l, utilizando 20pMol de cada iniciador, 1mM de MgSO₄ e 1,2 unidades de Platinum® Pfx Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Além de possuir especificidade aumentada em relação à Taq DNA polimerase recombinante comum, esta polimerase é efetiva para amplificar fragmentos maiores, de até 5kb. Esta enzima possui mecanismo de correção de erro 3'-5', tendo uma baixíssima taxa de incorporação errônea. A

desnaturação inicial foi realizada a 94° C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores à 48° C por 30 segundos e extensão à 68° C por 1 minuto e meio.

3.5 Seqüenciamento

Os produtos da PCR do gene COI, após terem sido purificados em colunas GFX (Amersham Pharmacia), foram enviados ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade da Califórnia, Irvine sob os cuidados da Dra. Karen Haag, para o seqüenciamento automático.

A estratégia de seqüenciamento utilizada encontra-se esquematizada na Figura 3.3.

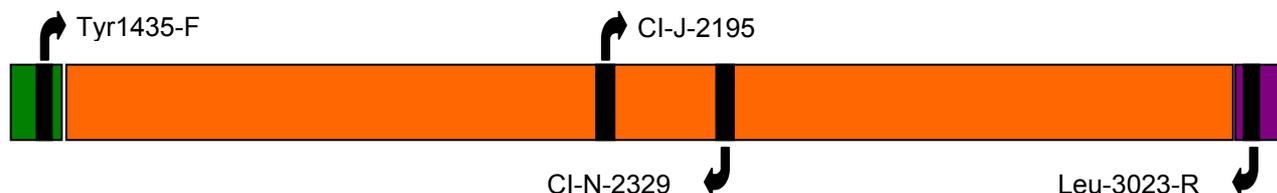


Figura 3.3: Esquema da estratégia de seqüenciamento em quatro etapas.

■ tRNA tirosina ■ COI ■ tRNA leucina ■ iniciadores

3.6 Análise dos Dados

3.6.1 Edição e Alinhamento das Seqüências

Para testar a qualidade do seqüenciamento foi utilizada a ferramenta *on-line* Electropherogram Quality Analysis do Laboratório de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília (<http://bioinformatica.ucb.br/electro.html>). Esta análise preliminar ajudou na edição visual das seqüências usando o programa

BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999). O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando o programa Clustal X 1.8.

3.6.2 Análise do Polimorfismo das Populações

O polimorfismo das populações estudadas foi analisado segundo diversos modelos utilizando o programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001).

O modelo de distância utilizado foi o de Kimura 2 Parâmetros. Foi calculado o número médio de substituições nucleotídicas para um par de alelos escolhidos ao acaso dentro de uma população (d_X), o número médio de substituições nucleotídicas por sítio entre alelos de duas populações (d_{XY}) e o número líquido de substituições entre duas populações (d_A).

Também foram calculadas estimativas análogas à Estatística G e F. Foram computados os valores de π_S (diversidade nucleotídica média dentro das populações), de π_T (diversidade nucleotídica da população inteira) e de N_{ST} (coeficiente de diferenciação nucleotídica).

Os erros padrões de todas as estimativas foram calculados segundo o método de *bootstrap* com 1000 repetições.

3.6.3 Testes de Seleção

O Teste D de Tajima foi realizado no programa DnaSP 3.51 (Rozas & Rozas, 1999). O intervalo de confiança de 95% para esta estatística foi obtido a partir de mil simulações de coalescência a partir do valor observado de θ .

Para testar seleção positiva foi utilizado o método para Amostras Pequenas (valores pequenos de substituições nucleotídicas por seqüência). Para tanto, utiliza-se o Teste Exato de Fisher (Zhang *et al.* 1997), construindo uma tabela de contingência 2x2 com os números de substituições sinônimas (Sd) e não-sinônimas (Nd) e os sítios sinônimos e não sinônimos onde não foram observadas

substituições ($S - Sd$ e $N - Nd$, respectivamente). O teste é unilateral e a hipótese nula é a de seleção neutra (estritamente neutra ou seleção purificadora). Valores de $P < 0,05$ indicam seleção positiva. Este teste foi realizado utilizando o programa Mega 2.1. (Kumar *et al.* 2001)

3.6.4 Análise Filogenética

As inferências filogenéticas foram realizadas usando três métodos diferentes no programa PAUP*v4.0.b10. Em todas as análises foram utilizadas como grupo externo as seqüências de *D. melanogaster* e *D. yakuba* retiradas do GenBank (números de acesso: NC_001709 e NC_001322, respectivamente). A árvore de *Neighbor-Joining* foi feita com distâncias Kimura 2 parâmetros e a confiança de cada ramo foi testada com 1.000 repetições de *bootstrap*. A Máxima Parcimônia foi feita com busca heurística e *bootstrap* de 1.000 repetições. A Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo HKY85 (Hasegawa *et al.*, 1985) sem correção *gamma*, também foi realizada com busca heurística, mas devido às dificuldades computacionais do método, o *bootstrap* foi realizado com 100 repetições.

4. Resultados

4.1 Resultados das Coletas

Foram realizadas um total de três coletas em cada local. No Jardim Botânico foi encontrada a maior abundância e diversidade de recursos (*Butia eriospatha*, *Averrhoa carambola*, *Citrus sinensis*, *Monstera deliciosa* e *Syagrus romanzoffiana*) e foi o local onde se obteve o maior número de isolinhagens (212 isolinhagens). Em Itapuã, os recursos foram também abundantes, mas em menor diversidade (duas espécies do gênero *Passiflora*, *Campomanesia* sp. e *Butia eriospatha*) dos quais foram obtidas 66 isolinhagens. Já no Parque Farroupilha encontrou-se poucos recursos (apenas dois, *Macrura pomifera* e *Butia eriospatha*) e em pouca quantidade, e foi o local onde se obteve o menor número de isolinhagens (9 isolinhagens). A Tabela 4.1 mostra a proporção de *D. willistoni* e *D. paulistorum* nos diferentes locais de coleta comparada com os valores obtidos por Valiati & Valente (1996). Nota-se uma grande discrepância nos valores obtidos no presente trabalho e por aqueles autores. Após a primeira visita aos locais, a baixa frequência de *D. paulistorum* foi identificada e nas demais coletas deu-se maior ênfase à coleta de frutos exóticos e cítricos, onde esta espécie é mais abundante. Mesmo adotando-se esta estratégia, o número de isolinhagens de *D. paulistorum* obtidos foi muito baixo.

Tabela 4.1: Proporção de *D. willistoni* e *D. paulistorum* nos diferentes pontos em coletas de 2003 e 1996

	Presente Trabalho		Valiati & Valente(1996)*	
	% <i>D. willistoni</i>	% <i>D. paulistorum</i>	% <i>D. willistoni</i>	% <i>D. paulistorum</i>
Parque Farroupilha	100 (9)	0 (0)	47,2	52,80
Jardim Botânico	96,70 (205)	3,30 (7)	23,63	76,37
Itapuã	96,97 (64)	3,03 (2)	-	-

Números absolutos entre parênteses. * Dados modificados de Valiati & Valente (1996)

4.2 PCR e Purificação das amostras para seqüenciamento

As condições da PCR foram otimizadas em relação ao número de ciclos e temperatura de anelamento. A Figura 4.1 mostra um gel de agarose com as diferentes condições testadas. Primeiramente utilizou-se 35 ciclos e temperatura de anelamento de 50°C (amostras 7 a 10), porém a quantidade de produto obtido foi insatisfatória. Aumentou-se, então, o número de ciclos para 35 e conseguiu-se assim uma quantidade maior de produto (amostras 5 e 6). Porém, quantidades realmente satisfatórias foram obtidas quando se manteve o número de ciclos em 35 e se diminuiu a temperatura de anelamento para 47° C (amostras 1 a 4). Para os testes foram utilizados DNAs de *D. willistoni* e *D. paulistorum* de linhagens mantidas em laboratório.

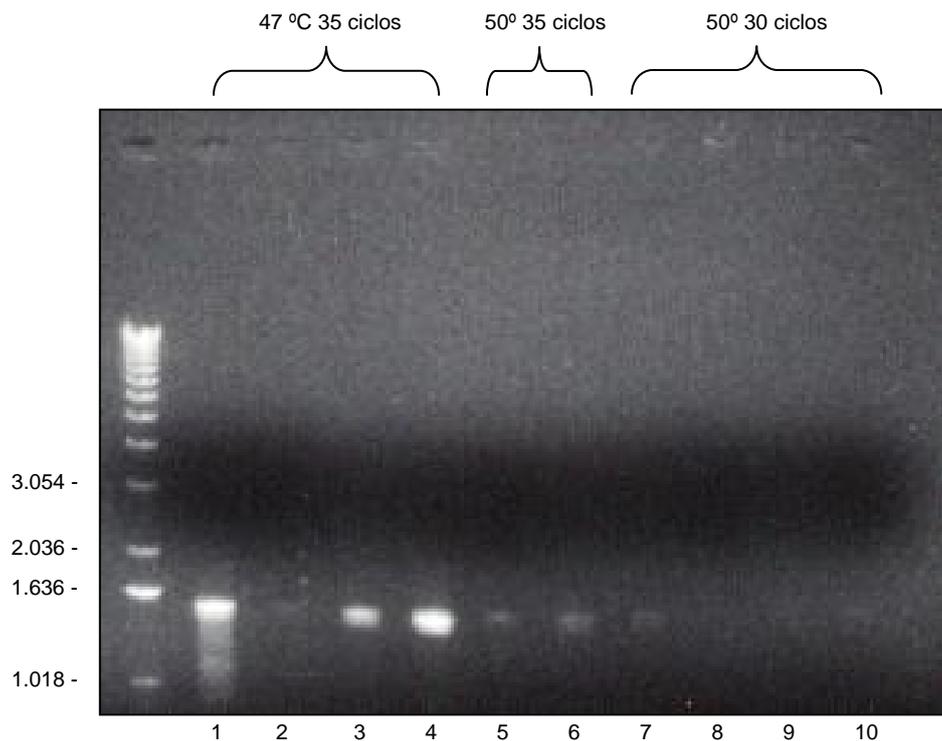


Figura 4.1: Diferentes condições da PCR em gel de agarose 1,0%. Os números à esquerda referem-se aos tamanhos (em kb) de alguns fragmentos do marcador DNA Ladder 1kb. 1, 2, 5, 7 e 8: DNA de *D. willistoni*; 3, 4, 6, 9 e 10: DNA de *D. paulistorum*.

Apenas uma banda foi observada, portanto, os produtos da PCR puderam ser purificados diretamente através de colunas GFX.

4.3 Edição e Alinhamento das Seqüências Obtidas

A Tabela 4.2 mostra as linhagens e os códigos utilizados nas análises das seqüências estudadas.

Embora em algumas corridas tenha-se conseguido uma leitura mais extensa, obteve-se um fragmento de 1413 nucleotídeos para todos os indivíduos seqüenciados. Este fragmento corresponde a 92% do gene da COI completo. Apesar de não ter sido possível obter a seqüência inteira do gene, a posição dos códons foi confirmada pelo alinhamento de seqüências deste gene depositadas no GenBank para outros drosofilídeos. Além disso, apenas uma das três possibilidades não gerava códons de terminação. A Figura 4.2 mostra o alinhamento de todas as seqüências produzidas e as dos grupos externos utilizados, bem como os sítios informativos para a análise da máxima parcimônia. Esta região é rica em A+T (29,55% e 39,95%, respectivamente). O conteúdo médio de G foi de 15,72% e de C foi 14,78%.

Tabela 4.2 Linhagem, procedência e código das moscas utilizadas para o sequenciamento

Linhagem	Procedência	Código	Linhagem	Procedência	Código
<i>Drosophila paulsitorum</i>			<i>Drosophila willistoni</i>		
Linhagem 58	Itapuã	DPita58	Linhagem 3	Itapuã	DWita3
Linhagem 27	Jardim Botânico	DPjb27	Linhagem 4	Itapuã	DWita4
Linhagem 76	Jardim Botânico	DPjb76	Linhagem 4	Itapuã	DWita5
Linhagem 81	Jardim Botânico	DPjb81	Linhagem 7	Itapuã	DWita7
Linhagem 134	Jardim Botânico	DPjb134	Linhagem 52	Itapuã	DWita52
Linhagem 162	Jardim Botânico	DPjb162	Linhagem 53	Itapuã	DWita53
Linhagem 166	Jardim Botânico	DPjb166	Linhagem 54	Itapuã	DWita54
Linhagem 195	Jardim Botânico	DPjb195	Linhagem 55	Itapuã	DWita55
<i>Drosophila willistoni</i>			Linhagem 56	Itapuã	DWita56
Linhagem 25	Jardim Botânico	DWjb25	Linhagem 57	Itapuã	DWita57
Linhagem 26	Jardim Botânico	DWjb26	Linhagem 1	Parque Farroupilha	DWpf1
Linhagem 30	Jardim Botânico	DWjb30	Linhagem 2	Parque Farroupilha	DWpf2
Linhagem 31	Jardim Botânico	DWjb31	Linhagem 3	Parque Farroupilha	DWpf3
Linhagem 32	Jardim Botânico	DWjb32	Linhagem 4	Parque Farroupilha	DWpf4
Linhagem 33	Jardim Botânico	DWjb33	Linhagem 5	Parque Farroupilha	DWpf5
Linhagem 34	Jardim Botânico	DWjb34	Linhagem 6	Parque Farroupilha	DWpf6
Linhagem 35	Jardim Botânico	DWjb35	Linhagem 7	Parque Farroupilha	DWpf7
Linhagem 36	Jardim Botânico	DWjb36	Linhagem 9	Parque Farroupilha	DWpf9
Linhagem 37	Jardim Botânico	DWjb37			

```

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
      20          40          60          80          100          120
DWjb25 : TTTTGGAGCATGAGCCGGAATAGTAGGAACATCTCTAAGAATTTTAATTTCGAGCCGAACTGGACACCTGGAGCATTAAATTGGTGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCA : 120
DWjb26 : ..... : 120
DWjb30 : ..... : 120
DWjb31 : ..... : 120
DWjb32 : ..... : 120
DWjb33 : ..... : 120
DWjb34 : ..... : 120
DWjb35 : ..... : 120
DWjb36 : ..... : 120
DWjb37 : ..... : 120
DWpf1 : ..... : 120
DWpf2 : ..... : 120
DWpf3 : ..... : 120
DWpf4 : .....G..... : 120
DWpf5 : .....T..... : 120
DWpf6 : ..... : 120
DWpf7 : .....C..... : 120
DWpf9 : ..... : 120
DWita3 : ..... : 120
DWita4 : ..... : 120
DWita5 : ..... : 120
DWita7 : ..... : 120
DWita52 : .....C..... : 120
DWita53 : ..... : 120
DWita54 : ..... : 120
DWita55 : ..... : 120
DWita56 : ..... : 120
DWita57 : ..... : 120
DWcor : .....G..... : 120
DWsc : ..... : 120
DWrib : ..... : 120
DWpara : ..... : 120
DWmex : ..... : 120
DPjb27 : .....T.....C.....T..... : 120
DPjb76 : .....T.....C.....T..... : 120
DPjb81 : .....T.....C.....T..... : 120
DPjb134 : .....T.....C.....T..... : 120
DPjb162 : .....T.....C.....T..... : 120
DPjb166 : .....T.....C.....T..... : 120
DPjb195 : .....T.....C.....T..... : 120
DPita58 : .....C.....T.....C.....T..... : 120
DPinterior : .....G.....T.....C.....T..... : 120
DPorinocana : .....T.....C.....T..... : 120
DPamazonica : .....T.....G.....C.....T..... : 120
Dyakuba : .....T.....A...T.A..T..T..A...A...T..A... : 120
Dmelanogaster : .....T...T...T...T...T...T.A...T...T...A...A...T..A... : 120

```

Figura 4.2: Alinhamento de todas as seqüências analisadas (conforme Tabela 3.1 e 4.2) realizado no Clustal X 1.8.

* Sítios informativos para parcimônia

```

*          *          *          * *          * * *          * *          * * *          * * *
140          160          180          200          220          240
DWjb25 : CGCTTTTATTATGATTTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTTATATTAGGGGCACCTGATATAGCTTCCCTCGAATAAATAATATAAG : 240
DWjb26 : ..... : 240
DWjb30 : ..... : 240
DWjb31 : ..... : 240
DWjb32 : ..... : 240
DWjb33 : ..... : 240
DWjb34 : .....T..... : 240
DWjb35 : ..... : 240
DWjb36 : ..... : 240
DWjb37 : ..... : 240
DWpf1 : ..... : 240
DWpf2 : ..... : 240
DWpf3 : ..... : 240
DWpf4 : ..... : 240
DWpf5 : ..... : 240
DWpf6 : ..... : 240
DWpf7 : ..... : 240
DWpf9 : .....A..... : 240
DWita3 : ..... : 240
DWita4 : ..... : 240
DWita5 : ..... : 240
DWita7 : ..... : 240
DWita52 : ..... : 240
DWita53 : ..... : 240
DWita54 : ..... : 240
DWita55 : ..... : 240
DWita56 : .....A..... : 240
DWita57 : ..... : 240
DWcor : ..... : 240
DWsc : ..... : 240
DWrib : ..... : 240
DWpara : ..... : 240
DWmex : ..... : 240
DPjb27 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPjb76 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPjb81 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPjb134 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPjb162 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPjb166 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPjb195 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPita58 : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPinterior : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPorinocana : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
DPamazonica : .....G.C.....G.T.A.....A.....C.....T..... : 240
Dyakuba : T.....A.....T.....G.G.....G.T.A.....A.T.....C.....A.....A..... : 240
Dmelanogaster : T.....A.....T.G.T.....T.....G.T.A.....T.T.....A.....A..... : 240

```

Figura 4.2: Continuação.

```

*          * *          * * * *          *          *          *          *          *          *          *
          260          280          300          320          340          360
DWjb25 : TTTTGGACTTCTTCCTCCTGCTTTTATCTCTTTTATTAGTAAGAAGTATAGTTGAAAATGGAGCTGGAACAGGTTGAACAGTTTACCCACCTTTATCAGCAGGAATTGCTCATGGAGGAGC : 360
DWjb26 : ..... : 360
DWjb30 : ..... : 360
DWjb31 : ..... : 360
DWjb32 : ..... : 360
DWjb33 : ..... : 360
DWjb34 : ..... : 360
DWjb35 : ..... : 360
DWjb36 : ..... : 360
DWjb37 : ..... : 360
DWpf1 : ..... : 360
DWpf2 : ..... : 360
DWpf3 : ..... : 360
DWpf4 : ..... : 360
DWpf5 : ..... : 360
DWpf6 : ..... : 360
DWpf7 : ..... : 360
DWpf9 : ..... : 360
DWita3 : ..... : 360
DWita4 : ..... : 360
DWita5 : ..... : 360
DWita7 : ..... : 360
DWita52 : ..... : 360
DWita53 : ..... : 360
DWita54 : ..... : 360
DWita55 : ..... : 360
DWita56 : ..... : 360
DWita57 : ..... : 360
DWcor : ..... : 360
DWsc : ..... : 360
DWrib : ..... : 360
DWpara : ..... : 360
DWmex : ..... : 360
DPjb27 : .....T.....C.....G..... : 360
DPjb76 : .....T.....C.....G..... : 360
DPjb81 : .....T.....C.....G..... : 360
DPjb134 : .....T.....C.....G..... : 360
DPjb162 : .....T.....C.....G..... : 360
DPjb166 : .....T.....C.....G..... : 360
DPjb195 : .....T.....C.....G..... : 360
DPita58 : .....T.....C.....G..... : 360
DPinterior : .....T.....C.....G..... : 360
DPorinocana : .....T.....C.....G..... : 360
DPamazonica : .....T.....C.....G..... : 360
Dyakuba : A.....T.A.A.....C.T...T.A.....A.....C.....T.....T.....T.....TT...T.C.....T..... : 360
Dmelanogaster : A.....A.A.....C.T...T.AC.....T.A.....A.....T.....T.....C.T.....T..... : 360

```

Figura 4.2: Continuação.

	* * * *	** *	**	*		
	500	520	540	560	580	600
DWjb25	: ACCTTTATTTGTTTGATCAGTTGTAATTACAGCTTTATTATTATTATTATCTTTACCAGTTTACGCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAACACTTCTTTTTTTGA	:	:	:	:	600
DWjb26	:	:	A	:	:	600
DWjb30	:	:	:	:	:	600
DWjb31	:	:	:	:	:	600
DWjb32	:	:	A	:	:	600
DWjb33	:	:	:	:	:	600
DWjb34	.G	:	:	:	:	600
DWjb35	:	:	:	:	:	600
DWjb36	:	:	:	:	:	600
DWjb37	:	:	:	:	:	600
DWpf1	:	:	:	:	:	600
DWpf2	:	:	:	:	:	600
DWpf3	.G	:	:	:	:	600
DWpf4	.G	:	:	:	:	600
DWpf5	:	:	:	:	:	600
DWpf6	:	:	:	:	T	600
DWpf7	:	:	:	:	:	600
DWpf9	:	:	:	:	:	600
DWita3	:	:	:	:	T	600
DWita4	.G	:	:	:	:	600
DWita5	:	:	:	:	:	600
DWita7	:	:	:	:	:	600
DWita52	:	:	:	:	:	600
DWita53	:	:	A	:	:	600
DWita54	:	:	:	:	:	600
DWita55	:	:	:	:	:	600
DWita56	:	:	:	:	:	600
DWita57	:	:	:	:	:	600
DWcor	:	:	:	:	:	600
DWsc	:	:	:	:	:	600
DWrib	G	:	:	:	T	600
DWpara	:	:	:	:	T	600
DWmex	:	:	:	:	T	600
DPjb27	:	:	A	A	CC	600
DPjb76	:	:	A	A	C	600
DPjb81	:	:	A	A	T	600
DPjb134	:	:	A	A	C	600
DPjb162	.C	:	A	A	C	600
DPjb166	:	:	A	A	C	600
DPjb195	:	:	A	A	C	600
DPita58	:	:	A	A	C	600
DPinterior	:	:	A	A	C	600
DPorinocana	:	:	A	A	C	600
DPamazonica	:	G	A	A	CC	600
Dyakuba	.A	.A	.T	.T	.C	600
Dmelanogaster	.A	.T	.T	.C	.T	600

Figura 4.2: Continuação.

	* *	620	640	* *	660	680	* *	700	* *	720	
DWjb25	:	CCCTGCTGGAGGAGAGATCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGGATTTTGGTCATCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTACCTGGATTGGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGA	:		:		:		:		720
DWjb26	:	:		:		:		:		720
DWjb30	:	:		:		:		:		720
DWjb31	:	:		:		:		:		720
DWjb32	:	:		:		:		:		720
DWjb33	:	:		:		:		:		720
DWjb34	:	:		:		:		:		720
DWjb35	:	:		:		:		:		720
DWjb36	:	:		:		:		:		720
DWjb37	:	:		:		:		:		720
DWpf1	:	:		:		:		:		720
DWpf2	:	:		:		:		:		720
DWpf3	:	:		:		:		:		720
DWpf4	:	:		:		:		:		720
DWpf5	:	:		.C.		:		:		720
DWpf6	:	:			:		:		720
DWpf7	:	:			:		:		720
DWpf9	:	:			:		:		720
DWita3	:	:			:		:		720
DWita4	:	:			:		:		720
DWita5	:	:			:		:		720
DWita7	:	:			A.		:		720
DWita52	:	:			:		720
DWita53	:	:			:		720
DWita54	:	:			:		720
DWita55	:	:			:		720
DWita56	:	:			:		720
DWita57	:	:			:		720
DWcor	:	:			:		720
DWsc	:C.			:		720
DWrib	:		A.		:		720
DWpara	:		:		720
DWmex	:		:		720
DPjb27	:	A.	C.	C.		720
DPjb76	:	T.	A.	C.	C.		720
DPjb81	:	T.	A.	C.	C.		720
DPjb134	:	T.	A.	C.	C.		720
DPjb162	:	T.	A.	C.	C.		720
DPjb166	:	T.	A.	C.	C.		720
DPjb195	:	T.	A.	C.	C.		720
DPita58	:	T.	C.	GA.	C.	C.	720
DPinterior	:	T.	A.	C.	C.		720
DPorinocana	:	C.		A.	C.	C.		720
DPamazonica	:	A.	A.	C.	C.	720
Dyakuba	:	T.	A.	G.	C.	T.	A.	720
Dmelanogaster	:	A.	G.	T.	C.	T.	A.	720

Figura 4.2: Continuação.


```

* * * * *
860 880 900 920 940 960
DWjb25 : CCGGGCTTACTTCACATCTGCAACTATAATTATTGCTGTACCAACTGGAATTAATAATTTTAGTTGATTAGCCACATTACATGGAACCAATTATCTTATTCTCCTGCAATTCCTTGAGC : 960
DWjb26 : ..... : 960
DWjb30 : T..... : 960
DWjb31 : .....G..... : 960
DWjb32 : .....G..... : 960
DWjb33 : T..... : 960
DWjb34 : ..... : 960
DWjb35 : .....T..... : 960
DWjb36 : T..... : 960
DWjb37 : ..... : 960
DWpf1 : ..... : 960
DWpf2 : ..... : 960
DWpf3 : .....G..... : 960
DWpf4 : .....G..... : 960
DWpf5 : T..... : 960
DWpf6 : ..... : 960
DWpf7 : .....G..... : 960
DWpf9 : ..... : 960
DWita3 : ..... : 960
DWita4 : .....G..... : 960
DWita5 : .....G..... : 960
DWita7 : ..... : 960
DWita52 : .....G..... : 960
DWita53 : .....G..... : 960
DWita54 : ..... : 960
DWita55 : ..... : 960
DWita56 : ..... : 960
DWita57 : ..... : 960
DWcor : ..... : 960
DWsc : ..... : 960
DWrib : ..... : 960
DWpara : ..... : 960
DWmex : ..... : 960
DPjb27 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPjb76 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPjb81 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPjb134 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPjb162 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPjb166 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPjb195 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPita58 : T.A...T.T.....G.....A..... : 960
DPinterior : T.A...T.T.....A..... : 960
DPorinocana : T.A...T.T.....C.....G.....A..... : 960
DPamazonica : T.A...T.T.....A.....G..... : 960
Dyakuba : A.A...T.T.T...T...G.T.T.A.....A.....T.T.....C.T.....A.T...T.A..... : 960
Dmelanogaster : T.A...T.T.C.A.T...A.T.T...T.T.....C.T.....A.T...T.A..... : 960

```

Figura 4.2: *Continuação.*

```

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
          980          1000          1020          1040          1060          1080
DWjb25 : TTTAGGATTTGTATTTTATTTACTGTAGGAGGACTAACCGGAGTAGTTTGTAGCTAATTCTTCAGTAGATATTATTTTACATGATACTTATTATGTAGTTGCTCATTTTCACTATGTTTT : 1080
DWjb26 : ..... : 1080
DWjb30 : ..... : 1080
DWjb31 : .....C..... : 1080
DWjb32 : ..... : 1080
DWjb33 : ..... : 1080
DWjb34 : ..... : 1080
DWjb35 : .....T..... : 1080
DWjb36 : ..... : 1080
DWjb37 : ..... : 1080
DWpf1 : ..... : 1080
DWpf2 : ..... : 1080
DWpf3 : ..... : 1080
DWpf4 : ..... : 1080
DWpf5 : ..... : 1080
DWpf6 : ..... : 1080
DWpf7 : ..... : 1080
DWpf9 : .....T..... : 1080
DWita3 : ..... : 1080
DWita4 : ..... : 1080
DWita5 : ..... : 1080
DWita7 : ..... : 1080
DWita52 : ..... : 1080
DWita53 : ..... : 1080
DWita54 : ..... : 1080
DWita55 : ..... : 1080
DWita56 : ..... : 1080
DWita57 : .....G..... : 1080
DWcor : ..... : 1080
DWsc : ..... : 1080
DWrib : ..... : 1080
DWpara : .....T..... : 1080
DWmex : ..... : 1080
DPjb27 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPjb76 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPjb81 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPjb134 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPjb162 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPjb166 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPjb195 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPita58 : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPinterior : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPorinocana : C.....T..T.....C.....C..C.....C..T..C..... : 1080
DPamazonica : .....T.....T..T.....C.....C..A.....T..C..... : 1080
Dyakuba : .....T.....C..A.....T..A.....T..A.....A..T.....A.....C.....C..... : 1080
Dmelanogaster : .....T.....A.....T..A.....T.....A.....A.....A.....T..... : 1080

```

Figura 4.2: Continuação.

```

          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          1100          1120          1140          1160          1180          1200
DWjb25 : ATCAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTATCCATTGATATCCTTTATTTACAGGATTAACCTTTAAACGCCAAATGATTAATAAGTCAATTTATTATTATATTTCATTGGAGT : 1200
DWjb26 : .....T..... : 1200
DWjb30 : ..... : 1200
DWjb31 : ..... : 1200
DWjb32 : .....T..... : 1200
DWjb33 : ..... : 1200
DWjb34 : ..... : 1200
DWjb35 : ..... : 1200
DWjb36 : ..... : 1200
DWjb37 : .....T..... : 1200
DWpf1 : .....T..... : 1200
DWpf2 : .....T..... : 1200
DWpf3 : ..... : 1200
DWpf4 : ..... : 1200
DWpf5 : ..... : 1200
DWpf6 : ..... : 1200
DWpf7 : .....T..... : 1200
DWpf9 : ..... : 1200
DWita3 : .....T..... : 1200
DWita4 : ..... : 1200
DWita5 : ..... : 1200
DWita7 : .....T..... : 1200
DWita52 : .....T..... : 1200
DWita53 : .....T..... : 1200
DWita54 : .....T.....T..... : 1200
DWita55 : .....T..... : 1200
DWita56 : ..... : 1200
DWita57 : ..... : 1200
DWcor : ..... : 1200
DWsc : ..... : 1200
DWrib : .....T..... : 1200
DWpara : ..... : 1200
DWmex : ..... : 1200
DPjb27 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPjb76 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPjb81 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPjb134 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPjb162 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPjb166 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPjb195 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPita58 : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPinterior : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPorinocana : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
DPamazonica : .....T.....C..C.....T.....T..... : 1200
Dyakuba : .....T..T..C..C..A.....T..G..A..TAAT..G.....G..T..... : 1200
Dmelanogaster : .....T..T..C..C..C.....T..G..TAAT.....T..C.....T..... : 1200

```

Figura 4.2: Continuação.

	*	**	* * *	*	*	*	** *
	1220	1240	1260	1280	1300	1320	
DWjb25	: AAATTTAACATTTTTCTCAACATTTTTTAGGGTTAGCAGGAATACCTCGACGATACCTGATTACCCAGATGCTTACACTACATGAAACATTGTGCTACAATTGGTTCTTCAATTC						: 1320
DWjb26	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWjb30	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWjb31	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWjb32	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWjb33	:C.....AC.....T.....A.....						: 1320
DWjb34	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWjb35	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWjb36	:C.....AC.....T.....A.....						: 1320
DWjb37	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf1	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf2	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf3	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf4	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf5	:C.....AC.....T.....A.....						: 1320
DWpf6	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf7	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpf9	:C.....A.....G.....T.....A.....						: 1320
DWita3	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita4	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita5	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita7	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita52	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita53	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita54	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita55	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita56	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWita57	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWcor	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWsc	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWrib	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWpara	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DWmex	:C.....A.....T.....A.....						: 1320
DPjb27	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPjb76	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPjb81	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPjb134	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPjb162	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPjb166	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPjb195	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPita58	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPinterior	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPorinocana	:C.....T.....T.....T.....C.....						: 1320
DPamazonica	:C.....T.....G.....T.....C.....						: 1320
Dyakuba	:C.....C.....A.....T.....T.....A.....T.....TG.....T.....G.....AA.....T.....						: 1320
Dmelanogaster	: T.....A.....G.....T.....T.....T.....A.....A.....A.....A.....T.....A.....A.....T.....A.....AA.....T.....						: 1320

Figura 4.2: Continuação.

```

*      *      *      *      *      *
      1340      1360      1380      1400
DWjb25 : ATTATTGGGAATTTTATTTTCTTTTTCATTATTTGAGAAAGTTTAGTATCTCAACGACAAGTAATTTATCCAATTCAATTAATTCCTTCTAT : 1413
DWjb26 : ..... : 1413
DWjb30 : ..... : 1413
DWjb31 : ..... : 1413
DWjb32 : .....C..... : 1413
DWjb33 : .....C..... : 1413
DWjb34 : ...G..... : 1413
DWjb35 : ..... : 1413
DWjb36 : ..... : 1413
DWjb37 : ..... : 1413
DWpf1 : .....C..... : 1413
DWpf2 : ..... : 1413
DWpf3 : ..... : 1413
DWpf4 : ..... : 1413
DWpf5 : ..... : 1413
DWpf6 : ..... : 1413
DWpf7 : ..... : 1413
DWpf9 : ..... : 1413
DWita3 : .....C..... : 1413
DWita4 : ..... : 1413
DWita5 : ..... : 1413
DWita7 : .....GG..... : 1413
DWita52 : ..... : 1413
DWita53 : ..... : 1413
DWita54 : ..... : 1413
DWita55 : ..... : 1413
DWita56 : ..... : 1413
DWita57 : ..... : 1413
DWcor : ..... : 1413
DWsc : .....T..... : 1413
DWrib : ..... : 1413
DWpara : .....T..... : 1413
DWmex : ..... : 1413
DPjb27 : .C...A.....T..... : 1413
DPjb76 : .C...A.....T..... : 1413
DPjb81 : .C...A.....T.....C..... : 1413
DPjb134 : .C...A.....T..... : 1413
DPjb162 : .C...A.....T.....C..... : 1413
DPjb166 : .C...A.....T..... : 1413
DPjb195 : .C...A.....T..... : 1413
DPita58 : .C...A.....T..... : 1413
DPinterior : .C...A.....T..... : 1413
DPorinocana : .C...A.....T..... : 1413
DPamazonica : .C...A.....T..... : 1413
Dyakuba : .....A.....T.C.AT.....G.....A..... : 1413
Dmelanogaster : .....A.....C.....C.T.....T.....A.....C.....C.....A.A... : 1413

```

Figura 4.2: *Continuação.*

4.4 Polimorfismos em Populações Urbanas de *D. willistoni*

A Tabela 4.3 mostra os valores encontrados de d_x , d_{xy} , d_a , π_s , π_T e N_{ST} . Os valores de diversidade nucleotídica dentro (d_x) e entre duas populações (d_{xy}) foram muito semelhantes, bem como os valores entre todas as populações e a diversidade total. O coeficiente de diferenciação nucleotídica ficou ao redor de zero, indicando que estas populações não possuem estruturação. O fluxo gênico histórico entre as populações estudadas deve ter sido grande o suficiente para explicar estes achados. Porém, é possível imaginar um cenário evolutivo onde a seleção purificadora tenha mantido um polimorfismo ancestral. Sendo assim, o marcador apontaria a não existência de estruturação quando na verdade ela pode ocorrer. Para poder resolver isto, outros marcadores devem ser analisados.

Tabela 4.3: Valores de d_x , d_{xy} , d_a , π_s , π_T e N_{ST} para as populações de Itapuã, Jardim Botânico e Parque Farroupilha.

	Itapuã	Jardim Botânico	Parque Farroupilha
Itapuã	0,350±0,082	0,383±0,079	0,351±0,077
Jardim Botânico	0,006±0,008	0,403±0,097	0,392±0,083
Parque Farroupilha	-0,016±0,006	-0,002±0,008	0,385±0,095
$\pi_s = 0,380 \pm 0,078$	$\pi_T = 0,377 \pm 0,077$	$N_{ST} = -0,714 \pm 1,487$	

Todos os valores foram multiplicados por 100. d_x está na diagonal, d_{xy} está acima da diagonal e d_a está abaixo da diagonal. O Valor de N_{ST} está em porcentagem.

4.5 Polimorfismos em Populações de *D. willistoni* e *D. paulistorum*.

Em relação ao Jardim Botânico, a análise da diversidade de nucleotídeos mostra a clara separação entre as duas espécies (Tabela 4.4). Isto indica que o fluxo gênico entre elas é muito baixo ou inexistente. Mesmo ocorrendo híbridos interespecíficos naturalmente, ou a introgressão do genoma mitocondrial não deve ocorrer ou é tão rara que não foi possível detectá-la.

Tabela 4.4: Valores de d_x , d_{xy} , d_a , π_s , π_T e N_{ST} para as populações de *D. willistoni* e *D. paulistorum* do Jardim Botânico

	<i>D. willistoni</i>	<i>D. paulistorum</i>
<i>D. willistoni</i>	0,404±0,095	4,517±0,558
<i>D. paulistorum</i>	4,238±0,532	0,155±0,064
$\pi_s = 0,279 \pm 0,063$	$\pi_T = 2,483 \pm 0,297$	$N_{ST} = 88,740 \pm 2,369$

Todos os valores foram multiplicados por 100. d_x está na diagonal, d_{xy} está acima da diagonal e d_a está abaixo da diagonal. O Valor de N_{ST} está em porcentagem

4.6 Testes de Seleção

O Teste D de Tajima tanto para *D. willistoni* como para *D. paulistorum* resultou em um valor negativo (-1,80158 e -1,75584, respectivamente) estatisticamente significativo ($P < 0,02$, para ambos). Porém, este teste não é capaz de diferenciar entre a ação da seleção natural (seja ela seleção purificadora ou seleção positiva) e eventos demográficos, como flutuação no tamanho efetivo da população.

Para testar seleção positiva foi realizado o Teste Exato de Fisher utilizando o programa Mega 2.1. Nenhuma comparação apresentou valor significativo, indicando que seleção positiva não deve estar atuando.

A diferenciação entre seleção purificadora e evento demográfico é mais complexa. Se há um evento demográfico, espera-se que este cause o mesmo efeito sobre substituições sinônimas e não sinônimas. A Figura 4.3 mostra os gráficos dos valores de K_a (número de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo) e K_s (número de substituições sinônimas por sítio sinônimo) obtidos por comparação pareada de seqüências para as duas espécies. O padrão de dispersão dos dados corrobora o modelo de seleção purificadora. *Drosophila paulistorum* apresentou uma maior variação de K_s .

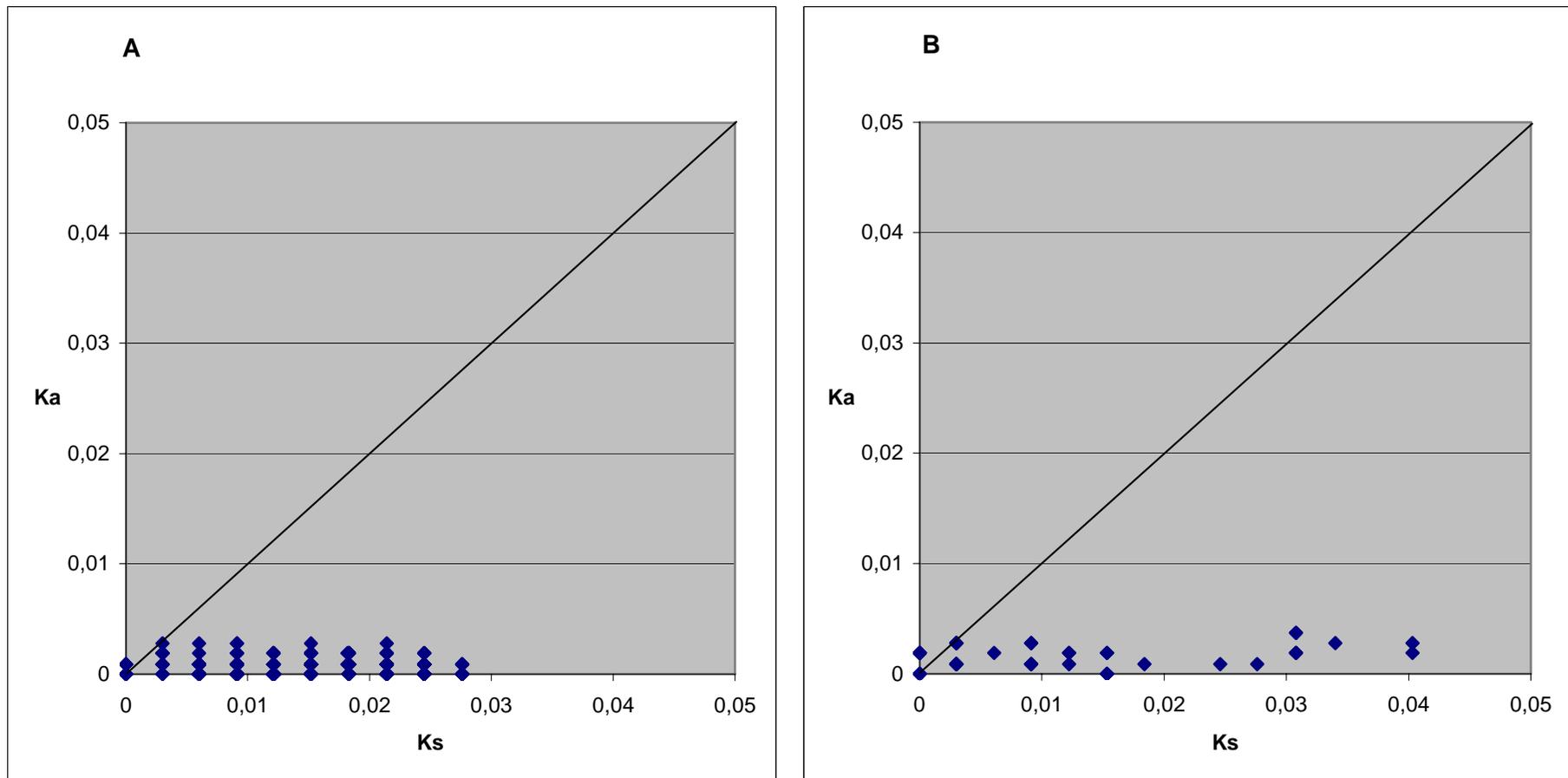


Figura 4.3. Gráficos de Dispersão com Valores de Ka e Ks. Os valores de Ka e Ks foram obtidos a partir da comparação de substituições sinônimas e não sinônimas realizadas par à par com todas as seqüências de cada espécie. A diagonal representa a reta esperada segundo o modelo de evolução estritamente neutra ($Ka=Ks$). Valores acima da diagonal são sugestivos de seleção positiva ($Ka>Ks$), valores abaixo da diagonal sugerem seleção purificadora ($Ka<Ks$). A: valores para *D. willistoni*; B: valores para *D. paulistorum*.

4.7 Análise Filogenética

As análises filogenéticas das seqüências foram realizadas com o método de busca heurística. A Figura 4.4 mostra a árvore de Máxima Parcimônia. Encontrou-se 322 árvores igualmente parcimoniosas com comprimento de 362 passos. O índice de consistência foi de 0,757 e o índice de retenção foi de 0,890. Três ramos apresentam valores de *bootstrap* de 100%, o que agrupa todas as *D. paulistorum* num grupo monofilético, o que agrupa todas as *D. willistoni* em outro grupo monofilético e o que demonstra a origem monofilética do grupo *willistoni*, bem separado dos grupos externos (*D. yakuba* e *D. melanogaster*). O mesmo é encontrado para a filogenia de *Neighbor-Joining* (Figura 4.5) e Máxima Verosimilhança (Figura 4.6). As três análises apresentaram topologias e valores de *bootstrap* muito semelhantes.

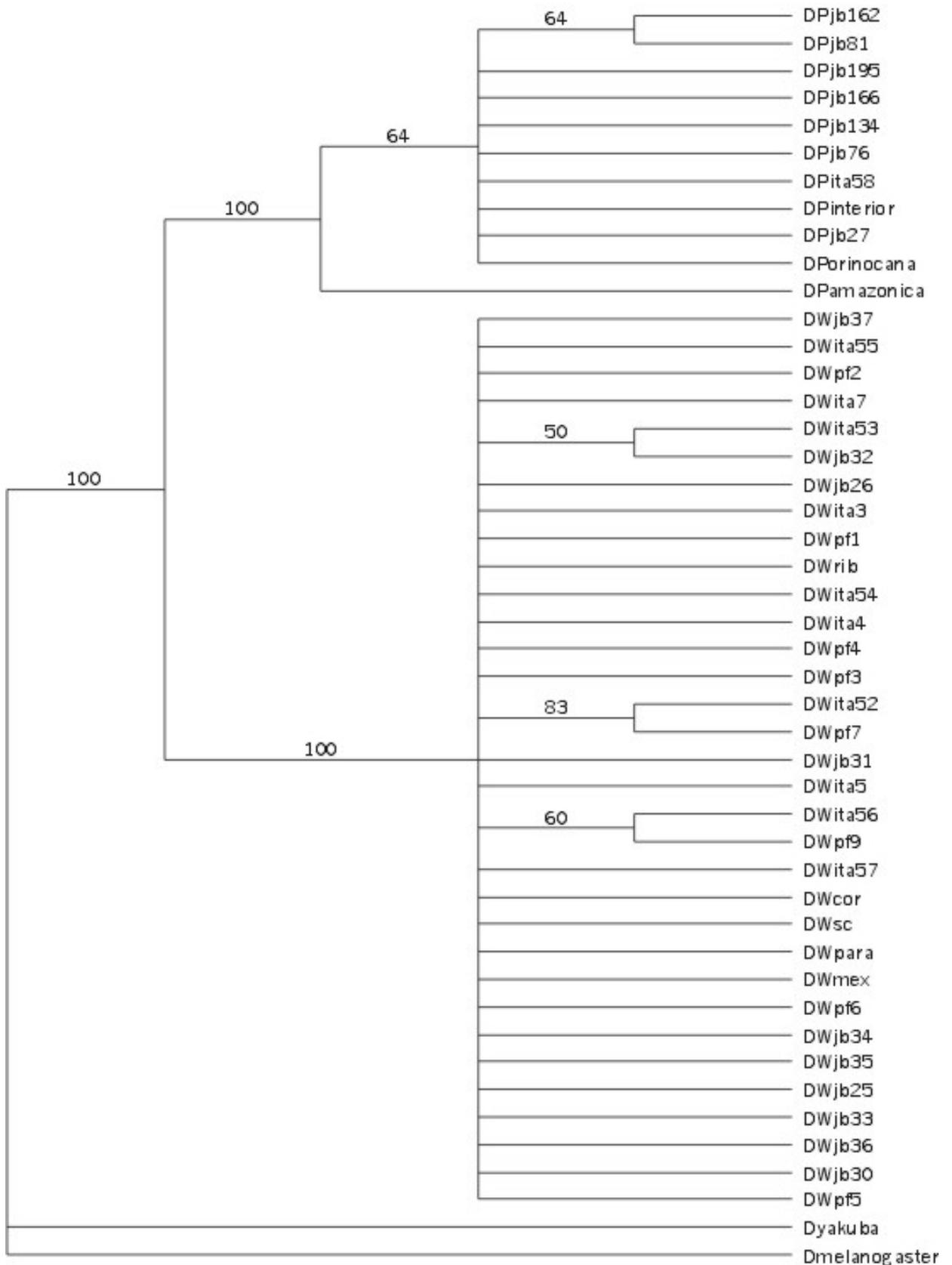


Figura 4.4: Análise filogenética da seqüência de 1413 nucleotídeos do gene da COI. Árvore consenso gerada pela método da Máxima Parcimônia. Os números sobre os ramos representam os valores de *bootstrap* maiores que 50 (1.000 repetições). CI=0,757, RI: 0,890.

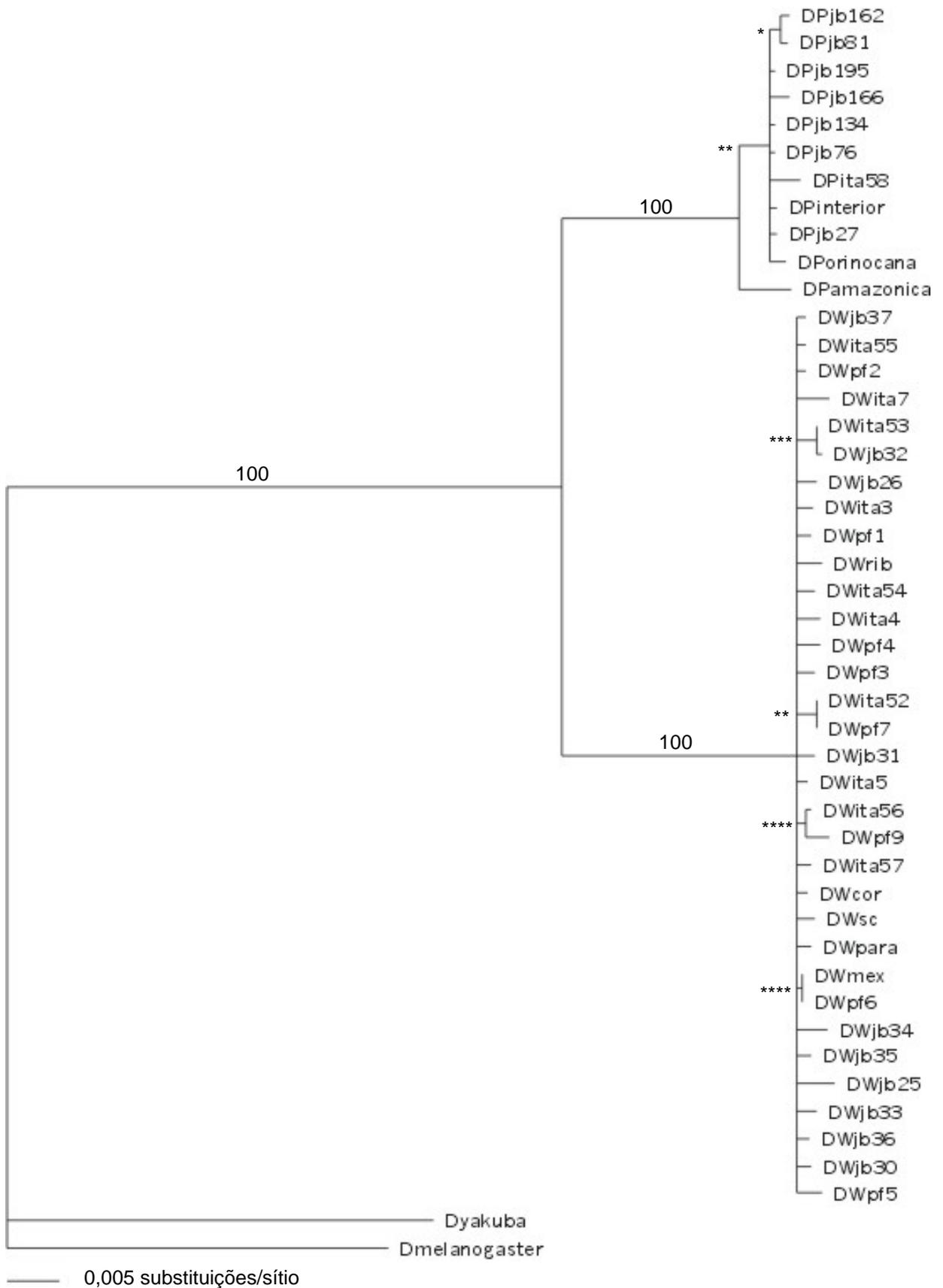


Figura 4.5: Análise filogenética da seqüência de 1413 nucleotídeos do gene da COI pela método de Neighbor-Joining. Árvore consenso. As distâncias foram computadas pelo método de Kimura 2 parâmetros. Os números sobre os ramos representam os valores de *bootstrap* maiores que 50 (1.000 repetições). Valores de *bootstrap* nos ramos mais curtos: * 65; ** 85; *** 58; ****59.

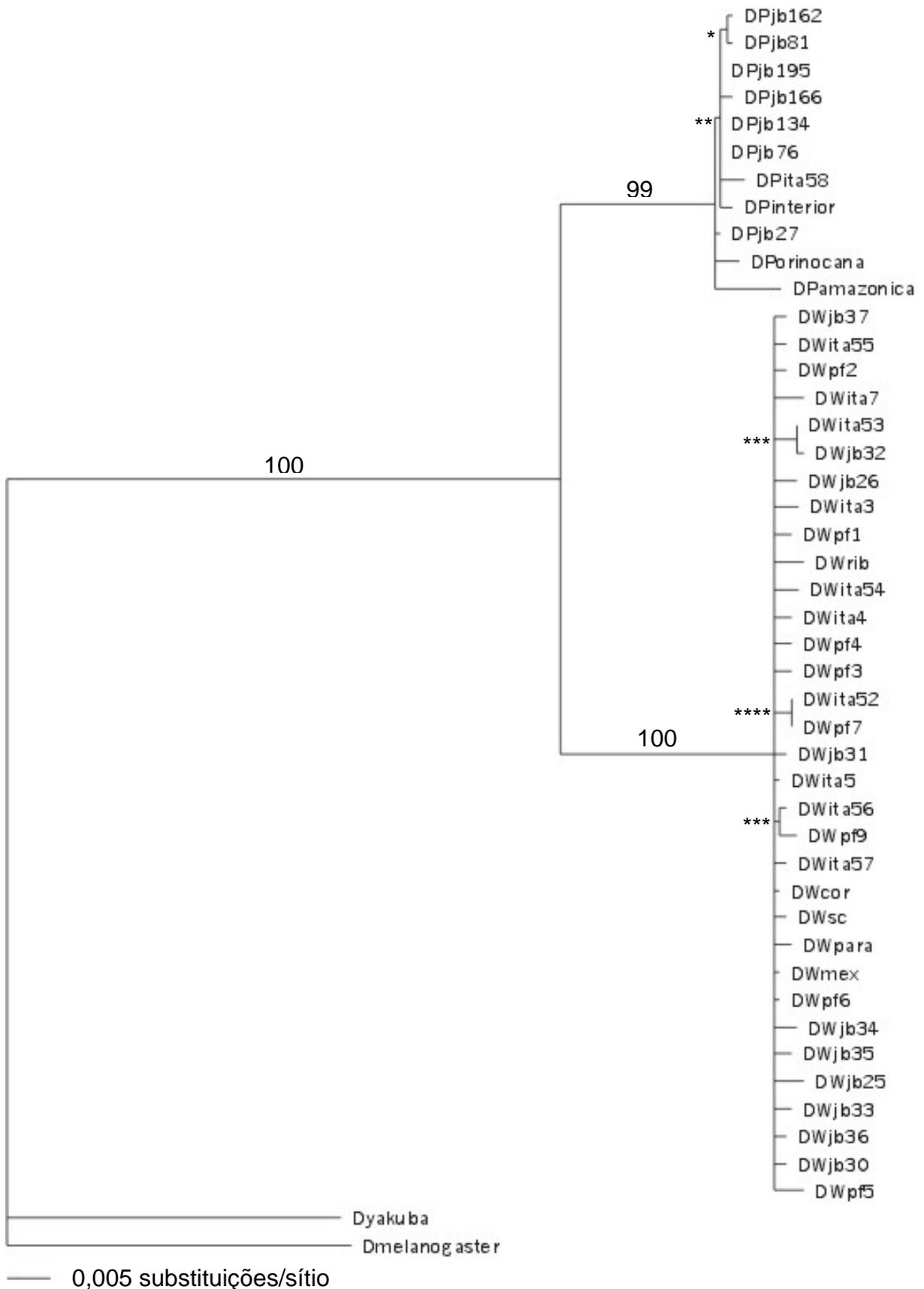


Figura 4.6: Análise filogenética da seqüência de 1413 nucleotídeos do gene da COI pelo método da Máxima Verossimilhança. Árvore consenso. Os números sobre os ramos representam os valores de *bootstrap* maiores que 50 (100 repetições). Valores de *bootstrap* nos ramos mais curtos: * 58; ** 57; *** 61; **** 84

5. Discussão, Conclusões e Perspectivas

5.1 Freqüência relativa quanto ao número de indivíduos das espécies do grupo *willistoni*

Com o resultado do estabelecimento de isolinhagens a partir de coletas em diferentes locais de Porto Alegre e Viamão, observou-se uma grande diminuição da freqüência de *Drosophila paulistorum* em relação à sua críptica, *D. willistoni*. Tal fato pode estar correlacionado com a introdução da invasora afrotropical *Zaprionus indianus*. A mesma foi registrada em Porto Alegre em março de 2000 (Castro e Valente, 2001), e, em pouco tempo, este inseto tornou-se a espécie mais abundante nas comunidades locais de drosofilídeos durante determinados períodos do ano, como está sendo estudado pela Mestranda Norma Machado da Silva. Segundo dados de Valiati & Valente (1996), *Drosophila paulistorum* e *D. willistoni* dividem seus nichos, pois a primeira foi encontrada preferencialmente em frutos exóticos (como por exemplo, *Averrhoa carambola*, *Macrura pomífera* e *Citrus sinensis*), enquanto a sua críptica era comumente encontrada em frutos nativos (como por exemplo, *Syagrus romanzoffiana* e *Butia eriospatha*). Os autores sugerem que esta divisão de nichos seria uma estratégia adaptativa para diminuir a competição. Entretanto, *D. willistoni*, e talvez outros drosofilídeos da comunidade, parecem ter expandido seus nichos em resposta a invasão de *Z. indianus*, alterando a dinâmica das comunidades invadidas. Isto pode ter ocasionado uma sobreposição de nicho entre *D. paulistorum* e outras espécies da comunidade e como conseqüência, esta espécie pode ter diminuído sua freqüência por competição. Cabe lembrar que a invasão do ambiente urbano por *D. paulistorum* é recente (Valente *et al.*, 1989; Santos & Valente, 1990; Valiati & Valente, 1996, 1997) e, portanto, a mesma pode não estar ainda bem adaptada a ele, tendo desvantagem na competição por seus recursos.

Estes resultados nos instigam a estudar mais aprofundadamente esta baixa freqüência de *D. paulistorum*, que pode ocasionar um efeito gargalo de garrafa. Santos & Valente (1990) descreveram 18 inversões cromossômicas em

populações de Porto Alegre e Valiati & Valente (1997) encontraram 23 inversões, das quais apenas 6 eram as mesmas descritas no trabalho de 1990. Agora, com a queda do tamanho populacional, seria interessante reavaliar as inversões cromossômicas que ainda estão segregando nestas populações.

Além disso, reavaliar a sobreposição de nichos alimentares e de ovoposição da *D. paulistorum* em relação às outras espécies de drosofilídeos, bem como estudar a possível competição larval das mesmas poderia fornecer alguns resultados bastante interessantes para justificar esta frequência reduzida de *D. paulistorum*. Experimentos controlados de competição larval em laboratório serão feitos brevemente, em colaboração com a Dra. Miriam Budnik, do Chile, especialista no assunto.

5.2 Polimorfismo e Urbanização

As duas espécies estudadas no presente trabalho têm sido alvos de numerosos estudos de polimorfismos cromossômicos e isoenzimáticos. Este trabalho é o primeiro que analisa polimorfismos de DNA mitocondrial em populações de espécies do grupo críptico da *Drosophila willistoni*.

Ao contrário do que foi encontrado por outros pesquisadores do nosso laboratório, analisando diferentes marcadores como inversões cromossômicas (Valente *et al.* 1993) e atividade de acasalamento (Regner & Valente, 1993), os resultados encontrados para o gene mitocondrial COI não demonstraram variação clinal relacionada ao nível de urbanização. Valente *et al.* (1993) analisaram o polimorfismo cromossômico de *Drosophila willistoni* em subpopulações urbanas de Porto Alegre e encontraram uma diminuição do número de inversões perto do centro urbano. Por outro lado, Regner & Valente (1993), ao analisar a atividade sexual, encontraram um aumento na velocidade de acasalamento em populações mais centrais. Estes autores sugerem que genes do cromossomo II estariam correlacionados com a velocidade de acasalamento e por isso, inversões neste cromossomo poderiam afetar esta atividade. Este fenômeno deve se tratar de uma adaptação para explorar o ambiente urbano.

Estes marcadores evidenciam uma certa estruturação populacional provavelmente relacionada ao isolamento por distância. O mesmo não foi encontrado no presente trabalho, o que poderia ser explicado pelo modelo de evolução proposto por nós para justificar os resultados encontrados. Se existe realmente isolamento ou contato reduzido entre as populações devido à distância, então é possível supor que a seleção purificadora estaria mantendo um polimorfismo antigo, justificando a não diferenciação genética encontrada para o gene COI. Esta hipótese é corroborada quando se analisa as árvores filogenéticas que mostram que moscas de locais tão distantes quanto a América Central e nossos locais de coleta, para as duas espécies, apresentam seqüências muito semelhantes. Provavelmente houve uma grande diversificação dos genomas mitocondriais durante o processo de especiação, que explica o valor de *bootstrap* de 100 separando as duas espécies, e, após isso, a seleção purificadora tem atuado mantendo um polimorfismo ancestral. Esta hipótese é corroborada pelo alto grau de politomia nas árvores dentro das espécies, que não resolve a filogeografia das mesmas. Mesmo o período seco do Pleistoceno, que isolou populações de *D. paulistorum* em refúgios de mata (Spassky *et al.*, 1971), dando origem às suas atuais semi-espécies, não parece ter sido suficiente para promover uma separação em relação às variantes do gene da COI.

No presente trabalho não foi possível realizar a análise de diversidade nucleotídica entre as populações de *D. paulistorum* devido ao pequeno tamanho amostral obtido. Realizar mais coletas para tentar conseguir um número satisfatório de isolinhagens desta espécie seria interessante para poder avaliar se os mesmos resultados encontrados para *D. willistoni* se repetiriam para *D. paulistorum*.

5.3 Sistemática molecular

A filogenia construída por Gleason *et al.* (1998) com um fragmento de 495 nucleotídeos do gene COI sugere que a semi-espécie Amazônica da *Drosophila paulistorum* estaria mais relacionada com *D. willistoni*, *D. tropicalis* e *D. insularis*

do que com as outras *D. paulistorum* analisadas. O presente trabalho, analisando 1413 nucleotídeos do mesmo gene não revelou este mesmo agrupamento; esta semi-espécie ficou agrupada num clado monofilético com as outras semi-espécies em todas as análises realizadas com valores de *bootstrap* que variaram de 99 à 100. Ao comparar a seqüência obtida por Gleason *et al.* (1998) e por nós, nota-se apenas duas diferenças nucleotídicas. Provavelmente, o agrupamento desta semi-espécie com outras espécies do grupo críptico se deva ao pequeno número de nucleotídeos analisados por aqueles autores. Nas nossas análises, 140 sítios foram informativos para parcimônia, enquanto para o fragmento de 495 nucleotídeos, apenas 28 sítios foram informativos.

Pelo modelo de evolução da COI proposto no item 5.2, foi possível distinguir claramente as duas espécies crípticas com este marcador. A partir destes resultados é possível desenvolver metodologias de rápido acesso para separar estas duas espécies com análise molecular, como por exemplo, clivagem de produto da PCR da COI com enzimas de restrição capazes de reconhecer sítios com diferenças fixadas entre as duas espécies. O estabelecimento de tal marcador será de grande ajuda em estudos subseqüentes com este par de espécies, devido à dificuldade de identificar-se espécies crípticas *in vivo*. Vários estudos foram realizados com diversos caracteres morfológicos, e apenas algumas diferenças médias foram encontradas, embora não sejam diagnósticas (Burla *et al.* 1949). Com a facilidade atual de se obter DNA e analisá-lo por RFLP-PCR ou SSCP-PCR, esta metodologia se tornaria muito mais acessível para se diferenciar as crípticas do que a determinação pelo padrão de bandas dos cromossomos politênicos. Isto se deve ao fato de que não é fácil conseguir boas lâminas dos cromossomos politênicos das espécies do grupo *willistoni* pelas suas próprias características estruturais.

A identificação das espécies crípticas por eletroforese de isoenzimas, embora viável (Valiati, 1999) também apresenta algumas desvantagens. Caso se queira trabalhar com estas moscas em alguma abordagem molecular, é necessário se estabelecer isolinhagens e utilizar algum indivíduo da prole para a eletroforese e outros para extrair DNA. Utilizando um marcador de DNA, é

possível fazer a sua extração através de algum método com bom rendimento, direto das moscas coletadas, dispensando o estabelecimento de isolinhagens.

A ampliação desta abordagem para as outras espécies crípticas do grupo *willistoni* será muito importante para complementar os estudos de divergência evolutiva entre elas (revisão em Cordeiro & Winge, 1995) e para a comparação dos resultados obtidos por Gleason *et al.* (1998).

5.4 Filogeografia das duas espécies

O marcador utilizado não foi capaz de resolver as diferenças dentro das espécies como visto nas diferentes árvores filogenéticas realizadas com diferentes metodologias devido ao alto grau de politomia encontrado. Isto pode ocorrer porque não houve tempo suficiente para a diversificação desta seqüência ou porque a seleção purificadora pode estar atuando mais intensamente do que em outros drosofilídeos, uma vez que para o cluster *buzzati*, este marcador foi sensível o suficiente para caracterizar a história filogeográfica das espécies (Manfrin *et al.* 2001). Desta forma, o marcador mitocondrial utilizado só parece ser sensível o suficiente para separar espécies, mas não indivíduos pertencentes a níveis menores de diversificação genética (semi-espécies e populações).

6. Referências Bibliográficas

- Avise JC (2000). *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press. Massachusetts, 447pp.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA and Saunders N (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Avise JC, Neigel JE and Arnold J (1984) Demographic influence on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J Mol Evol* 20: 99-105.
- Ayala FJ and Powell JR (1972) Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 1094-1096.
- Ayala FJ, Powell JR and Tracey ML (1972a) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. V. Genic variation in natural populations of *Drosophila equinoxialis*. *Genet Res* 20: 19-42.
- Ayala FJ, Powell JR, Tracey ML, Mourão CA and Perez-Salas S (1972b). Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70: 113-139.
- Ayala FJ, Tracey ML, Barr LG and Ehrenfeld JG (1974) Genetic and reproductive differentiation of *Drosophila equinoxialis caribbensis*. *Evolution* 28: 24-41.
- Ball Jr. RM, Neigel JE and Avise JC (1990) Gene genealogies within the organismal pedigrees of random mating populations. *Evolution* 44: 360-370.
- Berg OG and Kurland CG (2000) Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol Biol Evol* 17: 951-961.
- Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW and Clayton DA (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26: 167-180.

- Birckly Jr. CW, Maruyama T and Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103: 513-527.
- Borisov AI (1969) Adaptive significance of chromosome polymorphism. Communication III. Further evolution of an urban race of *Drosophila funebris*. *Sov Genet* 5: 646-649.
- Brncic D (1989) Long-term changes in the population ecology of *Drosophila pavani* not followed by changes in the chromosomal polymorphism. *Rev Bras Genet* 12: 525-533.
- Brown TA (1992) *Genetics: a Molecular Approach*. 2nd edition. Chapman & Hall eds, London, 512pp.
- Burla H, Da Cunha AB, Cordeiro AR, Dobzhansky T, Malogolowkin C and Pavan C (1949) The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 3: 300-314.
- Carmody G (1965) Two unusual strains of the *D. willistoni* sibling species group. *Drosoph Inf Serv* 40: 53.
- Castro FL and Valente VLS (2001) *Zaprionus indianus* is invading Drosophilid communities in the southern Brazilian. *Drosoph Inf Serv* 84: 15-16.
- Clary DO and Wolstenholme DR (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Mol Evol* 22: 252-271.
- Clary DO, Goddard JM, Martin SC, Fauron CM and Wolstenholme DR (1982) *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel gene order. *Nucleic Acids Res* 10: 6619-6637.
- Cordeiro AR (1968) Chromosomal pairing variability of interspecific hybrids of *Drosophila willistoni* cryptic group. *Proc Int Congr Genetics Tokyo* 1: 191.

- Cordeiro AR and Winge H (1995) Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levene L (ed) Genetics of natural populations: the continuing importance of Theodosius Dobzhansky. Columbia University Press, New York, pp. 262-280.
- Da Cunha AB (1955) Chromosomal polymorphism in the Diptera. Adv Genet 7: 93-138.
- Da Cunha AB and Dobzhansky T (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to environment. Evolution 8: 119-134.
- Da Cunha AB, Burla H and Dobzhansky T (1950) Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. Evolution 4: 212-235.
- Da Cunha AB, Dobzhansky T, Pavlovsky O and Spassky B (1959) Genetics of natural populations. XXXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. Evolution 13: 389-404.
- De Brito ROA, Manfrin MH and Sene FM (2002) Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. Mol Phylogenet Evol 22: 131-143.
- De Rijk P, Neefs JM, Van de Peer Y and De Wachter R (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res 20 (suppl): 2075-2089.
- Dobzhansky T (1946) Complete reproductive isolation between two morphologically similar species of *Drosophila*. Ecology 27: 205-211.
- Dobzhansky T (1950) The chromosomes of *Drosophila willistoni*. J Hered 61: 156-158.
- Dobzhansky T (1957) Genetics of natural populations. XXVI. Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. Evolution 11: 280-293.
- Dobzhansky T (1970) Genetics of the Evolutionary Process. Columbia University Press, New York, 505 pp.

- Dobzhansky T and Pavan C (1943) Studies on Brazilian species of *Drosophila*. Biol Facul Fil Cien Letr Univ São Paulo 36: 7-72.
- Dobzhansky T, Ehrman L and Pavlovsky O (1957) *Drosophila insularis*, a new sibling species of the *willistoni* group. Univ Texas Publ 5721: 39-47.
- Dobzhansky T and Spassky B (1959) *Drosophila paulistorum* a cluster of species in *status nascendi*. Proc Natl Acad Sci U S A 45: 419-428.
- Dobzhansky T and Pavlovsky O (1962) A comparative study of the chromosomes in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. Chromosoma 13: 196-218.
- Dobzhansky T and Powell JR (1975) The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. In: King RC (ed) Handbook of Genetics. Plenum Press. New York. pp. 589-622.
- Dubinín NP and Tiniakov GG (1945) Seasonal cycles and the concentration of inversions in populations of *Drosophila funebris*. Am Nat 79: 570-572.
- Dubinín NP and Tiniakov GG (1946a) Structural chromosomal variability in urban and rural populations of *Drosophila funebris*. Am Nat 80: 393-396.
- Dubinín NP and Tiniakov GG (1946b) Inversion gradients and natural selection in ecological races of *Drosophila funebris*. Genetics 31: 537-545.
- Dubinín NP and Tiniakov GG (1947) Inversion gradients and selection in ecological races of *Drosophila funebris*. Am Nat 81: 148-153.
- Ehrman L (1965) Direct observation of sexual isolation between allopatric and between sympatric strains of the different *Drosophila paulistorum* races. Evolution 19: 459-464.
- Ehrman L and Powell JR (1982) *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JR (eds) The genetics and biology of *Drosophila*. vol 3b. Academic Press, New York, pp 193-225.
- Ferreira LB (2002) Diversidade e variação temporal de *Drosophila* (Diptera, Insecta) em ambientes com diferentes graus de urbanização. Máster Dissertation. UnB, Brasília.

- Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, Quagliariello C, Sbisa E and Saccone C (1989) The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J Mol Evol* 28: 497-516.
- Garcia ACL (2002) Estudo da homologia cromossômica entre *Drosophila paulistorum* e *D. willistoni*. Máster Dissertation. UFRGS, Porto Alegre.
- Gennis RB (1992) Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochim Biophys Acta* 1101: 184-187.
- Gleason JM, Griffith EC and Powell JR (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concepts? *Evolution* 52: 1093-1103.
- Goto SG, Kitamura HW and Kimura MT (2000) Phylogenetic relationships and climatic adaptations in the *Drosophila takahashii* and *montium* species subgroups. *Mol Phylogenet Evol* 15: 147-156.
- Goto SG and Kimura MT (2001) Phylogenetic utility of mitochondrial *COI* and nuclear *Gpdh* genes in *Drosophila*. *Mol Phylogenet Evol* 18: 404-422.
- Gottschalk MS (2002) Comparação entre duas metodologias de coleta e estudo da influência da urbanização e da sazonalidade sobre comunidades de drosofilídeos na Ilha de Santa Catarina, Brasil. Bachelor Monograph. UFSC. Florianópolis.
- Gray MW (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 5: 25-50.
- Gray MW (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev.* 6: 678-687.
- Grivell LA (1983) Mitochondrial DNA. *Sci. Am.* 248: 60-73.
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P and Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39: 439-446.

- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hasegawa M, Kishino H and Yano T (1985) Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22: 160-174.
- Henze K and Martin W (2001) How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet* 17: 383-387.
- Hüettel RN and Bush GL (1972) Starch gel electrophoresis of tephritid proteins: a manual of techniques. International Biological Programme Press.
- Jowett T (1986) Preparation of nucleic acids. In: Roberts DB (ed) *Drosophila: a practical approach*. IRL Press, Washington, pp 275-286.
- Kastritsis CD (1966) A comparative chromosome study in the incipient species of *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 19: 208-222.
- Kastritsis CD (1969) A cytological study on some recently collected strains of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 23: 663-675.
- Kastritsis CD and Dobzhansky T (1967) *Drosophila pavlovskiana*, a race or a species? *Am Midl Nat* 78: 244-247.
- Krimbas CB and Powell JR (1992) *Drosophila* Inversion Polymorphism. CRC Press, Florida, 576pp.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB and Nei M (2001) MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Kumazawa Y and Nishida M (1993) Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deepbranch animal phylogenetics. *J Mol Evol.* 37: 380-398.
- LaRoche J (1997) Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proc Nat Acad Sci U S A* 94: 5722-5727.

- Lin XY, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CP, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Aken SV, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM and Venter JC (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761-768.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM and Hewitt GM (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5: 153-165.
- Malagolowkin-Cohen C, Solima-Simmons A and Levene H (1965) A study of sexual isolation between certain strains of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 19: 95-103.
- Manfrin MH, De Brito ROA and Sene FM (2001) Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. *Ann Entomol Soc Am* 94: 333-346.
- Metz CW (1916) Chromosome studies in the Diptera. III. Additional types of chromosome groups in the Drosophilidae. *Am Nat* 50: 587-599.
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am* 262: 36-43.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- Nei M and Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci U S A* 76: 5269-5273.
- Nei M and Miller JC (1990) A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within populations from restriction data. *Genetics* 125: 873-879.
- Nei M and Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics* Oxford University Press, New York, 333 pp.

- Nigro L, Solignac M and Sharp P (1991) Mitochondrial DNA sequence divergence in the *melanogaster* and *oriental* species subgroups of *Drosophila*. *J Mol Evol* 33: 156-162.
- Noller HF, Moazed D, Stern S, Powers T, Allen PN, Robertson JM, Weiser B and Triman T (1990) Structure of rRNA and its functional interactions in translation. In: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D and Warner JR (eds) *The ribosome: structure, function, and evolution*. American Society of Microbiology, Washington, pp 73-92.
- O'Grady PM (1999) Reevaluation of phylogeny in the *Drosophila obscura* species group based on combined analysis of nucleotide sequences. *Mol Phylogenet Evol* 12: 124-139.
- O'Grady PM, Clark JB and Kidwell MG (1998) Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol* 15: 656-664.
- Ojala D, Montoya J and Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290: 470-474.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T and Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
- Pashley DP and Ke LD (1992) Sequence evolution in the mitochondrial ribosomal and ND-1 genes in Lepidoptera: implications for phylogenetics analysis. *Mol Biol Evol* 9: 1061-1075.
- Patterson JT and Stone WS (1952) *Evolution in the Genus Drosophila*. Macmillan Press, New York.
- Perez-Salas S, Richmond RC, Pavlovsky O, Kastritsis CD, Ehrman L and Dobzhansky T (1970) The interior semispecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 24: 519-527.
- Powell JR (1983) Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: Evidence from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 492-495.

- Rand DM, Harrison RG (1989) Molecular population genetics of mitochondrial DNA size variation in crickets. *Genetics* 121: 551-569.
- Regner LP (1992) Polimorfismos e evidências de elemento *P* em *Drosophila willistoni*. Máster Dissertation. UFRGS, Porto Alegre.
- Regner LP and Valente VLS (1993) *Drosophila willistoni* mating activity – urbanization effects and a search for its chromosomal basis. *Evol Biol* 7: 327-349.
- Regner LP, Pereira MSO, Alonso CEV, Abdelhay E and Valente VLS (1996) Genomic distribution of *P* elements in *Drosophila willistoni* and a search for their relationship with chromosomal inversions. *J Heredity* 87: 191-198.
- Ritchie MG and Gleason JM (1995) Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *J Evol Biol* 8: 463-479.
- Rohde C (2000) Polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. PhD Thesis. UFRGS, Porto Alegre.
- Rozas J and Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Santos RA and Valente VLS (1990) On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera: Drosophilidae) in an urban environment: ecological and cytogenetic observations. *Evol Biol* 4: 253-298.
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23: 331-366.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H and Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651-701.
- Singh BN and Das A (1990) Inversion polymorphism in Indian natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 33: 311-316.

- Slatkin M and Maddison WP (1989) A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 123: 603-613.
- Slatkin M and Maddison WP (1990) Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics* 126: 249-260.
- Spassky B (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Univ Texas Publ* 5721: 48-61.
- Spassky B, Richmon RC, Perez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T and Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25: 129-143.
- Stupar RM, Lilly JW, Town CD, Cheng Z, Kaul S, Buell CR and Jiang J (2001) Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2: Implication of potential sequencing errors caused by large unit repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5099-5103.
- Sturtevant AH (1916) Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. *Ann Ent Soc Amer* 9: 323-343.
- Sturtevant AH and Novitski E (1941) The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* 26: 517-541.
- Tajima F (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Tajima F (1990) Relationship between migration and DNA polymorphism in a local population. *Genetics* 126: 231-234.
- Takahata N (1983) Population genetics of extranuclear genomes under the neutral mutation hypothesis. *Genet Res* 42: 235-255.
- Takahata N and Palumbi SR (1985) Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics* 109: 441-457.
- Townsend JI (1952) Genetics of marginal populations of *Drosophila willistoni*. *Evolution* 6: 428-442.

- Townsend JI (1954) Cryptic subspeciation in *Drosophila* belonging to the subgenus *Sophophora*. *Am Nat* 88: 339-351.
- Valente VLS and Morales NB (1985) New inversions and qualitative description of inversions heterozygotes in natural populations of *D. willistoni* inhabiting two different regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Genet* 8: 167-173.
- Valente VLS and Araújo AM (1985) Observations on the chromosomal polymorphism of natural populations of *Drosophila willistoni* and its association with the choice of feeding and breeding sites. *Rev Bras Genet* 8: 271-284.
- Valente VLS and Araújo AM (1986) Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* 57: 149-159.
- Valente VLS, Rusczyk A, Santos RA, Bonorino CBC, Brum BEP, Regner LP and Morales NB (1989) Genetic and ecological studies on urban and marginal populations of *Drosophila* in the south of Brazil. *Evol Biol* 3: 19-35.
- Valente VLS, Rusczyk A and Santos RA (1993) Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Brazil J Genetics* 16: 307-319.
- Valiati VH and Valente VLS (1996) Observations on ecological parameters of urban populations of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera: Drosophilidae). *Rev Bras Ent* 40: 225-231.
- Valiati VH (1993) Atributos genéticos e ecológicos de populações colonizadoras de *Drosophila paulistorum*. Master Dissertation. UFRGS, Porto Alegre.
- Valiati VH (1999) Genética de populações marginais de *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* e avaliação de suas potencialidades para produção de híbridos interespecíficos. PhD Thesis. UFRGS, Porto Alegre.
- Valiati VH and Valente VLS (1997) Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Brazil J Genetics* 20: 567-581.

- Van de Peer Y, Neefs JM, De Rijk P and De Wachter R (1993) Reconstructing evolution from eukaryotic small-ribosomal-subunit RNA sequences: calibration of the molecular clock. *J Mol Evol* 37: 221-232.
- Weir BS and Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir BS (1990) Intraspecific differentiation. In: Hillis DM and Moritz C (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. New York. pp 385-406.
- Williston SW (1886) On the Diptera of St. Vincent. *Trans Ent Soc London* 253-446.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD and Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc* 26: 375-400.
- Winge H and Cordeiro AR (1960) Descoberta de uma ponte biológica entre *Drosophila willistoni* e *paulistorum*. *Ciênc Cult* 12: 149.
- Winge H and Cordeiro AR (1963) Experimental hybrids between *Drosophila willistoni* Sturtevant e *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan from Southern marginal populations. *Heredity* 18: 215-222.
- Winge H (1971) Níveis de divergência evolutiva no grupo críptico da *Drosophila willistoni*. PhD Thesis. UFRGS, Porto Alegre
- Wolstenholme DR and Clary DO (1985) Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics* 109: 725-744.
- Wolstenholme DR, MacFarlane JL, Okimoto R, Clary DO and Wahleithner JA (1987) Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1324-1328.
- Wong TW and Clayton DA (1985) *In vitro* replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell* 42: 951-958.
- Yiang H and Wong TW (1991) *In vitro* replication of heavy strand DNA in permeabilized human mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 19: 905-911.

Zhang J, Kumar S and Nei M (1997) Small-sample tests of episodic adaptative evolution: A case study of primate lysozimes. *Mol Biol Evol* 14: 1335-1338.

Anexo I

Outra população que seria inicialmente utilizada no presente trabalho seria coletada no Parque Gabriel Knijnik (bairro Vila Nova, Porto Alegre). Este local foi escolhido por ficar numa área de baixa urbanização, e por possuir várias árvores frutíferas como butiá, laranja, limão, goiaba, araçá, manga, jabuticaba, bergamota.

Neste local, duas coletas foram realizadas e 49 isolinhagens foram estabelecidas. Destas, apenas uma era de *D. paulistorum*. Embora neste local também tenhamos coletado preferencialmente frutos exóticos e cítricos, também constatamos a baixa frequência de *D. paulistorum*. Este também foi o primeiro registro de *D. paulistorum* neste local, uma vez que nenhum estudo anterior tinha detectado a sua presença.

Esta área foi doada em 1997 para a Prefeitura de Porto Alegre, e esteve fechada à visitação durante 5 anos. Entretanto, no segundo semestre de 2002 iniciaram-se obras para tornar este local um parque público. A utilização dos frutos pelos operários fez com que virtualmente nenhum recurso fosse encontrado em coletas posteriores. Além disso, o impacto causado pela obra faz com que esta área deixasse de ser um local propício para avaliar o efeito da baixa urbanização nos polimorfismos das espécies do grupo *willistoni*. Por esses motivos descartamos esse local das nossas análises.

Anexo II

Com o intuito de avaliar possíveis regiões polimórficas no genoma mitocondrial de *Drosophila*, foi realizado um alinhamento com seqüências retiradas do GenBank do genoma mitocondrial completo de 30 moscas (1 seqüência de *Drosophila sechellia*, 2 de *D. mauritiana*, 4 de *D. melanogaster*, 1 de *D. yakuba* e 22 de *D. simulans*).

A Figura II.1 mostra uma região localizada entre o gene da Citocromo c oxidase subunidade III e o tRNA da glicina. Foi encontrada nesta região, a presença de inserções ou deleções que, caso fossem polimórficas em *D. willistoni* e *D. paulistorum*, poderiam ser facilmente distinguidas em gel pelo seu tamanho. Para testar esta possibilidade, um par de iniciadores foi desenhado em regiões conservadas adjacentes. Desta combinação de iniciadores esperava-se um fragmento com cerca de 200 nucleotídeos.

Foi realizada uma triagem com DNAs de diferentes moscas, e após separar as bandas em gel de poli-acrilamida 29:1 10%, foram verificadas diferenças de tamanho somente entre *D. melanogaster* e *D. simulans* (Figura II.2). Além disso, foi feita uma SSCP em gel de poli-acrilamida 49:1 10%, mas também só foram encontradas diferenças para as mesmas espécies. Desta forma, esta região foi abandonada no nosso estudo.

Outra possibilidade aventada, foi utilizar a região controladora do DNA mitocondrial (região rica em A+T). Para isso, foram utilizados 3 pares de iniciadores, com os quais, entretanto, não se obteve amplificação. Várias tentativas foram feitas, com todas as combinações possíveis destes iniciadores, bem como a modificação das temperaturas de anelamento e extensão (para regiões ricas em A+T a temperatura de extensão deve ser diminuída para 68°C), igualmente sem a obtenção de amplificação. Em apenas uma combinação de iniciadores, foram obtidos resultados. Foram amplificadas três bandas de 600, 800 e 1,2kb. Resultados semelhantes foram encontrados em *Z. indianus* pela mestranda Norma Machado da Silva, que obteve e isolou duas bandas. As

bandas isoladas foram clonadas e seqüenciadas, entretanto não foi encontrada nenhuma homologia com sequências depositadas no GenBank comparadas através do algoritmo Blastn. Desta forma, foi decidido descartar este marcador e trabalhar com o gene da Citocromo c oxidase, que apesar de ser uma região codificadora de proteínas, é um dos maiores genes mitocondriais e, também, em estudos anteriores com *Drosophila*, mostrou-se que a seqüência deste gene possui sinal filogenético (O'Grady *et al.*, 1998; O'Grady, 1999; Goto *et al.*, 2000; Manfrin, 2001; Goto & Kimura, 2001 e De Brito *et al.* 2002)

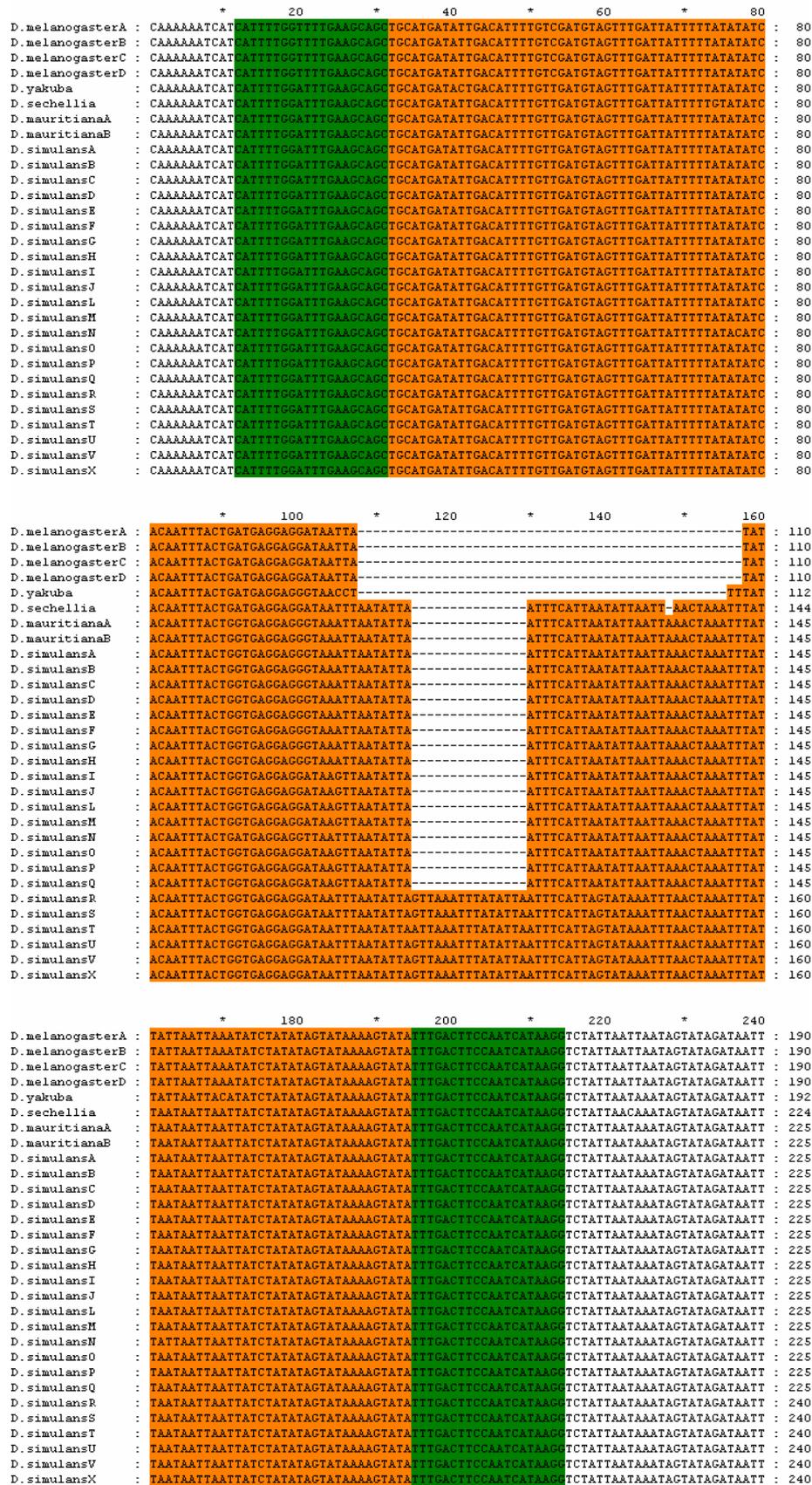


Figura II.1 Alinhamento de 30 seqüências de drosofilídeos retiradas do GenBank. Em verde: região de anelamento dos iniciadores; em laranja: região amplificada contendo a região entre os genes da COIII e tRNA-Gly onde foram encontradas inserções e/ou deleções.

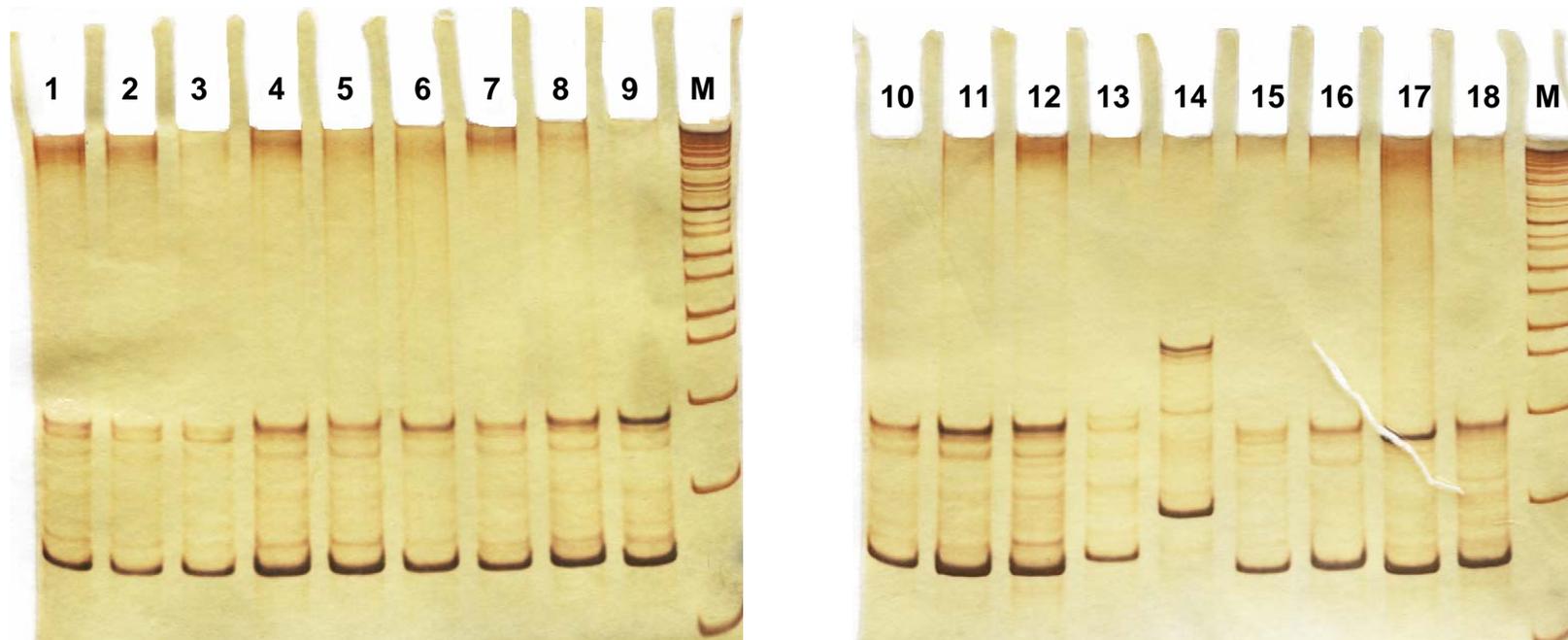


Figura II.2: SSCP em gel de poli-acrilamida 49:1 10% do produto da PCR do espessador gênico.

M: marcador DNA Ladder 1kb; 1: *D. willistoni* linhagem Wip4; 2: *D. willistoni* linhagem Redenção; 3: *D. paulistorum* linhagem Santa Catarina; 4: *D. paulistorum* linhagem Equador; 5: *D. tropicalis*; 6: *D. equinoxialis*; 7: *D. nebulosa*; 8: *D. fumipennis*; 9: *D. bocainensis*; 10: *D. capricorni*; 11: *D. succinea*; 12: *D. insularis*; 13: *D. melanogaster*; 14: *D. simulans*; 15: *D. ananasse*; 16: *D. virilis*; 17: *D. nigri*; 18: *D. latifasciformis*.