



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

SAMARA VIDEIRA ZORZATO

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Drosophila ornatifrons*
(DIPTERA: DROSOPHILIDAE) COLETADAS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Guarapuava

2015

SAMARA VIDEIRA ZORZATO

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Drosophila ornatifrons*
(DIPTERA: DROSOPHILIDAE) COLETADAS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Paes de Barros Machado.

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus.

Guarapuava

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Z88a Zorzato, Samara Videira
Análise da estrutura genética populacional de *Drosophila ornatifrons*
(Diptera: Drosophilidae) coletadas na região sul do Brasil / Samara Videira
Zorzato. – – Guarapuava, 2015
xvi, 62 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração
em Biologia Evolutiva, 2015

Orientadora: Luciana Paes de Barros Machado
Co-orientador: Rogério Pincela Mateus
Banca examinadora: Luciana Paes de Barros Machado, Paulo Roberto
da Silva, Daniela de Toni, Marcos Ventura Faria (suplente)

Bibliografia

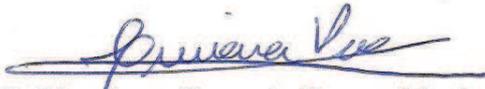
1. Ciências biológicas. 2. Biologia evolutiva. 3. Aozimas. 4.
Microsatélites. 5. Gargalo da garrafa. 6. *Drosophila*. 7. Mata Atlântica. I.
Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 595.774

SAMARA VIDEIRA ZORZATO

“Análise da estrutura populacional de *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) coletadas na região sul do Brasil”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva”, no Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Centro-Oeste, pela comissão formada pelos professores:



Prof.ª Dr.ª Luciana Paes de Barros Machado
(Universidade Estadual do Centro-Oeste UNICENTRO)



Prof.ª Dr.ª Daniela Cristina de Toni
(Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC)



Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva
(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)

Guarapuava, 23 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais, **João Roberto** e **Sueli**,
e minha irmã, **Vitória**,
por serem meu exemplo de que com **dedicação** e **amor**
pode-se alcançar qualquer **objetivo**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e mestres, Profa. Dra. Luciana Paes de Barros Machado e Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus por toda a dedicação e confiança, desde os tempos de iniciação científica, e por serem muito mais que orientadores e amigos, mas sim um exemplo que levarei para a vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva (PPG-BioEvol) pela oportunidade de realização da pesquisa e competência em ajudar sempre que necessitei, principalmente ao Robson Kintope por todas as conversas na secretaria.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva, coordenador do PPG-BioEvol por sempre ser prestativo e competente na realização de suas funções, facilitando (e muito!) esses dois anos.

À Profa. Dra. Lizandra Jaqueline Robe (FURG) pela disponibilização de material do Rio Grande do Sul.

Aos membros da banca de qualificação, Paulo e Rogério, e de defesa, Profa. Dra. Daniela de Toni, que trouxeram valiosas contribuições, ajudando na lapidação da dissertação.

Aos professores que contribuíram para minha formação acadêmica e se mostraram verdadeiros amigos nos momentos críticos. Um muito obrigado à Profa. Dra. Adriana Knob, por me acolher como agregada no Laboratório de Microbiologia e por me ensinar que *'cada um tem aquilo que merece'*. À professora Ana Lucia Suriani Affonso, por todo seu cuidado e carinho desde os tempos de graduação.

A todos os amigos da pós-graduação, em especial Simone Cristine Izidoro, Thaianne Prolo, Angélica de Carvalho Dias e Daniele Lima por todo o companheirismo. Obrigada por serem amigas e cuidarem de mim sempre e à Thai por nos alimentar com guloseimas *gluten free*.

À Simone por ser não apenas uma colega do mestrado, mas uma verdadeira amiga desde a graduação. Também à minha amiga do mestrado em Geografia, Andressa Consalter, por partilhar da mesma situação que eu, por todas nossas conversas e pelo constante incentivo nos momentos de exaustão. Vocês tornaram minha vida mais doce e alegre e, se hoje cheguei onde estou, esse mérito também é de vocês!

Aos colegas de laboratório Bruna, Gabriela, Manu, Kati, Willian e Jaque com quem aprendi a importância do trabalho em equipe.

Especialmente à Jaqueline Prestes, com quem convivi diariamente no laboratório e nos lanches no RU e à Bruna Memari Trava, minha eterna veterana, sempre presente. Muito obrigada pela companhia, pela amizade, pela ajuda, pela paciência, pelo apoio técnico e por serem fonte de grande inspiração para mim.

Às amigas da graduação que sempre me apoiaram Celina M. K. Likes, Gabriela Cebulski, Vanessa Sovrani, Jéssica Castro e Luana Pereira. Aos meus amigos de Guarapuava, Pirapozinho e que conheci ao longo dessa jornada, Cássia Ribeiro e Fernanda Fuzzi, Allan Albuquerque, Sigridy Paraizo, Nubia Lourenço, Guilherme Leão, Alessandro Trindade, Willian Iacunas, Rodrigo Leonavas, Rogério Adriano Silva, Cristian Zwetzch, Ariele Dourado Alves, Débora Bobato, Prianda Rios Laborda, e Ulysses Amancio de Frias dentre outros, que certamente me ouviram falar das “*Drosophilas*”. À Thaísa Vieira, com quem morei durante esses dois anos, por ser minha ‘marida’ e amiga de infância.

À Nara, que apesar do pouco tempo de convivência se mostrou uma verdadeira amiga, sempre prestativa ao me ajudar com os dados e me socorrer quando minhas matrizes não funcionavam, colaborando nas análises.

Aos meus tios Sandra e Claudinei e minhas primas Letícia e Melissa, que são os amores da minha vida, por me acolherem como uma filha nos últimos 7 anos, por todo o cuidado e amor dedicado. Não poderia deixar de agradecer especialmente à tia Sandra, que sempre me tratou como sua ‘filha mais velha e irmã mais nova’, em quem me espelhei desde pequena. Todo o amor que tenho pela pesquisa e vida acadêmica são graças a você, aos seus exemplos e incentivos (puxões de orelha) constantes.

A todos os meus familiares por compreender a minha ausência em diversos momentos e serem meu porto seguro.

Por fim, agradeço àqueles que me trouxeram ao mundo, me transmitindo muito mais que sua herança genética, mas os princípios de humildade, moral, amor, dedicação e tantas outras qualidades que não caberia enumerar aqui. Pai e Mãe, vocês são meu orgulho e nada disso seria possível se não fosse por vocês. Com vocês aprendi que nem sempre temos tudo o que queremos, mas com certeza vocês me deram tudo o que sempre precisei. E, finalmente, à minha irmã, Vitória, por ser a pessoa mais parecida e, ao mesmo tempo, mais diferente de mim. Por trazer alegria e sentido a minha vida.

Obrigada por tudo, meu amor.

“As coisas são semelhantes: isso faz a Ciência **possível**;
as coisas são diferentes: isso faz a Ciência **necessária**.”

(Levins e Lewontin, 1985)

“Triste não é mudar de ideias. Triste é não ter ideias para mudar.” (Barão de Itararé)

RESUMO

Análise da estrutura genética populacional de *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) da região sul do Brasil

Drosophila ornatifrons pertence ao grupo *guarani* de *Drosophila*, encontrado na região Neotropical. No Brasil, esta espécie ocorre principalmente em remanescentes de Mata Atlântica, em diferentes fitofisionomias deste bioma. Embora estudos recentes tenham começado a analisar algumas espécies do grupo *guarani*, nem sempre o objetivo destes trabalhos foi verificar a estrutura das populações e como a diversidade se encontra distribuída nos fragmentos florestais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi acessar a variação de *loci* de alozimas e microssatélites em cinco populações naturais de *D. ornatifrons* do sul do Brasil, contribuindo para o entendimento do padrão de distribuição da variabilidade genética desta espécie. Foram analisados nove *loci* de alozimas, seis polimórficos, e 10 *loci* polimórficos de microssatélites, totalizando 129 indivíduos amostrados. Foi observada alta diversidade genética (H_o) para ambos os marcadores quando comparada com outras espécies de *Drosophila*, principalmente em um parque de conservação (SSF) na região de Guarapuava/PR ($H_o = 0,5330$ e $0,4067$ - alozima e microssatélite, respectivamente) e em uma área próxima ao litoral do RS (CAN - $H_o = 0,4153$ e $0,4050$). Apenas os *loci* de microssatélites apresentaram alta deficiência de heterozigotos ($F_{is} = 0,3734$), e foi detectada diferenciação genética moderada para ambos os marcadores ($F_{st} = 0,0737$ - alozima; $F_{st} = 0,0796$ - microssatélite), embora haja uma maior diferenciação para os valores de distância genética dos *loci* de microssatélites. A análise de *bottleneck* demonstrou a ocorrência de gargalos populacionais em três das cinco populações amostradas (SSF e CAN - microssatélite e alozima, e Parque Municipal das Araucárias - alozima). Não foi observada associação entre as distâncias genéticas e geográficas ($p = 0,8220$ e $0,8390$ - teste de Mantel para alozima e microssatélite, respectivamente), contudo, somente o dendograma *Neighbor Joining* para os *loci* de alozimas separou as populações do Paraná das demais. A alta diversidade observada nas populações SSF e CAN pode ser tanto o resultado de gargalo recente, como também de características históricas e/ou ecológicas das duas áreas que favoreceriam a manutenção da alta diversidade. A diferenciação genética moderada associada à ausência de correlação com a distância geográfica pode ser resultado de manutenção de polimorfismo ancestral e/ou deriva genética, devido dispersão restrita destes insetos e ao isolamento e grande distância dos fragmentos de Mata Atlântica amostrados.

Palavras-chave: alozimas, microssatélites, gargalo da garrafa, *Drosophila*, Mata Atlântica.

ABSTRACT

Analysis of population genetic structure of *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) of southern Brazil

Drosophila ornatifrons belongs to the Neotropical *guarani* group of *Drosophila*. In Brazil, this species can be found mainly in remnants of different phytogeographies of the Atlantic Forest. Despite recent studies have started to analyze species of the *guarani* group, the examination of population structure and how the diversity is distributed in forest fragments has not been their main goal. Thus, the objective of this work was to assess allozyme and microsatellite variation in five natural populations of *D. ornatifrons* from southern Brazil, in order to contribute to better understand the pattern of genetic variability distribution for this species. We analyzed nine allozyme loci, six polymorphic, and 10 polymorphic microsatellite loci, totaling 129 individuals sampled. A high genetic diversity (H_o) was observed for both markers when compared to other *Drosophila* species, especially in a population of a conservation park (SSF) located in Guarapuava/PR ($H_o = 0.5330$ and 0.4067 – allozyme and microsatellite, respectively) and in a population of an area located close to the coast of Rio Grande do Sul state (CAN – $H_o = 0.4153$ and 0.4050). Only the microsatellite loci showed high heterozygote deficiency ($F_{is} = 0.3734$), and moderate genetic differentiation was detected for both markers ($F_{st} = 0.0737$ – allozyme; $F_{st} = 0.0796$ – microsatellite), despite higher genetic distances were detected for microsatellite. The bottleneck test resulted positive for three of the five analyzed populations (SSF e CAN – microsatellite and allozyme, and Parque Municipal das Araucárias – allozyme). No association between geographic and genetic distances was detected ($p = 0.8220$ and 0.8390 – Mantel test for allozyme and microsatellite, respectively), however, only the Neighbor Joining dendrogram for allozymes separated the populations of the Paraná state from the others. The high diversity found in SSF and CAN could be due to a recent bottleneck and/or because of the historical/ecological features of these areas that favored the maintenance of their high diversity. The moderate genetic differentiation, associated with the absence of correlation with geographic distance, could be a result of the maintenance of ancestral polymorphism and/or genetic drift, probably due to the restricted capacity of dispersion of these insects, and to the isolation and great distance among the fragments of Atlantic forest sampled.

Keywords: allozyme, microsatellite, bottleneck, *Drosophila*, Atlantic Forest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa dos biomas e das localidades de coleta de *Drosophila ornatifrons* no sul do Brasil. 1 – Ilha dos Marinheiros-RS (ILH); 2 – Canguçu-RS (CAN); 3 – Chapecó-SC (CHA); 4 – Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR (PMA); 5 – Salto São Francisco da Esperança, Guarapuava-PR (SSF). Os símbolos indicam as fitofisionomias de cada localidade: ■ Floresta Ombrófila Mista (FOM); + Floresta Estacional Decidual (FED); ● Floresta Estacional Semidecidual (FES); ▲ Floresta Paludosa (FPL). 29

Figura 2 – PAGE 6% de amplificação do *locus* SSR079 em cruzamentos de *Drosophila ornatifrons*. M = Marcador 100 pares de bases (1 µg/µL); **A** – 1 e 2 = parentais da linhagem SSF (1 = fêmea, 2 = macho); 3 a 6 = descendentes F1. Genótipos: 1 = 1/1, 2 = 2/2, 3 = 1/1, evidenciando a ocorrência de alelo nulo no macho parental, logo que o alelo ‘1’ seria herdado da mãe, 4 = 1/2, 5 e 6 = 2/2, evidenciando a ocorrência de alelo nulo na fêmea parental, pois o alelo ‘2’ tem origem paterna. **B** – 1 e 2 = parentais da linhagem de PMA (1 = fêmea, 2 = macho); 3 a 8 = descendentes F1. Genótipos: 1 = 2/2, 2 = não amplificou, 3, 5 e 6 = 2/2, 4 = 1/2, 7 e 8 = 1/1, herdaram o alelo nulo da mãe, que não aparece no gel (ver explicação no texto). 36

Figura 3 – PAGE 6% de amplificação do *locus* SSR096 em cruzamentos de *Drosophila ornatifrons*. M = Marcador 100 pares de bases (1 µg/µL); 1 e 2 = parentais da linhagem SSF (1 = fêmea, 2 = macho); 3 a 6 = descendentes F1. Genótipos: 1 a 5 = 1/1, 6 = 1/2, sugerindo a ocorrência de uma mutação, o alelo ‘2’, no indivíduo 6. 37

Figura 4 – Agrupamento *Neighbor Joining* entre populações de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil utilizando distância genética de Nei (1978), baseado em *loci* alozimáticos (A) e de microssatélites (B). ILH = Ilha dos Marinheiros-RS; CAN = Canguçu-RS; CHA = Chapecó-SC; PMA = Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF = Salto São Francisco-PR. 43

Figura 5 – Distribuição das distâncias genéticas em relação às distâncias geográficas em linha reta entre as populações de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. A. *Loci* alozimáticos; B. *Loci* de microssatélites. 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Coordenadas geográficas e quantidade de amostras analisadas de *Drosophila ornatifrons* para cada marcador, por localidade amostrada. 29
- Tabela 2** – Oligonucleotídeos de microssatélites descritos para *Drosophila mediopunctata* (LABORDA et al., 2009a) testados em linhagens de *D. ornatifrons*. Em negrito, os *loci* utilizados nas análises populacionais e de *pedigree* (com exceção do *locus* SSR053). 33
- Tabela 3** – Qualidade de amplificação e melhor temperatura para anelamento de oligonucleotídeos de microssatélites testados em linhagens de *Drosophila ornatifrons* (“+” = presença de amplificação; “-” = ausência de amplificação; TAH = taxa de amplificação heteróloga; NT = não testado). 35
- Tabela 4** – Frequência alélica de nove *loci* alozimáticos de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. CAN = Canguçu-RS; CHA = Chapecó-SC; PMA = Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF = Salto São Francisco-PR. n = número de indivíduos analisados. Em negrito os *loci* com frequência com desvio do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. 38
- Tabela 5** – Frequência alélica de dez *loci* de DNA microssatélite de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. ILH = Ilha dos Marinheiros-RS; CAN = Canguçu-RS; CHA = Chapecó-SC; PMA = Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF = Salto São Francisco-PR. n = número de indivíduos analisados. Em negrito os *loci* com frequência com desvio do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. 39
- Tabela 6** – Estatística F de Wright para os *loci* polimórficos de alozimas e microssatélites de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. Fit = Coeficiente de endocruzamento nas subpopulações; Fis = Coeficiente de endocruzamento total; Fst = Índice de fixação. I. C. = Intervalo de Confiança ao nível de significância de 95%. 41
- Tabela 7** – Valores de distância (*D*) e identidade (*I*) genéticas de Nei (1978) e heterozigosidades médias esperadas (*He*) e observadas (*Ho*) para populações

da espécie *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil para os *loci* de microssatélites e alozimas. ILH – Ilha dos Marinheiros-RS; CAN – Canguçu-RS; CHA – Chapecó-SC; PMA – Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF – Salto São Francisco-PR. *D* abaixo da diagonal, *I* acima da diagonal. Em negrito os valores para alozimas. XXX = comparações não realizadas para *loci* alozimáticos..... 42

LISTA DE SIGLAS

- %:** Porcentagem
- °C:** Graus Celsius
- µg/µL:** Miligramas por microlitro
- µL:** Microlitro
- CAN:** Canguçu
- CHA:** Chapecó
- cm:** Centímetro
- COI:** Citocromo c oxidase subunidade I
- COII:** Citocromo c oxidase subunidade II
- D:** Distância genética
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- EDTA:** Ácido etilenodiamino treta-acético
- EST:** Esterase
- FED:** Floresta Estadual Decidual
- FES:** Floresta Estadual Semidecidual
- Fis:** Coeficiente de endocruzamento
- Fit:** Coeficiente de endocruzamento total
- FOM:** Floresta Ombrófila Mista
- FPL:** Floresta Paludosa
- Fst:** Índice de fixação
- GPDH:** α-Glicerofosfato desidrogenase
- GUA:** Guairacá
- h:** Hora
- He:** Heterozigosidade esperada
- HK:** Hexoquinase
- Ho:** Heterozigosidade observada
- I:** Identidade genética
- I.C:** Intervalo de confiança
- IDH:** Isocitrato desidrogenase
- ILH:** Ilha dos Marinheiros
- LaGEv:** Laboratório de Genética e Evolução
- MDH:** Malato desidrogenase

ME: Enzima málica
mg/mL: Miligramas por mililitro
mm: Milímetro
mm/ano: Milímetros por ano
n: Número amostral
NT: Não testado
PAGE: Eletroforese de gel de poliacrilamida
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PGM: Fosfoglicomutase
pH: Potencial hidrogeniônico
PMA: Parque Municipal das Araucárias
rpm: rotações por minuto
SSF: Salto São Francisco da Esperança
TAH: Taxa de amplificação heteróloga
TC1: Sistema eletroforético Tris Citrato 1
TC2: Sistema eletroforético Tris Citrato 2
TFPGA: *Tools For Population Genetic Analyses*
V/cm: Volts por centímetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Mata Atlântica: um bioma ameaçado	19
2.2 Marcadores Moleculares.....	23
2.3 <i>Drosophila ornatifrons</i>	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos gerais	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Coleta dos espécimes.....	29
4.2 Triagem e preparo das amostras	30
4.3 Análises Moleculares	31
4.3.1 Alozymas.....	31
4.3.2 Microsatélites	31
4.4 Análises Populacionais	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Padronização metodológica – microsatélites	35
5.1.1 Padronização das temperaturas de anelamento.....	35
5.1.2 Teste de Alelos Nulos	36
5.2 Análises Populacionais	37
6. DISCUSSÃO	45
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Mata Atlântica brasileira está entre os biomas mais diversos do planeta, abrigando de 1 a 8% do total de espécies. Este bioma tem sido extremamente ameaçado pela ação antrópica, de forma que torna-se necessário a adoção de medidas conservacionistas a curto, médio e longo prazo.

Nesse contexto, a utilização de bioindicadores para avaliar a qualidade dos ecossistemas, aliado ao uso de marcadores que permitam acessar a variabilidade de populações naturais é uma ferramenta fundamental para o conhecimento e conservação dos remanescentes florestais.

O gênero *Drosophila* (Diptera; Drosophilidae) tem sido amplamente utilizado como um organismo modelo desde o início do século XX, principalmente a espécie *D. melanogaster*. As áreas de estudo são as mais variadas, compreendendo desde ecologia e sistemática até estudos na área de genética, filogenética e evolução.

Embora *Drosophila melanogaster* e diversas outras espécies do gênero já sejam conhecidas e seus padrões bem descritos, alguns grupos ainda carecem de informações, como é o caso do grupo *guarani* de *Drosophila*.

Drosophila ornatifrons é uma espécie do grupo *guarani*, de distribuição em áreas de mata na região Neotropical, ocorrendo em fragmentos de Mata Atlântica com baixa antropização, principalmente no sul do Brasil. Embora a espécie já esteja sendo utilizada em análises genéticas, nem sempre o foco dessas pesquisas é a estruturação populacional. Logo, estudos que acessem a variabilidade de populações naturais por meio de marcadores, sejam eles morfológicos ou moleculares, permitiriam compreender melhor o padrão de distribuição da variabilidade existente para essa espécie nas diferentes fitofisionomias da Mata Atlântica, possibilitando a correlação entre a variação e qualidade dos fragmentos estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mata Atlântica: um bioma ameaçado

A Mata Atlântica brasileira está entre os 25 *hotspots* de biodiversidade do mundo, abrigando uma grande diversidade de animais, plantas e tipos de habitats (MITTERMEIER et al., 2005; MYERS et al., 2000). Ocupa regiões costeiras do leste do Brasil atingindo sua extensão máxima no leste do Paraguai e nordeste da Argentina. Dada essa vasta extensão geográfica, é floristicamente diversificada, com várias fitofisionomias regionais de floresta tropical (ombrófila) e floresta estacional semidecidual, em função dos regimes de chuvas, além de formações campestres (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000).

Embora haja alguma controvérsia quanto a sua idade exata, a Mata Atlântica é considerada a mais antiga floresta brasileira, sendo formada por uma mistura de espécies que evoluíram a partir da vegetação nativa do final do Cretáceo, era em que a América do Sul estava se separando da África, há 65 milhões de anos (RIZZINI, 1997; COLOMBO; JOLY, 2010).

A alta diversidade e distribuição da Mata Atlântica foram influenciadas por eventos históricos, como as mudanças climáticas ocasionadas pelos vários eventos glaciais que ocorreram durante os períodos Terciário e Quaternário. Essas alterações nas condições de temperatura e umidade podem ter sido o fator determinante na diferenciação e padrão de distribuição das espécies durante os eventos de expansão e retração da floresta (HAFFER, 1969, 1993).

A Mata Atlântica brasileira cobria, originalmente, 1,3 milhões de quilômetros quadrados, distribuídos em 17 estados do território nacional sendo que, atualmente, os remanescentes estão reduzidos a cerca de 22% da cobertura vegetal e desses, apenas 7% são fragmentos com mais de 100 hectares e em bom estado de conservação (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015). Estima-se que esse bioma abrigue cerca de 35% das espécies vegetais existentes no Brasil, incluindo diversas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, e sua riqueza de espécies é maior que a de alguns continentes.

A perda de habitat é a principal ameaça para as espécies que ocupam o

bioma de Mata Atlântica (MYERS et al., 2000), sendo a conservação dos remanescentes a longo prazo uma tarefa desafiadora. Essa gestão dos remanescentes deveria priorizar a transformação dos mesmos em reservas de conservação, em que se reestabeleça a conectividade entre os fragmentos, além de aumentar a área das unidades de conservação para evitar os efeitos de borda (RIBEIRO et al., 2009).

Dentre as diferentes fitofisionomias florestais da Mata Atlântica, a Floresta Ombrófila Mista (FOM) se destaca no sul do Brasil, sendo composta por elementos arbóreos (perenifólios ou decíduos), arbustivos (lianas e epífitas), contudo a cobertura característica é a de *Araucaria angustifolia* que varia em abundância e porte (MAACK, 1981). Além do sul do Brasil, a FOM também ocorre em fragmentos no sudeste do Brasil, porém sua abrangência já foi muito mais ampla, atingindo o sul do estado do Mato Grosso em seu limite norte (AB'SABER, 2000).

O clima de ocorrência da FOM é classificado, segundo Köppen, como clima mesotérmico subtropical úmido e super úmido, sem estação seca e com verões frescos. As temperaturas médias dos meses mais quentes são inferiores a 22°C, com invernos com geadas severas e frequentes, e uma média de temperatura em torno de 12,9°C, de forma que a composição florística é fortemente influenciada por esses fatores (KÖPPEN, 1948; VELOSO et al., 1991, RODERJAN et al., 2002). A precipitação média está entre os 1300 e 1400 mm/ano (GOLFARI, 1971).

A região Centro-Sul do Paraná representa o mais preservado remanescente de Floresta Ombrófila Mista, contudo o aumento da urbanização e de áreas nativas desmatadas para utilização na agricultura tem resultado não apenas em um dramático decréscimo na cobertura total da floresta, mas em uma distribuição de tamanho cada vez mais distorcida dos remanescentes florestais. Esse processo de fragmentação é um dos fatores determinantes na perda de diversidade e taxa de extinção de espécies, e devido à sua importância, a região foi indicada por Castella e colaboradores (2004) como uma das 25 áreas prioritárias para a conservação de FOM no estado do Paraná (GIBBS; STANTON, 2001; FRANKHAM, 2003; CAVASINI et al., 2014).

Outras fitofisionomias florestais da Mata Atlântica que se destacam no sul do Brasil são Floresta Estacional Decidual (FED), Floresta Estacional

Semidecidual (FES) e Floresta Paludosa (FPL). As Florestas Estacionais estão sob influência de um período chuvoso e outro seco, sendo bem definida uma estação tropical com época de chuvas intensas seguidas por estiagem acentuada, e uma subtropical sem período seco, mas com seca fisiológica ocasionada pelo intenso frio de inverno, com temperaturas médias inferiores a 15°C. Desta forma, há sazonalidade de espécies arbóreas, o que pode ser considerado uma adaptação à deficiência hídrica (VELOSO et al., 1991; KOZLOWSKI et al., 1991).

As Florestas Estacionais Deciduais (FED) e Semideciduais (FES) se diferenciam, entre outras características, pela porcentagem de árvores caducifólias presentes no conjunto florestal, que situa-se entre 20 e 50% para FES e é superior a 50% em FED, no período desfavorável. São constituídas por elementos fanerófitos com gemas foliares protegidas da seca por escamas ou pelos e as folhas adultas são esclerófilas ou membranáceas deciduais e sua formação é considerada transicional entre as florestas tropicais e o Cerrado, sendo um importante elemento de ligação entre esses biomas (LEITÃO FILHO, 1987).

Já as Florestas Paludosas (FPL), também denominadas de florestas latifoliadas higrófilas ou matas de brejo, são florestas situadas em solos hidromórficos, com presença quase permanente de água na superfície do solo em função do afloramento de lençol freático (TORRES et al., 1994; IVANAUSKAS et al., 1997). Pela ocorrência restrita às áreas de solo encharcado, encontram-se naturalmente fragmentadas, constituindo florestas perenifólias (LEITÃO FILHO, 1982). Apresentam peculiaridades florísticas e estruturais, abrigando espécies endêmicas, e podem ser diferenciadas de outras formações que também estão presentes no entorno de cursos d'água, mas fora da condição de solo encharcado por longos períodos, como as florestas ripárias e estacionais semidecíduas (TORRES et al., 1994; TONIATO et al., 1998). As FPL são muito pouco estudadas no Brasil, e vem sofrendo um intenso processo de degradação, o que contribui ainda mais para a fragmentação desses ecossistemas (TORRES et al., 1994; TONIATO et al., 1998).

Dado o atual estado de degradação dos remanescentes de Mata Atlântica e considerando a cobertura espacial limitada nas unidades de

conservação existentes, torna-se necessária a elaboração de estratégias a fim de conservar e restaurar a biodiversidade existente nos fragmentos (CUNHA; GUEDES, 2013).

A utilização de organismos bioindicadores é muito importante para avaliar a qualidade das áreas naturais e como essas se alteram ao longo do tempo em virtude tanto da interferência antrópica como de estressores naturais (HOLT, 2010). As espécies do gênero *Drosophila* (Diptera; Drosophilidae) são um importante material, e de baixo custo, para este tipo de monitoramento ambiental devido a sua sensibilidade às variáveis abióticas e bióticas, que é refletida em sua dinâmica populacional; e a facilidade de ser coletada na maior parte dos ecossistemas terrestres, visto que é um organismo cosmopolita (PARSONS, 1991; FOOTE; CARSON, 2004).

Nos estudos que utilizam drosofilídeos como bioindicadores são analisados alguns parâmetros da comunidade e genética destes modelos, como a riqueza de espécies, a abundância populacional, e a frequência de inversões cromossômicas, para avaliar o efeito do tamanho, da qualidade, da disponibilidade de recursos hídricos, e do aquecimento global em fragmentos de diferentes formações vegetais (BALANYA et al., 2006; MATEUS et al., 2006; TIDON, 2006; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; PENARIOL et al., 2008; BATISTA; KLACZKO, 2013; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013; CAVASINI et al., 2014).

Para o entendimento mais amplo do efeito da fragmentação de habitats sobre as espécies é necessário relacionar os dados genéticos com o contexto ecológico, e compreender os padrões e mecanismos evolutivos que concatenam a genética do organismo e o ambiente no qual ele vive (TIDON, 2006). A importância desta correlação genética/ambiente pode ainda ser destacada pelo fato de que o potencial evolutivo das populações de áreas fragmentadas é comprometido devido à perda de variabilidade genética através da queda no número de indivíduos. A diminuição do tamanho populacional, por sua vez, torna as espécies susceptíveis à depressão endogâmica, diminuição da variação intrapopulacional e do fluxo gênico, o que aumenta a diferenciação genética com populações de outro fragmento e, mesmo se a causa da fragmentação for solucionada, os efeitos associados ao pequeno tamanho populacional persistirão (BROWN; KODRIC-BROWN, 1977; TEMPLETON et

al., 1990, 2001; RATHCKE; JULES, 1993; FRANKHAM, 2003). Os marcadores moleculares são as ferramentas mais adequadas para qualificar e quantificar a variabilidade genética das populações naturais, assim como para determinar as possíveis causas da distribuição desta variação.

2.2 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são ferramentas derivadas de qualquer tipo de dado molecular que forneça um polimorfismo detectável capaz de comparar e diferenciar dois ou mais indivíduos. Esses marcadores têm sido largamente utilizados em análises genéticas com as mais diversas finalidades, como identificação de clones, diferenciação de linhagens ou cultivares, testes de paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, mapeamento genético, reconstrução de filogenias e aplicações forenses (BACHMANN, 1997; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BAKER, 2000; AVISE, 2004; NYBOM, 2004).

A técnica de eletroforese de enzimas, estabelecida na década de 60, permitiu o desenvolvimento dos primeiros marcadores moleculares. A migração de variantes proteicas em um gel de eletroforese nativo, de acordo com as diferenças no tamanho, carga e forma, causadas pela substituição de aminoácidos, permitiu um avanço da genética de populações, pois forneceu um modo de acessar e avaliar a variação genética nas populações através do produto direto da expressão gênica (HUBBY; LEWONTIN, 1966; NEIGEL, 1997).

O uso das alozimas (moléculas com atividades catalíticas semelhantes) em populações naturais possibilitou o estudo da estruturação populacional, como essas populações se comportam ao longo do tempo e espaço, além de permitir a inferência dos eventos evolutivos atuantes e quais suas implicações na dinâmica das populações. Apesar da variação dos *loci* de alozimas ser menor que de marcadores moleculares de DNA, pois o código genético é degenerado, este marcador tem revelado resultados semelhantes e tão informativos quanto os de DNA em estudos de estrutura populacional e história evolutiva de espécies de *Drosophila* especialistas e generalistas (MATEUS; SENE, 2007; CAVASINI, 2009; MACHADO et al., 2010; HEINZ, 2012). Além

disso, por ser um produto gênico com função específica nas células, estudos de correlação entre as frequências alélicas ou genotípicas de alozimas e parâmetros ambientais permite a inferência de seleção natural, embora a ação direta da seleção no *locus* enzimático não possa ser provada (LAND et al., 2000; MATEUS; SENE, 2003; CAVASINI, 2009).

Com o avanço da biologia molecular nas últimas décadas foi possível o desenvolvimento de uma vasta gama de marcadores baseados em DNA. Os microssatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*), foram os primeiros largamente difundidos, pois uma vez identificados no genoma de uma espécie, apresentam alta reprodutibilidade via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), com a utilização de oligonucleotídeos específicos. Dessa forma, torna-se possível a genotipagem por meio da eletroforese dos produtos de amplificação de forma rápida e mais barata que o sequenciamento (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER; MAY, 1989).

Os microssatélites são constituídos por sequências de 2 a 6 pares de bases, repetidas em *tandem* no genoma, que revelam alto polimorfismo a partir da variação no número de repetições de seus motivos. Os mecanismos sugeridos para explicar essa alta taxa de mutação dos *loci* de microssatélites são o *crossing-over* desigual e deslizamentos (*slippage*) da DNA polimerase durante o processo de replicação ou reparo (STRAND et al., 1993).

Além da alta taxa de reprodutibilidade dos microssatélites, as outras características que fazem dele um marcador importante na genética de populações são: herança mendeliana do tipo codominante (como as alozimas), ampla distribuição no genoma dos eucariotos, hipervariabilidade, e pelo fato de poder ser considerado seletivamente neutro, devido a sua localização preferencialmente em regiões intergênicas.

Para grupos de espécies de *Drosophila*, outra vantagem de aplicação deste marcador é sua transferibilidade: os pares de oligonucleotídeos desenhados para uma espécie podem ser aplicados a outras espécies correlacionadas (MACHADO et al., 2003; MORAES; SENE, 2007; LABORDA et al., 2009a,b; TRACTZ et al., 2012), pois suas regiões flangeadoras são conservadas através dos táxons, permitindo a amplificação cruzada (PEAKALL et al., 1998). Contudo, em amplificações heterólogas, é esperada uma maior

frequência de alelos nulos, resultados de mutações nas regiões flangeadoras, as quais impedem a ligação dos oligonucleotídeos desenhados para um *locus* (CALLEN et al., 1993; ESTOUP; CORNUET, 1999; DAKIN; AVISE, 2004).

Desde a descrição dos marcadores microssatélites, ao final da década de 80, estes vem sendo amplamente empregados em uma diversidade de estudos tais como, a avaliação do nível de diferenciação entre organismos, genética e estruturação de populações, detecção de eventos ecológicos e evolutivos em populações naturais. Além disso, é possível analisar a correlação de comportamento de acasalamento com isolamento reprodutivo, avaliar níveis de fluxo gênico, dispersão de sementes e, ainda, introgressão em populações naturais de bioindicadores (HUTCHISON; TEMPLETON, 1999; CHAMBERS; MACAVOY, 2000; ACHMANN; et al., 2004; FRANCK et al., 2004; GEE, 2004; PATTEN et al., 2004; DIERINGER et al., 2005; STREIFF et al., 2005; SELKOE; TOONEN, 2006; KIMBERLY et al., 2006; MACHADO et al., 2010, 2012).

Apesar das vantagens específicas de cada marcador molecular, é a análise multilocus, associada a marcadores morfológicos e a ecologia dos organismos, que permite um entendimento mais amplo dos eventos e processos (históricos e contemporâneos) determinantes para o padrão de distribuição da variação de uma determinada espécie (PFEILER; MARKOW, 2001; DAS et al., 2004; MACHADO et al., 2012).

Em espécies de *Drosophila*, a combinação de marcadores moleculares e morfológicos tem sido realizada no estudo de populações neotropicais de áreas abertas e de mata com o objetivo de relacionar a estruturação genética com causas ecológicas e históricas, permitindo uma maior compreensão da distribuição da diversidade nestes ambientes (MATEUS; SENE, 2003, 2007; MORAES; SENE, 2007; CAVASINI, 2009; MORAES et al., 2009; MACHADO et al., 2010, 2012 ; MATEUS et al., 2010; HEINZ, 2012).

2.3 *Drosophila ornatifrons*

Alguns trabalhos referentes à composição da assembleia de *Drosophila* tem relatado a ocorrência de algumas espécies dos grupos *guarani* e *guaramunu* em diversos domínios morfoclimáticos brasileiros, remanescentes de áreas naturais com indicativos de baixa ação antrópica (MEDEIROS;

KLACZKO, 2004; TIDON, 2006; GOTTSCHALK et al., 2007; DÖGE et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010; HOCHMÜLLER et al., 2010; CAVASINI et al., 2014). A presença desses organismos no ambiente, assim como uma alta variabilidade podem ser bons indicativos da qualidade e estado de conservação dos remanescentes.

Drosophila ornatifrons é uma espécie Neotropical com distribuição em áreas de mata, principalmente na Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil (MEDEIROS; KLACZKO, 2004; TIDON, 2006; GOTTSCHALK et al., 2007; DÖGE et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010; HOCHMÜLLER et al., 2010; CAVASINI et al., 2014). Atualmente, esta espécie está incluída no grupo *guarani*, o qual anteriormente era dividido em dois subgrupos: *guarani* e *guaramunu* (KING, 1947). Contudo, estes subgrupos foram elevados à categoria de grupos por um conjunto de análises citogenéticas e moleculares que corroboraram esta alteração taxonômica (KASTRITSIS, 1969; KASTRITSIS et al., 1970; YOTOKO et al., 2003; ROBE et al., 2005, 2010a,b; HATADANI et al., 2009). Essas análises revelaram que as espécies do, até então, subgrupo *guaramunu* eram filogeneticamente mais relacionadas às espécies o grupo *tripunctata* (grupo irmão de *guarani*) que as pertencentes ao subgrupo *guarani*.

Embora existam vários trabalhos sobre as relações filogenéticas entre as espécies de *Drosophila* Neotropicais, poucos são os estudos que abordam a estruturação das populações de *D. ornatifrons*. Recentemente, alguns estudos começaram a realizar tal abordagem em populações de *D. ornatifrons* coletadas em áreas de Mata Atlântica do sul do Brasil, utilizando marcadores de alozimas, DNA microssatélite, morfometria da asa e do edeago e DNA mitocondrial (MACHADO et al., 2012; ZORZATO, 2012; TRAVA, 2014; GUSTANI et al., 2015).

Tractz e colaboradores (2012) realizaram testes de amplificação de oligonucleotídeos de microssatélites descritos para *Drosophila mediopunctata*, que tiveram amplificação positiva em outras espécies da radiação *tripunctata* (LABORDA et al., 2009a,b), em populações do sul do Brasil das espécies *D. maculifrons* e *D. ornatifrons*. Zorzato (2012), utilizando cinco dos *loci* testados por Tractz e colaboradores (2012) com amplificação heteróloga, realizou a análise da estrutura de duas populações de *Drosophila ornatifrons*, uma no

estado do Paraná e outra no Rio Grande do Sul. Foi encontrada alta diferenciação populacional, provavelmente devido a restrições ao fluxo gênico, já que a distância entre as duas populações estudadas é muito grande, contudo não foram amostradas populações intermediárias. Essa alta diferenciação nas populações de *D. ornatifrons* da região de Guarapuava/PR também foi verificada em *loci* de alozimas (MACHADO et al., 2012).

Gustani e colaboradores (2015) encontraram baixos índices de diversidade nucleotídica para haplótipos dos genes mitocondriais COI e COII em *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil quando comparados com outras espécies de *Drosophila*, e considerou que eventos de expansão populacional após o último máximo glacial, a partir do litoral sul, seriam responsáveis pelo padrão observado. Eventos recentes, como, por exemplo, de gargalo de garrafa, também poderiam estar contribuindo com a baixa diversidade observada.

A distribuição espacial de *loci* neutros, ou proximamente neutros (alozimas e microssatélites) em populações subdivididas geralmente é resultado de deriva genética e migração (SLATKIN, 1985). Deste modo, a aplicação destes marcadores em um número maior de populações de *Drosophila ornatifrons*, permitiria uma análise mais completa dos eventos históricos e recentes responsáveis pelo padrão de distribuição da variabilidade nesta espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a estrutura populacional por meio da análise e da comparação da variação de *loci* de microssatélites e alozimas de populações naturais da espécie *Drosophila ornatifrons*, coletadas na região sul do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Testar a amplificação de 18 *loci* de microssatélites descritos para *Drosophila mediopunctata* em indivíduos de isolinhagens de *D. ornatifrons* mantidas no LaGEv (Laboratório de Genética e Evolução) da UNICENTRO;
- Determinar a temperatura de pareamento ideal para os oligonucleotídeos dos *loci* de microssatélites selecionados;
- Analisar a variabilidade genética de *loci* de microssatélites e alozimas em cinco populações de *Drosophila ornatifrons* coletadas em remanescentes de Mata Atlântica do sul do Brasil;
- Comparar os dados obtidos para inferir os fatores evolutivos atuantes na variabilidade genética encontrada nas populações naturais de *Drosophila ornatifrons*, e assim relacionar a variação observada com a qualidade dos fragmentos de mata onde os espécimes foram coletados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos espécimes

Para a realização deste estudo foram utilizados 129 indivíduos, coletados em cinco áreas de Mata Atlântica isoladas geograficamente no sul do Brasil (Figura 1, Tabela 1). As populações amostradas serão referidas no restante do texto por suas siglas, descritas na legenda da Figura 1.

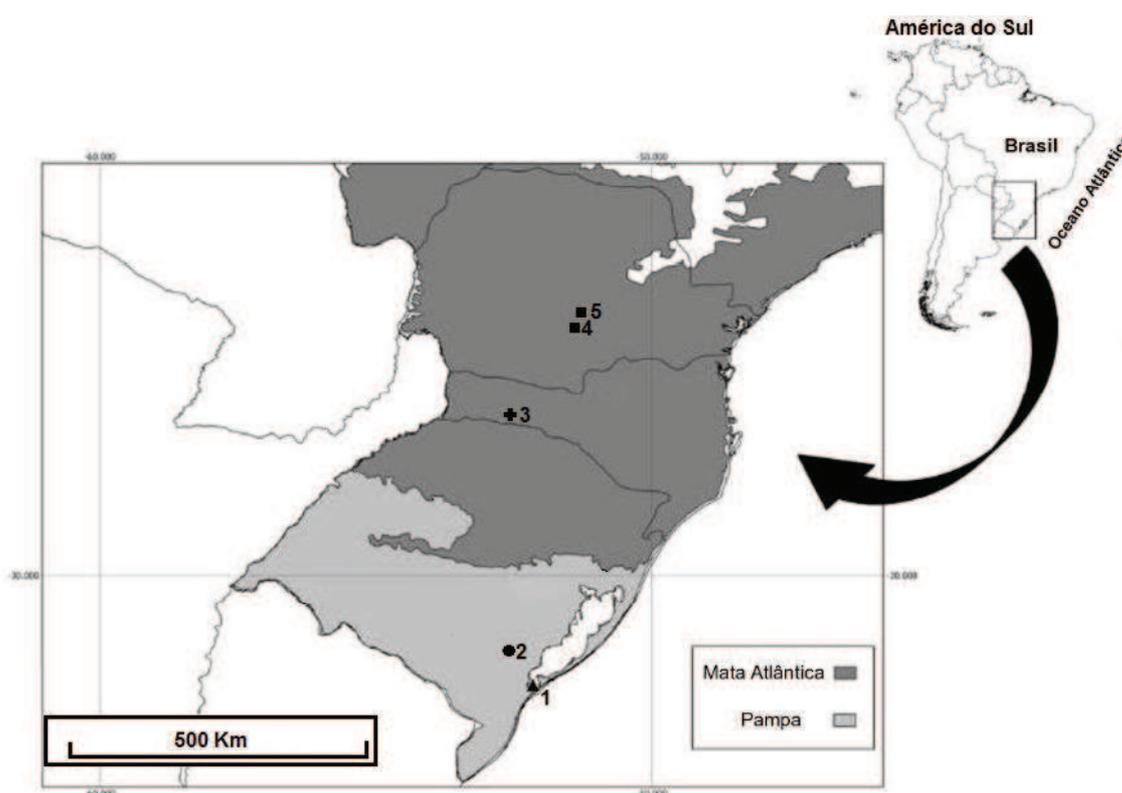


Figura 1 – Mapa dos biomas e das localidades de coleta de *Drosophila ornatifrons* no sul do Brasil. 1 – Ilha dos Marinheiros-RS (ILH); 2 – Canguçu-RS (CAN); 3 – Chapecó-SC (CHA); 4 – Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR (PMA); 5 – Salto São Francisco da Esperança, Guarapuava-PR (SSF). Os símbolos indicam as fitofisionomias de cada localidade: ■ Floresta Ombrófila Mista (FOM); + Floresta Estacional Decidual (FED); ● Floresta Estacional Semidecidual (FES); ▲ Floresta Paludosa (FPL).

Tabela 1 – Coordenadas geográficas e quantidade de amostras analisadas de *Drosophila ornatifrons* para cada marcador, por localidade amostrada.

Localidades	Coordenadas geográficas	Alozimas	Microssatélites
Parque das Araucárias-PR	51°27'19" O, 25°23'36" S	22	22
Salto São Francisco-PR	51°17'53" O, 25°03'49,1" S	20	36
Chapecó-SC	52°34'47" O, 27°05'37" S	6	9
Canguçu-RS	52°40'14" O, 31°23'54" S	8	45
Ilha dos Marinheiros-RS	52°09'33" O, 31°59'44" S	-	17
Total		56	129

As coletas foram realizadas entre 2011 e 2013 de acordo com o descrito por Dos Santos e colaboradores (2010), com modificações, utilizando armadilhas abertas constituídas de pratos no solo contendo bananas, laranjas e fermento biológico fresco (*Saccharomyces cerevisiae*). Após 24, 48 e 72 horas, as moscas foram capturadas com o auxílio de rede entomológica e, então, levadas ao laboratório para identificação. Os indivíduos amostrados de ILH e 17 indivíduos de CAN foram cedidos pela Profa. Dra. Lizandra Jaqueline Robe da Universidade Federal do Rio Grande, em Rio Grande/RS.

4.2 Triagem e preparo das amostras

Os indivíduos coletados foram triados em estereomicroscópio, com auxílio da chave de identificação de Freire-Maia e Pavan (1949). Todos machos cujas características morfológicas eram condizentes com as espécies do grupo *guarani* foram então separados, sendo os últimos tergitos contendo a genitália masculina armazenados em microtubos individuais em álcool 70% para confecção de lâminas de edeago, segundo Kaneshiro (1969), com modificações, para confirmar a identificação. O restante da mosca foi separado em microtubos da seguinte forma: cabeça e porção superior do tórax armazenados em álcool 70% a -20°C para análises de *loci* de microssatélites e a porção inferior de tórax e abdômen congelados à seco para análises de *loci* alozimáticos.

Para a padronização da metodologia utilizada nas análises de DNA microssatélite (experimentos de temperatura de anelamento) foram utilizados cinco indivíduos de *Drosophila ornatifrons* provenientes de isolinhagens de PMA e de SSF mantidas no LaGEv. Para obtenção das isolinhagens os indivíduos foram coletados e, após triagem as supostas fêmeas do grupo *guarani* foram colocadas para ovipositar em BOD a 20° C. Após o nascimento dos descendentes, os machos foram identificados pela análise do edeago e, a fêmea e seus descendentes, quando pertencentes à espécie *D. ornatifrons*, constituíram as isolinhagens as quais são semanalmente repicadas para novo meio de cultura. Indivíduos destas isolinhagens também foram utilizados em teste de *pedigree* para verificar a existência de alelos nulos nos *loci* de microssatélites.

4.3 Análises Moleculares

4.3.1 Aozimas

Para as análises alozimáticas não foram utilizados indivíduos de *Drosophila ornatifrons* provenientes de ILH, pois estes foram enviados em álcool, impossibilitando sua aplicação para os *loci* de alozimas.

As amostras, compostas pela metade inferior do tórax e abdômen das moscas, foram individualmente homogeneizadas em 30 µL de água destilada. Após centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi absorvido por papel de filtro Whatman 3MM (5 x 7 mm), aplicado em gel horizontal de amido (20,5 cmx14cmx0,8cm) a 14% (Penetrose 30™). Foram analisados sete sistemas alozimáticos divididos em duas classes de tampão: - TC1 (Tris Citrato 1 - CASTANHEIRA; CONTEL, 1995) – Esterase (EST), α-Glicerofosfato desidrogenase (GPDH), Isocitrato desidrogenase (IDH), Malato desidrogenase (MDH), e Enzima málica (ME); - TC2 (Tris Citrato 2 - SENE; CARSON, 1977) – Fosfoglicomutase (PGM) e Hexoquinase (HK).

Foi aplicada uma corrente de 3V/cm nos géis e estes correram a 4° C por 5h (TC1) e 5:30h (TC2). A coloração para EST foi preparada pelo método de Harris e Hopkinson (1976); GPDH, IDH e ME pelo método descrito por Falcão e Contel (1991a); PGM e HK pelo método descrito por Mateus e Sene (2003); e MDH pelo método descrito por Falcão e Contel (1991b). Posteriormente, os géis foram fotografados em sistema de captura de imagens (Molecular Imaging L-Pix HE – Loccus Technology), e genotipados. Os locos foram numerados em ordem crescente do mais aniônico para o mais catiônico.

4.3.2 Microsatélites

A extração do DNA das amostras foi realizada pela maceração da cabeça e parte superior do tórax das moscas em microtubos individuais contendo 167 µL de Solução de Lise de Núcleo (Promega) e 40 µL de EDTA (pH = 8,0). Foram acrescentados 6 µL de Proteinase K (20 mg/mL) às amostras, e após incubação a 65°C por duas horas, foram adicionados 67 µL de Solução de Precipitação de Proteína (Promega). As amostras foram então mantidas em gelo por 10 minutos. Após centrifugação, por 4 minutos a 14000

rpm, para precipitação das proteínas, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos, e a ele foram acrescentados 200 µL de isopropanol. O isopropanol foi descartado após centrifugação, e o DNA foi purificado em ciclos de centrifugação e descarte de 200 µL de etanol 70%. Após secagem a 40° C, o DNA foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura e autoclavada e armazenado a -20°C.

Foram testados 18 *loci* de microssatélites (Tabela 2) descritos por Laborda e colaboradores (2009a) para a espécie *Drosophila mediopunctata* que também tiveram amplificação positiva de qualidade em *D. ornatifrons* (LABORDA et al., 2009b). As condições da PCR foram as mesmas expostas no trabalho de descrição dos oligonucleotídeos, utilizando o termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies). Com exceção do *locus* SSR087, cuja temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos testada foi de 60° C, todos os *loci* foram testados em *touchdown*, variando de 60°C a 48°C, com a temperatura caindo 1°C a cada ciclo de anelamento. Os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994; MACHADO et al., 2003). Os géis foram fotografados utilizando câmera Sony 10.2 MP acoplada ao sistema de captura de imagens (Molecular Imaging L-Pix HE – Locus Technology). A partir das imagens foram selecionados os *loci* com amplificação positiva para todos os indivíduos analisados, os quais tiveram as temperaturas padronizadas.

Para os oligonucleotídeos com amplificação positiva para todos os indivíduos analisados (Tabela 2, em negrito), foram realizados testes para determinar a temperatura ideal de anelamento dos mesmos, segundo as seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 25 ciclos de um minuto de desnaturação a 94°C, 60 segundos na temperatura de anelamento testada (variação de 48°C a 60°C, com a temperatura aumentando dois graus, em reações diferentes) e 72°C por dois minutos. A melhor temperatura de pareamento para cada par de oligonucleotídeos foi definida por meio de visualização das bandas específicas, ou seja, com menor número de rastros e bandas inespecíficas que pudessem comprometer a genotipagem dos alelos nos estudos populacionais.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos de microssatélites descritos para *Drosophila mediopunctata* (LABORDA et al., 2009a) testados em linhagens de *D. ornatifrons*. Em negrito, os *loci* utilizados nas análises populacionais e de *pedigree* (com exceção do *locus* SSR053).

<i>Loci</i>	
Dmed^{UNICAMP}_ssr034	Dmed^{UNICAMP}_ssr087
Dmed ^{UNICAMP} _ssr039	Dmed ^{UNICAMP} _ssr095
Dmed ^{UNICAMP} _ssr041	Dmed^{UNICAMP}_ssr096
Dmed^{UNICAMP}_ssr053	Dmed ^{UNICAMP} _ssr099
Dmed ^{UNICAMP} _ssr054	Dmed ^{UNICAMP} _ssr102
Dmed ^{UNICAMP} _ssr056	Dmed^{UNICAMP}_ssr107
Dmed^{UNICAMP}_ssr057	Dmed^{UNICAMP}_ssr118
Dmed^{UNICAMP}_ssr065	Dmed^{UNICAMP}_ssr126
Dmed^{UNICAMP}_ssr079	Dmed ^{UNICAMP} _ssr133

Após a padronização das temperaturas para cada oligonucleotídeo, foi realizado teste de *pedigree* nas linhagens de *Drosophila ornatifrons* para verificar a existência de alelos nulos em nove dos 10 *loci* aplicados nas análises populacionais. As condições da PCR da análise de *pedigree* foram as mesmas descritas acima, contudo a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi a melhor encontrada para cada *locus* no teste realizado, descrito anteriormente. Foram separados fêmeas e machos de cada isolinhagem ao nascer, após um período de sete dias para maturação sexual foram realizados cruzamentos em tubos com meio de cultura e contendo um casal em cada. Após uma semana, os parentais foram retirados e armazenados em microtubos individuais com álcool 70% a -20°C. Apenas um casal de cada linhagem produziu descendentes, os quais também foram armazenados. A análise de *pedigree* foi realizada determinando o genótipo dos parentais e da F1 correspondente.

Para as análises populacionais de microssatélites foram aplicados 10 dos 18 *loci* testados (Tabela 2, em negrito), a genotipagem foi realizada por meio das imagens dos géis, e os alelos visualizados foram numerados em ordem crescente, sendo o alelo “1” o de menor tamanho.

4.4 Análises Populacionais

A matriz de dados gerada, após a genotipagem dos *loci* de alozimas e microssatélites, foi aplicada ao programa computacional TFGA (*Tools For Population Genetic Analyses* - MILLER, 1997), utilizado para obter a frequência alélica, heterozigosidade média (observada – H_o , e esperada – H_e),

porcentagem de *loci* polimórficos, estatística F de Wright (WEIR; COCKERHAM, 1984), distância genética (NEI, 1978), teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste exato com Cadeia de Markov (10 *batches* e 2000 permutações por *batches*), e teste de Mantel (1967) correlacionando as distâncias genéticas (NEI, 1978) com as distâncias geográficas. Os gráficos de correlação do Teste de Mantel também foram gerados pelo *software* TFPGA. O programa GDA (*Genetic Data Analysis* – LEWIS; ZAYKIN, 2001) foi utilizado para realização de agrupamento *Neighbor Joining*.

Os valores obtidos para F_{st} por meio da estatística F de Wright foram aplicados na classificação da diferenciação genética entre os fragmentos (análises espaciais) usando o guia qualitativo proposto por Wright (1978) em 'baixo' (0 – 0,05), 'moderado' (0,05 – 0,15), 'alto' (0,15 – 0,25) e 'muito alto' (> 0,25).

Foi utilizado ainda, o *software* BOTTLENECK 1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY et al., 1999) para verificar a existência de possíveis eventos de gargalo de garrafa nas populações amostradas. Para isso, foram escolhidos os modelos TPM (*Two Phase Model*) e SSM (*Stepwise Mutation Model*) com os parâmetros propostos no site do programa, por serem mais sensíveis para dados de microssatélites, e o modelo IAM (*Infinite Allele Model*) para as frequências dos *loci* de alozimas (PIRY et al., 1999). Os valores do teste de sinal e do teste de Wilcoxon foram utilizados para obter os dados estatísticos para as populações.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização metodológica – microssatélites

5.1.1 Padronização das temperaturas de anelamento

Foram testados 18 oligonucleotídeos, dos quais 10 tiveram amplificação positiva e de qualidade para a espécie *Drosophila ornatifrons* na etapa de padronização e teste de *pedigree* e, estes foram empregados nas análises populacionais. Embora 13 oligonucleotídeos tenham apresentado amplificação positiva pelo método *touchdown*, quando testados para a melhor temperatura de anelamento, os *loci* SSR095 e SSR099 não amplificaram (Tabela 3), já o *locus* SSR102 apresentou amplificação positiva em *touchdown* e nos testes de temperatura, porém não houve amplificação nas análises de *pedigree* e populacionais, sendo também desconsiderado.

A taxa de amplificação heteróloga total em *touchdown* foi de 72,22%, caindo para 55,55% quando testadas as temperaturas específicas de pareamento para cada oligonucleotídeo.

Tabela 3 – Qualidade de amplificação e melhor temperatura para anelamento de oligonucleotídeos de microssatélites testados em linhagens de *Drosophila ornatifrons* (“+” = presença de amplificação; “-” = ausência de amplificação; TAH = taxa de amplificação heteróloga; NT = não testado).

Oligonucleotídeos	Qualidade da amplificação pelo método <i>touchdown</i>	Melhor temperatura de anelamento para os oligonucleotídeos
Dmed ^{UNICAMP} –ssr034	+	56°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr039	-	NT
Dmed ^{UNICAMP} –ssr041	-	NT
Dmed ^{UNICAMP} –ssr053	+	56°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr054	-	NT
Dmed ^{UNICAMP} –ssr056	-	NT
Dmed ^{UNICAMP} –ssr057	+	58°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr065	+	51°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr079	+	58°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr087	+	60°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr095	+	-
Dmed ^{UNICAMP} –ssr096	+	52°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr099	+	-
Dmed ^{UNICAMP} –ssr102	+	48°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr107	+	55°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr118	+	58°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr126	+	56°C
Dmed ^{UNICAMP} –ssr133	-	NT
TAH	72,22%	55,55%

5.1.2 Teste de Alelos Nulos

Foram analisados 14 indivíduos, provenientes de dois cruzamentos. Um cruzamento consistindo dos parentais mais quatro descendentes, e o outro com o casal parental e seis descendentes. Nove entre os 10 *loci* aplicados nas análises populacionais foram utilizados nos teste de *pedigree* para verificar a existência de alelos nulos: SSR034, SSR057, SSR065, SSR079, SSR087, SSR096, SSR107, SSR118, e SSR126.

Apenas um *locus*, SSR079, apresentou alelos nulos, nos dois cruzamentos analisados. Alguns indivíduos da F1 de um cruzamento foram homozigotos 1/1 ou 2/2, e os parentais também foram homozigotos para os mesmos alelos (Figura 2A), deste modo esperava-se que toda a prole fosse heterozigota 1/2. A ausência de heterozigotos na F1, e homozigotos para os dois alelos indica que ambos os parentais apresentam alelos nulos. No outro cruzamento, apesar de não ter havido amplificação do macho parental, foi possível observar que a fêmea parental apresentou alelo nulo, pois dois dos descendentes F1 não apresentam o alelo materno visualizado no gel (Figura 2B), sendo, portando, o alelo nulo da mãe.

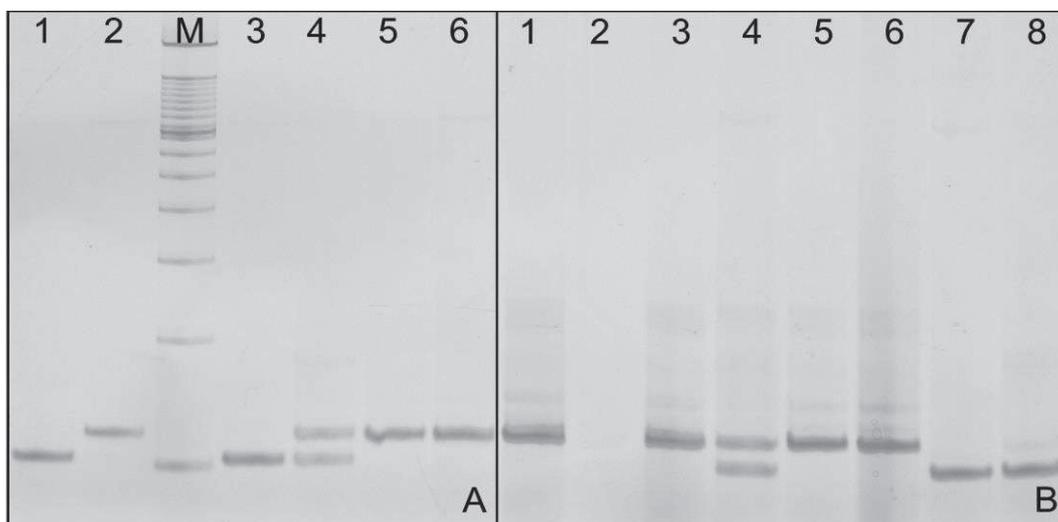


Figura 2 – PAGE 6% de amplificação do *locus* SSR079 em cruzamentos de *Drosophila ornatifrons*. M = Marcador 100 pares de bases (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); **A** – 1 e 2 = parentais da linhagem SSF (1 = fêmea, 2 = macho); 3 a 6 = descendentes F1. Genótipos: 1 = 1/1, 2 = 2/2, 3 = 1/1, evidenciando a ocorrência de alelo nulo no macho parental, logo que o alelo '1' seria herdado da mãe, 4 = 1/2, 5 e 6 = 2/2, evidenciando a ocorrência de alelo nulo na fêmea parental, pois o alelo '2' tem origem paterna. **B** – 1 e 2 = parentais da linhagem de PMA (1 = fêmea, 2 = macho); 3 a 8 = descendentes F1. Genótipos: 1 = 2/2, 2 = não amplificou, 3, 5 e 6 = 2/2, 4 = 1/2, 7 e 8 = 1/1, herdaram o alelo nulo da mãe, que não aparece no gel (ver explicação no texto).

A análise de *pedigree* também evidenciou a ocorrência de uma mutação no *locus* SSR096 (Figura 3), pois os parentais e três dos quatro descendentes foram homozigotos para o alelo 1 e um indivíduo F1 apresentou genótipo 1/2.

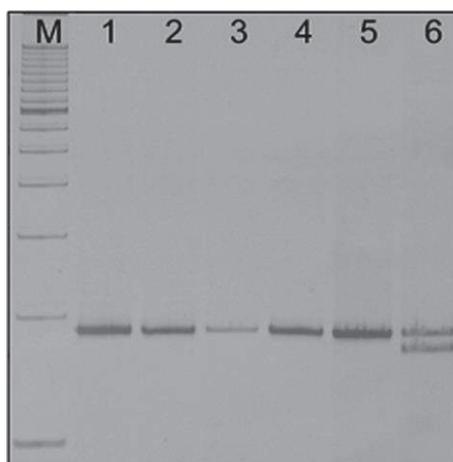


Figura 3 – PAGE 6% de amplificação do *locus* SSR096 em cruzamentos de *Drosophila ornatifrons*. M = Marcador 100 pares de bases (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 1 e 2 = parentais da linhagem SSF (1 = fêmea, 2 = macho); 3 a 6 = descendentes F1. Genótipos: 1 a 5 = 1/1, 6 = 1/2, sugerindo a ocorrência de uma mutação, o alelo '2', no indivíduo 6.

5.2 Análises Populacionais

A partir dos sete sistemas alozimáticos utilizados, foram obtidos nove *loci* para as populações da espécie *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil: *Hk*, *Pgm*, *Est-1*, *Est-2*, *Idh*, *Gpdh*, *Me*, *Mdh-1* e *Mdh-2*. Destes nove *loci*, seis (66,67%) foram polimórficos e as frequências alélicas de três (50% deles) estavam fora do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em mais de uma população. A média do número de alelos foi de 3,33 por *locus*, variando entre um alelo, para *Hk*, *Gpdh* e *Mdh-1*, e seis alelos, para *Est-1* e *Est-2* (Tabela 4). Os alelos exclusivos encontrados tiveram frequências baixas (<0,20).

Para microssatélites, os 10 *loci* analisados foram polimórficos, e as frequências alélicas de cinco (50% deles) estavam fora do esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg em pelo menos uma população. Foi encontrada média de 5,4 alelos por *locus*, variando de dois alelos para os *loci* SSR053 e SSR079 a 12 alelos no *locus* SSR034 (Tabela 5).

Foi observada a presença de alelos exclusivos de microssatélites nas cinco populações amostradas em sete dos *loci*. As populações de ILH, CAN, CHA e SSF apresentaram dois alelos exclusivos cada, enquanto a população de PMA apresentou um alelo exclusivo. Os *loci* SSR04 e SSR126

apresentaram dois alelos exclusivos cada, enquanto SSR057, SSR087, SSR096, SSR107 e SSR118 apresentaram um alelo exclusivo.

Para os *loci* alozimáticos os valores de heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,2222 em CHA a 0,5330 em SSF, estando superior ao valor de heterozigosidade esperada (H_e) para a população de SSF ($H_o = 0,5330$; $H_e = 0,4451$), enquanto para microssatélites os valores de heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,2988 em PMA a 0,4067 em SSF.

Tabela 4 – Frequência alélica de nove *loci* alozimáticos de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. CAN = Canguçu-RS; CHA = Chapecó-SC; PMA = Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF = Salto São Francisco-PR. n = número de indivíduos analisados. Em negrito os *loci* com frequência com desvio do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

<i>Loci</i>	CAN	CHA	PMA	SSF
<i>Pgm</i>	n = 6	n = 6	n = 13	n = 15
1	-	0,0833	-	-
2	0,1667	-	0,1154	0,1333
3	0,5000	0,7500	0,6154	0,3000
4	0,3333	0,1667	0,2692	0,5000
5	-	-	-	0,0667
<i>Me</i>	n = 8	n = 6	n = 19	n = 20
1	0,1875	0,2500	0,3158	0,1750
2	0,4375	0,5834	0,4474	0,4750
3	0,3125	0,0833	0,2368	0,2000
4	0,0625	0,0833	-	0,1500
<i>Mdh-1</i>	n = 8	n = 6	n = 22	n = 20
1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-2</i>	n = 7	n = 6	n = 19	n = 18
1	0,5000	0,7500	0,5789	0,5000
2	0,5000	0,2500	0,4211	0,5000
<i>ldh</i>	n = 7	n = 6	n = 16	n = 17
1	0,2144	0,7500	-	-
2	0,3571	0,0833	0,6562	0,4415
3	0,3571	0,1667	0,1563	0,2355
4	0,0714	-	0,1875	0,3230
<i>Est-1</i>	n = 8	n = 6	n = 21	n = 20
1	0,0625	0,5000	0,0476	0,2250
2	0,0625	0,3333	0,0476	0,2500
3	0,2500	0,1667	0,2382	0,2000
4	0,3750	-	0,3333	0,1750
5	0,1875	-	0,3333	0,1000
6	0,0625	-	-	0,0500
<i>Est-2</i>	n = 8	n = 6	n = 17	n = 19
1	0,1875	0,5000	0,1765	0,0789
2	0,3125	0,5000	0,3529	0,2895
3	-	-	0,4706	0,3684
4	-	-	-	0,1579
5	0,3125	-	-	0,1053
6	0,1875	-	-	-
<i>Gpdh</i>	n = 4	n = 6	n = 11	n = 12
1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Hk</i>	n = 6	n = 5	n = 13	n = 7
1	1,0000	1,0000	1,000	1,0000
%	66,7	66,7	66,7	66,7

Tabela 5 – Frequência alélica de dez *loci* de DNA microssatélite de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. ILH = Ilha dos Marinheiros-RS; CAN = Canguçu-RS; CHA = Chapecó-SC; PMA = Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF = Salto São Francisco-PR. n = número de indivíduos analisados. Em negrito os *loci* com frequência com desvio do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Locus	ILH	CAN	CHA	PMA	SSF
SSR034	n = 17	n = 31	n = 9	n = 22	n = 36
1	-	-	0,0556	-	-
2	-	0,0161	-	0,0455	-
3	0,0294	0,0161	-	0,0455	0,0278
4	0,1177	0,0807	0,0556	0,3409	0,1250
5	0,0294	0,1452	-	0,1136	0,1667
6	0,0882	0,1774	0,2221	0,1818	0,2082
7	0,2353	0,1935	0,3889	0,1136	0,2778
8	0,2059	0,1291	-	0,0909	0,1250
9	0,0588	0,1129	0,1667	0,0455	0,0417
10	-	0,0161	-	-	-
11	0,2059	0,0968	0,1111	0,0227	0,0278
12	0,0294	0,0161	-	-	-
SSR053	n = 15	n = 42	n = 9	n = 22	n = 27
1	0,9667	0,7738	0,8889	0,9545	0,7222
2	0,0333	0,2262	0,1111	0,0455	0,2778
SSR057	n = 16	n = 43	n = 9	n = 22	n = 35
1	0,5000	0,3023	0,7778	0,9319	0,1714
2	0,0938	0,1744	0,1111	0,0227	0,3857
3	0,2188	0,2442	0,1111	0,0227	0,2429
4	0,1874	0,2442	-	0,0227	0,2000
5	-	0,0349	-	-	-
SSR065	n = 13	n = 38	n = 0	n = 7	n = 15
1	-	0,1710	-	-	0,1333
2	-	0,2500	-	0,2857	0,4333
3	0,8846	0,4079	-	0,7143	0,2667
4	0,1154	0,1316	-	-	0,1000
5	-	0,0395	-	-	0,0667
SSR079	n = 15	n = 43	n = 9	n = 20	n = 23
1	0,9333	0,6163	0,0889	0,8750	0,7609
2	0,0667	0,3837	0,1111	0,1250	0,2391
SSR087	n = 16	n = 43	n = 9	n = 20	n = 32
1	0,0625	0,0698	-	-	-
2	0,1251	0,1860	0,2222	0,1250	0,1406
3	0,2813	0,2442	0,5000	0,1250	0,0781
4	0,3438	0,2442	0,2222	0,0750	0,3438
5	0,1251	0,1628	-	0,3000	0,2813
6	0,0625	0,0465	0,0556	0,2000	0,1406
7	-	0,0465	-	0,1500	0,0156
8	-	-	-	0,0250	-

Tabela 5 – Continuação

Locus	ILH	CAN	CHA	PMA	SSF
SSR096	n = 6	n = 44	n = 9	n = 21	n = 30
1	-	-	-	-	0,0167
2	-	0,0227	-	0,0476	0,0833
3	0,3333	0,5568	0,3333	0,5000	0,3000
4	0,1667	0,0795	0,1111	0,0476	0,1167
5	0,4167	0,2045	0,0556	0,1667	0,2333
6	0,0833	0,1023	0,1111	0,1429	0,1833
7	-	0,0342	0,3889	0,0952	0,0667
SSR107	n = 15	n = 44	n = 5	n = 19	n = 23
1	0,0333	-	-	-	-
2	0,3000	0,2045	0,2000	0,3158	0,5653
3	0,4000	0,2273	-	0,2368	0,1304
4	0,1667	0,4205	-	0,3684	0,2826
5	0,0667	0,0682	0,6000	0,0526	0,0217
6	0,0333	0,0568	-	-	-
7	-	0,0227	0,2000	0,0264	-
SSR118	n = 17	n = 45	n = 9	n = 22	n = 33
1	-	0,0111	-	0,0227	0,0455
2	0,1765	0,4778	0,4444	0,2727	0,3182
3	0,6471	0,3889	0,4444	0,6137	0,3788
4	0,1471	0,0667	-	0,0909	0,2273
5	0,0293	0,0555	0,1112	-	0,0151
6	-	-	-	-	0,0151
SSR126	n = 17	n = 45	n = 6	n = 22	n = 27
1	0,2059	0,6333	0,1666	0,6136	0,8704
2	0,0294	0,2223	0,5000	0,1136	0,0926
3	0,7059	0,1444	0,1667	0,2728	0,0370
4	-	-	0,1667	-	-
5	0,0588	-	-	-	-

A estatística F de Wright (1978) mostrou diferenciação genética moderada e estatisticamente diferente de zero para ambos os marcadores ($F_{st} = 0,0737$ – alozimas; $F_{st} = 0,0796$ – microssatélites), com o intervalo de confiança também incluindo valores de baixa diferenciação ($<0,05$), sugerindo estruturação das populações (Tabela 6).

Baixa deficiência de heterozigotos foi observada nas populações para alozimas ($F_{is} = 0,0052$) e moderada no total ($F_{it} = 0,0785$), enquanto para microssatélites foi detectada alta deficiência de heterozigotos ($F_{is} = 0,3734$ e $F_{it} = 0,4233$) com valores não estatisticamente diferentes de zero (Tabela 6). Como os valores mínimos de F_{is} e F_{it} incluem o zero, estas não foram

estatisticamente diferentes de zero. Assim, não será possível discutir se os valores positivos podem ser resultado de alguns fatores evolutivos, tais como, a presença de alelos nulos, endogamia ou ainda um efeito de Wahlund.

Tabela 6 – Estatística F de Wright para os *loci* polimórficos de alozimas e microsatélites de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. **Fit** = Coeficiente de endocruzamento nas subpopulações; **Fis** = Coeficiente de endocruzamento total; **Fst** = Índice de fixação. I. C. = Intervalo de Confiança ao nível de significância de 95%.

Locí alozimas	Fit	Fst	Fis
<i>Pgm</i>	0,1695	0,0525	0,1234
<i>Est -1</i>	0,3423	0,0614	0,2993
<i>Est-2</i>	0,2330	0,1015	0,1452
<i>Idh</i>	0,0553	0,1914	-0,1683
<i>Me</i>	-0,0371	-0,0109	-0,0260
<i>Mdh-2</i>	-0,5272	0,0174	-0,5543
Todos os <i>loci</i>	0,0785	0,0737	0,0052
I.C. 95%			
Mínimo	-0,1763	0,0228	-0,2618
Máximo	0,2379	0,1344	0,1830
Locí microsatélites			
SSR034	0,1828	0,0173	0,1684
SSR053	0,6671	0,0523	0,6487
SSR057	0,6126	0,1717	0,5323
SSR065	0,7470	0,1092	0,7160
SSR079	0,6371	0,0777	0,6065
SSR087	0,3850	0,0316	0,3649
SSR096	0,1470	0,0292	0,1214
SSR107	0,2645	0,0752	0,2047
SSR118	0,2189	0,0387	0,1874
SSR126	0,7161	0,2115	0,6399
Todos os <i>loci</i>	0,4233	0,0796	0,3734
I.C. 95%			
Mínimo	0,2822	0,0431	0,2519
Máximo	0,5698	0,1235	0,5171

Os valores de distância e identidade genéticas de Nei (1978) reforçam a diferenciação entre as populações analisadas (Tabela 7), sendo a menor distância genética (*D*) observada entre SSF e CAN (*D* = 0,0193) e, a maior, entre PMA e CHA (*D* = 0,1507) (dados de alozimas, em negrito).

Tabela 7 – Valores de distância (*D*) e identidade (*I*) genéticas de Nei (1978) e heterozigosidades médias esperadas (*He*) e observadas (*Ho*) para populações da espécie *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil para os *loci* de microssatélites e alozimas. ILH – Ilha dos Marinheiros-RS; CAN – Canguçu-RS; CHA – Chapecó-SC; PMA – Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF – Salto São Francisco-PR. *D* abaixo da diagonal, *I* acima da diagonal. Em negrito os valores para alozimas. **xxx** = comparações não realizadas para *loci* alozimáticos.

	ILH	CAN	CHA	PMA	SSF
ILH	-	0,8477	0,8340	0,9056	0,7699
CAN	xxx 0,1652	-	0,9207 0,8160	0,9786 0,8961	0,9809 0,9397
CHA	xxx 0,1815	0,0827 0,2033	-	0,8601 0,8496	0,8689 0,7234
PMA	xxx 0,0992	0,0216 0,1097	0,1507 0,1630	-	0,9736 0,8428
SSF	xxx 0,2615	0,0193 0,0622	0,1406 0,3237	0,0268 0,1710	-
<i>Ho</i>	0,3906 -	0,4050 0,4153	0,3284 0,2222	0,2988 0,3819	0,4067 0,5330
<i>He</i>	0,5228 -	0,6551 0,4401	0,5581 0,3194	0,5076 0,3907	0,6200 0,4451

A análise de agrupamento *Neighbor Joining* (Figura 4), utilizando as distâncias genéticas de Nei (1978), demonstrou que não há relação entre distância genética e posicionamento geográfico para ambos os marcadores, apesar da separação das populações do estado do Paraná para os *loci* de alozimas. Este dado foi corroborado pela ausência de correlação entre as distâncias genéticas de Nei (1978) e as distâncias geográficas das populações por meio do teste de Mantel ($r = -0,4347$; $p = 0,8220$ – alozimas; $r = -0,2862$; $p = 0,8390$ – microssatélites) (Figura 5A, 5B).

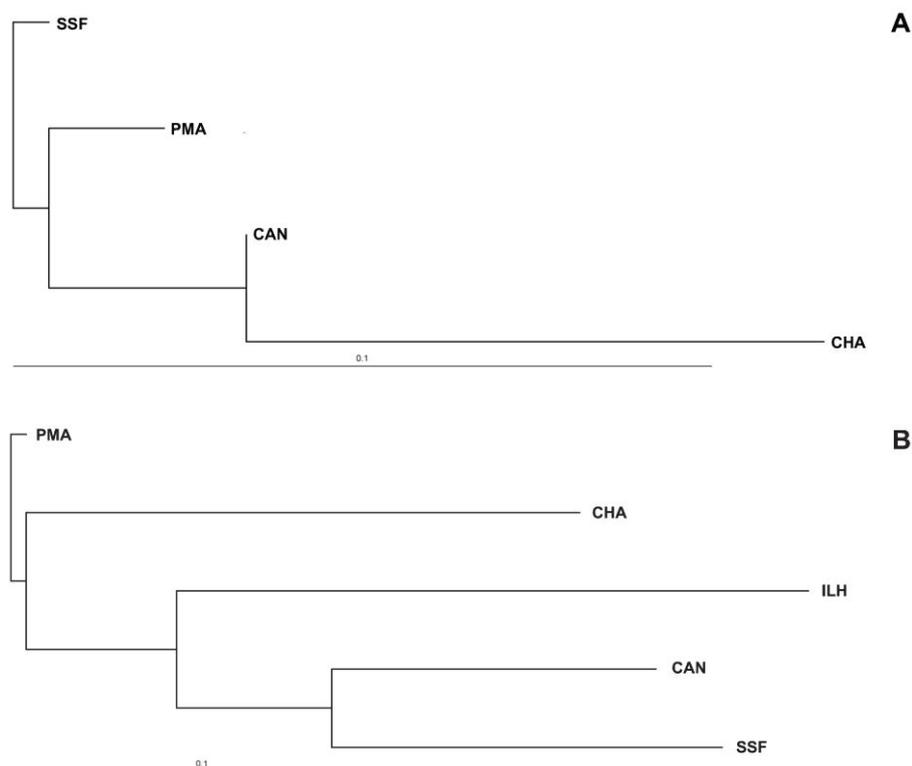


Figura 4 – Agrupamento *Neighbor Joining* entre populações de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil utilizando distância genética de Nei (1978), baseado em *loci* alozimáticos (A) e de microssatélites (B). ILH = Ilha dos Marinheiros-RS; CAN = Canguçu-RS; CHA = Chapecó-SC; PMA = Parque Municipal das Araucárias-PR; SSF = Salto São Francisco-PR.

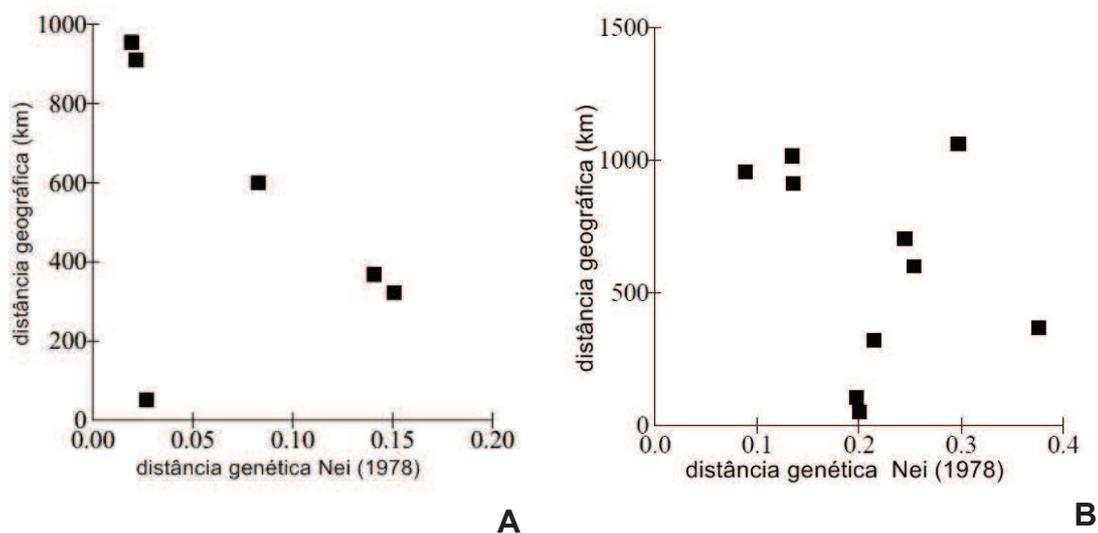


Figura 5 – Distribuição das distâncias genéticas em relação às distâncias geográficas em linha reta entre as populações de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil. **A.** *Loci* alozimáticos; **B.** *Loci* de microssatélites.

A análise de *bottleneck* indicou que três das populações de *Drosophila ornatifrons* amostradas sofreram evento recente de variação aleatória nas frequências alélicas devido à redução no tamanho populacional baseado nos *loci* alozimáticos estudados: CAN (Teste de Sinal, $p = 0,03356$; Teste de

Wilcoxon, $p = 0,00781$), PMA (Teste de Sinal, $p = 0,02151$; Teste de Wilcoxon, $p = 0,00781$) e SSF (Teste de Sinal, $p = 0,02728$; Teste de Wilcoxon, $p = 0,00781$) e duas das populações passaram por evento recente de variação aleatória nas frequências alélicas devido à redução no tamanho populacional: CAN (modelo TPM – Teste de Wilcoxon, $p = 0,00488$), SSF (modelo TPM – Teste de Sinal, $p = 0,02652$; Teste de Wilcoxon, $p = 0,01611$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio do teste de padronização de temperatura resultaram em taxas de amplificação heteróloga (Tabela 3) superiores ao encontrado por Laborda e colaboradores (2009b). No trabalho de descrição dos oligonucleotídeos, do total de 134 oligonucleotídeos, 71 apresentaram amplificação positiva (52,98%), sendo que destes, 57 (42,53%) foram descritos com amplificação positiva e de qualidade, dos quais selecionamos os oligonucleotídeos para o presente trabalho. Entretanto, seis dos 18 *loci* não apresentaram amplificação pelo método *touchdown*, dois não amplificaram em temperaturas específicas e um não amplificou nas demais análises, o que pode ser explicado pelo fato que Laborda e colaboradores (2009b) terem utilizado apenas um indivíduo de linhagem diferente da testada neste trabalho. Zorzato (2012) sugere que variação interpopulacional na região flanqueadora dos microsatélites pode ser responsável pelas ausências de amplificação observadas.

Tractz e colaboradores (2012) testaram os mesmos 18 *loci* em populações de *Drosophila ornatifrons* de SSF e CAN, e encontraram uma taxa de amplificação heteróloga de aproximadamente 28%, neste trabalho houve um aumento de cinco *loci* com amplificação nesta espécie, o que possibilitou a aplicação do dobro de *loci* analisados por Zorzato (2012).

Em relação aos dados de diversidade genética nas populações, para os *loci* enzimáticos, as heterozigosidades médias observadas (H_o) (Tabela 4) foram maiores do que aquelas relatadas para espécies não cactofílicas (0,2027) e espécies cactofílicas (0,087) de *Drosophila*, de acordo com dados alozimáticos de Zouros (1973), Johnson (1974), Barker e Mulley (1976), Moraes e Sene (2002), e Silva e colaboradores (2015).

Os dados encontrados no presente estudo são, ainda, superiores aos encontrados para *Drosophila ornatifrons* por Machado e colaboradores (2012) em duas das quatro áreas estudadas aqui ($H_o = 0,3609$ – PMA e, $H_o = 0,4060$ – SSF) e por Silva e colaboradores (2015) em *D. maculifrons*, pertencente ao grupo *guaramunu* ($H_o = 0,1943$ – PMA e, $H_o = 0,2538$ – SSF). Cavasini (2009) estudou a diversidade genética alozimática em populações de *D. mediopunctata* (grupo *tripunctata*, grupo irmão dos grupos *guarani* e

guaramunu) da região de Guarapuava e também observou valores inferiores ($H_o = 0,232$ – PMA, e $H_o = 0,202$ – GUA – Guairacá – Guarapuava/PR) aos obtidos neste trabalho.

Para os *loci* de microssatélites (Tabela 5), foram verificados valores de H_o inferiores ao encontrado por Silva e colaboradores (2015) utilizando seis dos mesmos *loci* em *Drosophila maculifrons* para PMA ($H_o = 0,3994$) e, superior ao encontrado em SSF ($H_o = 0,3838$). Os valores de H_o encontrados para as populações de *Drosophila ornatifrons* indicam, ainda, uma diversidade genética inferior à encontrada em *D. mediopunctata*, coletada em Floresta Ombrófila Mista utilizando cinco dos mesmos *loci* ($0,5385$ – PMA, $0,5062$ – GUA - HEINZ, 2012). Apesar dos valores de H_o serem diferentes para alozimas e microssatélites, houve coincidência nos marcadores para apontar as populações com maior diversidade, SSF, seguido por CAN, e a com um dos menores valores de H_o , PMA. Os valores de H_o dos *loci* alozimáticos para todas as populações (com exceção de CHA) foram superiores aos de microssatélites, contudo foi encontrada uma maior variação no número de alelos para os *loci* de microssatélites (5,4 alelos/*locus*) que para os *loci* alozimáticos (3,33 alelos/*locus*) e, a porcentagem de *loci* polimórficos também foi superior para microssatélites.

O fato da diversidade dos *loci* de alozimas ser ligeiramente superior a dos microssatélites, indica que a maior variabilidade (número de alelos) dos *loci* de microssatélites não é necessariamente representada na diversidade genética (H_o) (MATEUS; SENE, 2007; CAVASINI, 2009; MACHADO et al., 2010; HEINZ, 2012). Os resultados deste trabalho também sugerem que não há relação entre o número amostral e a diversidade genética, pois embora as populações de CAN e CHA tenham baixos números amostrais para os *loci* alozimáticos, CAN apresentou a segunda maior diversidade para ambos os marcadores, enquanto a população de PMA (bem representada em termos de número de indivíduos) apresentou um dos menores valores de H_o para ambos *loci*.

Gustani e colaboradores (2015) também verificaram que não existe correlação entre o número amostral de populações de *Drosophila ornatifrons* e a ocorrência de haplótipos exclusivos dos genes COI e COII, e que, por isso, os resultados encontrados não tiveram influência do número de indivíduos

analisados. Estes autores ainda sugerem que o baixo número de indivíduos coletados de *Drosophila ornatifrons* seja um reflexo intrínseco de seu pequeno tamanho populacional, visto que a metodologia de coleta utilizada (a mesma deste trabalho) seria a mais adequada para captura de espécimes da radiação *tripunctata* (MEDEIROS; KLACZKO, 2004; DOS SANTOS et al., 2010). Além disso, as coletas de Gustani e colaboradores (2015) e deste trabalho foram realizadas em períodos mais úmidos do ano e em áreas com temperaturas amenas, o que parece ser os fatores mais importantes que determinam a ocorrência de *D. ornatifrons* (MEDEIROS; KLACZKO, 2004; TIDON, 2006; GOTTSCHALK et al., 2007; DÖGE et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010; HOCHMÜLLER et al., 2010; CAVASINI et al., 2014).

A Estatística F de Wright demonstrou diferenciação genética moderada para os dois marcadores empregados (Tabela 6), apresentando valores semelhantes (0,0737 – alozimas, 0,0796 – microssatélites). A diferenciação interpopulacional verificada pelas análises da estatística F de Wright (1978) pode ser reforçada pelos valores de distância e identidade genéticas de Nei obtidas para as populações de *D. ornatifrons* analisadas (Tabela 7).

Segundo Avise e Smith (1977) e Thorpe (1983), populações da mesma espécie tendem a apresentar identidade genética (I) acima de 0,9 (e conseqüentemente $D < 0,1$) estimado por meio de *loci* alozimáticos, e espécies diferentes do mesmo gênero tendem a apresentar valores de I entre 0,25 e 0,85 ($0,16 < D < 1,39$). Os valores de D e I encontrados para os *loci* de alozimas se encaixam no primeiro caso, com exceção das comparações entre CHA e as duas áreas do Paraná, PMA e SSF, as quais apresentaram valores de I e D intermediários ao que seria esperado para populações da mesma espécie e espécies do mesmo gênero. A alta identidade entre as populações SSF e PMA, corroborada pelo dendograma *Neighbor Joining*, também foi observada em populações de *Drosophila maculifrons*, em que foi estimado fluxo gênico assimétrico, principalmente na direção SSF para PMA (SILVA et al., 2015). Segundo os autores, a proximidade entre as áreas, associada ao estado de conservação e a existência de fragmentos de mata conectando-as, e ao maior tamanho de SSF, seriam os fatores responsáveis pelos valores de fluxo estimados.

Para os *loci* de microssatélites, a distância genética entre as populações

foi mais acentuada, e se fossem seguidas as classificações propostas por Avise e Smith (1977) e Thorpe (1983) para dados de alozimas, a maioria das comparações entre as populações de *Drosophila ornatifrons* resultaria em valores que seriam esperados para espécies diferentes do mesmo gênero. Entretanto, como a variação nos *loci* de microssatélites é maior, e a distância genética é baseada em frequência, para os *loci* de microssatélite esses valores podem ser diferentes.

Para os *loci* de alozimas foi encontrada baixa deficiência de heterozigotos nas populações ($F_{is} = 0,0052$) e moderada no total ($F_{it} = 0,0785$), enquanto para os *loci* de microssatélites, foi verificada alta deficiência ($F_{is} = 0,3734$ e $F_{it} = 0,4233$) (Tabela 6). Estas diferenças nos valores de F_{is} e F_{it} obtidos entre os marcadores poder ser devido à ocorrência de alelos nulos nos marcadores microssatélites, ou ainda, por alguns dos *loci* analisados poderem estar ligados a regiões do genoma que estão sob ação da seleção natural, caracterizando um efeito carona. Dois dos *loci* analisados neste trabalho (SSR034 e SSR118) estão localizados em um grupo de ligação no cromossomo II de *Drosophila mediopunctata*. Este cromossomo é o mais polimórfico para inversões na espécie, e existe correlação de suas frequências com fatores sazonais, altitudinais, latitudinais, aquecimento global; e a região de controle do número de pintas abdominais parece estar localizada também neste cromossomo (ANANINA et al., 2004; LABORDA et al., 2012; BATISTA et al., 2012; BATISTA; KLAZCKO, 2013).

A ocorrência de alelos nulos de microssatélites, mutações nas regiões flaqueadoras que impedem a ligação dos oligonucleotídeos, é esperada ser maior em casos de ampliações heterólogas, como as realizadas neste trabalho (CALLEN et al., 1993; ESTOUP; CORNUET, 1999; DAKIN; AVISE, 2004). Apesar da análise de *pedigree* ter possibilitado a detecção de alelos nulos de microssatélites em apenas um *locus*, entre 10, ainda existem alguns fatores que não permitem descartar a ocorrência de alelos nulos nas populações analisadas. Primeiro, o número de cruzamentos amostrados na análise de *pedigree* foi pequeno (dois); segundo, a não amplificação do *locus* SSR053 em todos os 14 indivíduos da análise de *pedigree*, e, ainda, as altas taxas de não amplificação de alguns *loci* (SSR065, SSR107, e SSR126) em CHA e do *locus* SSR065 (cerca de 40% do total de indivíduos analisados não

amplificaram para este *locus*), podem ser responsáveis pelos resultados de Fis, pois ausência de amplificação subestima a real variação das populações.

A baixa deficiência de heterozigotos dentro das populações para alozimas, por sua vez, pode ser devido à ação de seleção balanceadora nestes *loci*. Cavasini (2009) encontrou correlação entre alguns dos *loci* analisados neste trabalho e fatores abióticos em populações de *Drosophila mediopunctata* da mesma região do estado do Paraná amostradas aqui (PMA e Guairacá – Guarapuava).

Valores altos de H_o são esperados em populações que passaram por uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional, como SSF e CHA, que exibiram os maiores índices de diversidade genética. Este fato ocorre porque a redução do número de alelos é mais rápida do que da heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, de forma que se detecta alta H_o nessas populações (CORNUET; LUIKART, 1996, PIRY et al., 1999).

Na população PMA o evento de gargalo da garrafa foi detectado apenas para os *loci* alozimáticos. Isto pode ser devido ao fato de que marcadores que evoluem a taxas mais rápidas, como é o caso dos marcadores de microssatélites, são mais eficazes para determinar a ocorrência de gargalos recentes, enquanto marcadores com evolução mais lenta (alozimas) são mais úteis para detectar gargalos menos recentes (CORNUET; LUIKART, 1996). Dessa forma, a população de PMA pode estar sofrendo os efeitos de um *bottleneck* “mais antigo”, que não é verificável pela análise dos *loci* de microssatélite.

Gustani e colaboradores (2015) também sugeriram que a população de *Drosophila ornatifrons* de PMA teria passado por evento de gargalo da garrafa ou efeito do fundador, pois somente um haplótipo exclusivo de COI foi fixado nesta população, possivelmente por deriva genética. Os indícios do gargalo/efeito do fundador em PMA se devem, segundo os autores, por razões histórica e ecológica. A primeira, histórica, o haplótipo fixado em PMA, apesar de exclusivo, é derivado de outro que apenas é encontrado em populações da provável área (litoral sul do Brasil) da qual *D. ornatifrons* expandiu, após o último máximo glacial. A segunda razão, ecológica, seria que a altitude, as temperaturas muito baixas e a umidade mais alta do que o ideal para a

ocorrência da espécie, durante todo o ano, dificultariam o estabelecimento de *D. ornatifrons* nesta região. Os resultados deste trabalho concordam com as sugestões de Gustani e colaboradores (2015), pois SSF que, assim como PMA, são populações da mesma área, no município de Guarapuava, no estado do Paraná, também foi indicada ter passado por redução em seu tamanho populacional pelos marcadores alozimático e microssatélite.

Desta maneira, a diversidade genética mais alta encontrada em SSF e CAN, assim como a maior identidade genética entre essas duas populações, pode ser resultado de redução no tamanho destas populações, evidenciada na análise de *bottleneck*. Contudo, não é possível descartar que essas áreas poderiam oferecer condições favoráveis à manutenção da diversidade genética. A população de SSF, por exemplo, está localizada em um parque de conservação, de grande tamanho, com conectividade com outras áreas de mata de menores, e mais afastado do entorno da cidade de Guarapuava-PR. Já a população de PMA, que apesar de também ser de um parque ecológico, tem área muito inferior a SSF e é cercado por áreas de cultivo e está próximo à zona urbana de Guarapuava. A diversidade mais alta de SSF poderia ser, assim, resultado de um estado de conservação superior desse fragmento e/ou devido a uma maior disponibilidade de microhabitats que sustentariam a maior variação genética observada, entretanto esse mecanismo ainda é desconhecido e são necessários mais estudos, principalmente quanto à ecologia e utilização de nicho de *Drosophila ornatifrons*.

A população CAN também poderia ser uma área com maior diversidade dentre as estudadas por razões históricas. Assim como ILH (com valor de H_o próximo de SSF e CAN para microssatélite), CAN está localizada na área em que provavelmente houve a expansão de *Drosophila ornatifrons* dos fragmentos de Mata Atlântica inseridos no pampa, no litoral sul, em direção ao interior, há cerca de 20.000 anos atrás, no período do último máximo glacial. Assim, as populações da região de origem da expansão apresentariam maior variação que as populações migrantes (GUSTANI et al., 2015).

Apesar da grande separação e do isolamento das populações amostradas, não houve relação entre posição geográfica e distância genética, e a diferenciação entre elas foi apenas moderada. Considerando que a dispersão destes insetos não é de grande alcance, e não há atualmente

conectividade entre os fragmentos de mata devido ao desmatamento (com exceção de PMA e SSF), o fluxo gênico, mesmo que restrito pela distância, não seria a explicação mais provável para a distribuição da variação encontrada. Desse modo, a identidade entre distantes populações do estado do Paraná e do Rio Grande do Sul poderia ser devido a fatores tanto seletivos, quanto estocásticos, como manutenção de polimorfismo ancestral, e deriva genética, sendo que o fator predominante apresentaria variação em função do tamanho populacional.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente trabalho tiveram importantes contribuições para melhor entendimento da distribuição da variabilidade nas populações naturais de *Drosophila ornatifrons* que ocorrem em remanescentes de Mata Atlântica.

Foi encontrada diferenciação moderada e estruturação entre as populações de *Drosophila ornatifrons*. A maior identidade e diversidade entre as populações de SSF e CAN pode ser resultado de redução no tamanho populacional, o que acarretaria em aumento nos valores de H_o ; e/ou eventos históricos (centro de dispersão populacional para CAN) e ecológicos (tamanho, conectividade, conservação, disponibilidade de recursos).

A ausência de uma variação clinal nas populações de *Drosophila ornatifrons* do sul do Brasil pode ser devido a fatores tanto seletivos, quanto estocásticos, tais como manutenção de polimorfismo ancestral e deriva genética, dependendo da variação no tamanho populacional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A.N. Spaces occupied by the expansion of dry climates in South America during the Quaternary ice ages. **Revista do Instituto Geológico**, v. 21, p. 71–78, 2000.

ACHMANN, R.; CURIK, I.; DOVC, P.; KAVAR, T.; BODO, I.; HABE, F.; MARTI, E.; SÖLKNER, J.; BREM, G. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. **Animal Genetics**, v. 35, p. 285-292, 2004.

ANANINA, G.; PEIXOTO, A. A.; BLANCHE-MATHÉ, B. C.; SOUZA, W. N.; DA SILVA, L. B.; VALENTE, V. L. S.; KLACZKO, L. B. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal and latitudinal variation, **Genetics Molecular Biology**, v. 97, p. 61-69, 2004.

AVISE, J. C.; SMITH, M. H. Gene frequency comparisons between sunfish (Centrarchidae) populations at various stages of evolutionary divergence. **Systematic Zoology**, v. 26, p. 319-335, 1977.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**, Chapman & Hall, New York and London, 2004.

BACHMANN, K. Nuclear DNA markers in plant biosystematic research. **Opera Botanica Belgica**, v. 132, p. 137–148, 1997.

BAKER, A. J. **Molecular Methods in Ecology**, Blackwell Science Ltd., Oxford, U.K, 2000.

BALANYA, J.; OLLER, J. M.; HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; SERRA, L. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. **Science**, v. 313, p. 1773-1775, 2006.

BARKER, J. S. F.; MULLEY, J. C. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatii*. **Evolution**, v. 30, p. 212-233, 1976.

BATISTA, M. R. D.; KLACZKO, L. B. Mudanças genéticas observadas na população de *Drosophila mediopunctata* do Parque Nacional do Itatiaia, RJ, Brasil. **Boletim do Parque Nacional do Itatiaia**, v. 1, p. 1-52, 2013.

BATISTA, M. R. D.; ANANINA, G.; KLACZKO, L. B. Unexpected long-term changes in chromosome inversion frequencies in a Neotropical *Drosophila* species. **Climate Research**, v. 53, p. 131-140, 2012.

BROWN, J. H., KODRIC-BROWN, A. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. **Ecology**, v. 58, p. 445-449, 1977.

CALLEN, D. F., A. D.; THOMPSON, Y. SHEN, H. A. PHILLIPS, R.I. RICHARDS, J.C. MULLEY, G.R. SUTHERLAND. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 922-927, 1993.

CASTANHEIRA, E. B.; CONTEL, E. P. B. Isozymes relates to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): Evidence of postranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. **Biochemical Genetics**, v. 33, p. 365-375, 1995.

CASTELLA, P. R.; BRITZ, R. M.; MIKICH, S. B. Áreas prioritárias de Floresta com Araucária para conservação no estado do Paraná. In Anais do IV **Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação**. (M.S. Milano & V. Theulen, eds.). Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Rede Nacional Pró Unidades de Conservação, Curitiba, p.134-143, 2004.

CAVASINI, R. Aspectos ecológicos e genéticos no gênero *Drosophila* relacionados à fragmentação da floresta de Araucária. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Associação ampla UEPG/UNICENTRO, 114p., 2009.

CAVASINI, R.; BUSCHINI, M. L. T.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Comparison of *Drosophilidae* (Diptera) Assemblages from two Highland Araucaria Forest Fragments, with and without Environmental Conservation Policies. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 761-768, 2014.

CHAMBERS, G. K., MACAVOY, E. S. Microsatellites: Consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 455-476, 2000.

COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 697-708, 2010.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

CUNHA, A. A.; GUEDES, F. B. **Mapeamentos para conservação e recuperação da biodiversidade na Mata Atlântica: em busca de uma estratégia espacial integradora para orientar ações aplicadas**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Brasília, DF. 216p, 2013.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504–509, 2004.

DAS, A.; MOHANTY, S.; STEPHAN, W. Inferring the population structure and demography of *Drosophila ananassae* from multilocus data. **Genetics**, v. 168, p. 1975–1985, 2004

DIERINGER, D., NOLTE, V., SCHLÖTTERER, C. Population structure in African *Drosophila melanogaster* revealed by microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 563-573, 2005.

DÖGE, J. S.; VALENTE, V. L. S., HOFMANN, P. R. P. Drosophilids (Diptera) from an Atlantic Forest area in Santa Catarina, southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, p. 615-624, 2008.

DOS SANTOS, K.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Sampling two species of the *Drosophila guarani* group in a fragment of Araucaria Forest: testing different types of baits, fermentation time, and period of the day. **Drosophila Information Service**, v. 93, p. 185-188, 2010.

ESTOUP, A.; J. M. CORNUET. Microsatellite evolution: Inferences from population data. In. **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds. Goldstein, D.B.; SCHÖTTERER, C.). Oxford University Press, Oxford, New York, p. 49-65, 1999.

FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. II. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD and IDH. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 61-72, 1991a.

FALCÃO, T. M. M. A., CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilizations in stingless bees. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 47-59, 1991b.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.

FOOTE, D.; CARSON, H. L. *Drosophila* as monitor of change in hawaiian ecosystems. Our Living Resources. **National Biological Service**, p. 1-9, 2004.

FRANCK, P.; CAMERON, E.; GOOD, G.; RASPLUS, J. Y.; OLDROYD, B. P. Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2317-2331, 2004.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. S22-S29, 2003.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da drosófila. **Cultus**, v. 1, p. 1-171, 1949.

GEE, J. M. Gene flow across a climatic barrier between hybridizing avian species, California and Gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*). **Evolution**, v. 58, p. 1108-1121, 2004.

GIBBS, J. P.; STANTON, E. J. Habitat Fragmentation and Arthropod Community Change: Carrion Beetles, Phoretic Mites, and Flies. **Ecological Applications**, v. 11, p. 79-85, 2001.

GOLFARI, L. **Coníferas aptas para o reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro: IBDF, (Brasil florestal, Boletim técnico n. 1), p. 71, 1971.

GOTTSCHALK, M. S.; DE TONI, D. C.; VALENTE, V. L. S.; HOFMANN, P. R. P. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 848–862, 2007.

GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A.P. F.; SANTOS, M. H.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) from Southern Brazil Atlantic forest. **Zoological Science**, 2015, *in press*.

HAFFER, J. Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131-137, 1969.

HAFFER, J. Time's cycle and time's arrow in the history of Amazonia. **Biogeographica**, v. 69, 15-45, 1993.

HARRIS, H., HOPKINSON, D. A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. North- Holland, Amsterdam, 1976.

HATADANI, L. M.; MCINERNEY, J. O.; MEDEIROS, H. F. JUNQUEIRA, A. C. M.; AZEREDO-ESPIN, A. M.; KLACZKO, L. B. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 595-600, 2009.

HEINZ, N. P. Variabilidade molecular sazonal de *Drosophila mediopunctata* (Diptera: Drosophilidae). **Dissertação de mestrado**. Programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva. Associação ampla UEPG/UNICENTRO, 38p., 2012.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. **Nature Education Knowledge**, v. 3, 2010.

HOCHMÜLLER, C. J.; LOPES DA SILVA, M.; VALENTE, V. L. S.; SCHMITZ, H. J. The drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, p. 285-295, 2010.

HUBBY, J. L.; LEWONTIN, R. C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 203–215, 1966.

HUTCHISON, D.; TEMPLETON, A. R. Correlation of pair-wise genetic and geographic distance measures inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution**, v. 53, p. 1898-1914, 1999.

IVANAUSKAS, N. M.; RODRIGUES, R. R.; NAVE, A. G. Aspectos ecológicos de uma mata de brejo em Itatinga, SP: florística, fitossociologia e seletividade de espécies. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, p. 139-153, 1997.

JOHNSON, G. B. Enzyme polymorphism and metabolism. **Science**, v. 184, p. 28-37, 1974.

KANESHIRO, K. Y. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on the external male genitalia. **University Texas Publication**, Austin, v. 6918, p. 55-70, 1969.

KASTRITSIS, C. D. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. **Journal of Heredity**, v. 60, p. 51-57, 1969.

KASTRITSIS, C. D.; PASTEUR, G.; QUICK, J. Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediotriata* and *Drosophila griseolineata*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 12, p. 952–959, 1970.

KIMBERLY, A.; SELKOE, R.; TOONEN, J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

KING, J. C. A Comparative Analysis of the Chromosomes of the *Guarani* Group of *Drosophila*. **Evolution**, v.1, p. 48-62, 1947.

KÖPPEN, W. **Climatologia**. México: Fundo de Cultura Econômica. 1948.

KOZLOWSKI, T. T., KRAMER, P. J.; PALLARDY, S. G. Physiological ecology of woody plants. **Academic Press**, New York, 671 p, 1991.

LABORDA, P. R.; MORI, G. M.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, p. 297, 2009a.

LABORDA, P. R.; KLACZKO, L. B.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, p. 281-296, 2009b.

LABORDA, P. R.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A.; SOUZA, A. P. A molecular linkage map for *Drosophila mediopunctata* confirms synteny with *Drosophila*

melanogaster and suggests a region that controls the variation in the number of abdominal spots. **Insect Molecular Biology**, v. 21, p. 89-95, 2012.

LAND, J. V.; VAN PUTTEN, W. F.; VILLARROEL, H.; KAMPING, A.; VAN DELDEN, W. Latitudinal variation for two enzyme loci and an inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster* from Central and South America. **Evolution**, v. 54, p. 201-209, 2000.

LEITÃO FILHO, H. F. Aspectos taxonômicos das florestas do estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, v.1, p.197-206, 1982.

LEITÃO FILHO, H. F. Considerações sobre a florística de florestas trópicas e subtropicais do Brasil. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, n.45, p. 41-46, 1987.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c), 2001. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 2 ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1981.

MACHADO, L. P. B.; MANFRIN, M. H., SILVA-JUNIOR, W. A., SENE, F. M. Microsatellite loci in the cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 159-161, 2003.

MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Microsatellite allele sequencing in population analyses of the South American cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 2010.

MACHADO, L. P. B.; SILVA, D. C.; SIMÃO, D. P.; MATEUS, R. P. Spatial variation of genetic diversity in *Drosophila* species from two different South American environments. In: **Genetic variation in animals**, Cap. 3. Mahmut Çaliskan (ed.). Intech, Rijeka, Croatia, p. 45-62, 2012.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Resources**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and Spatial Allozyme Variation in the South American Cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). **Biochemical Genetics**. v. 41, p. 219-233, 2003.

MATEUS, R. P.; BUSCHINI, M. L. T.; SENE, F. M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay river basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 24-41, 2006.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Population genetic study of allozyme variation in natural populations of *Drosophila antonietae*. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 136–143, 2007.

MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; MORAES, E. M.; SENE, F. M. Allozymatic divergence between border populations of two cryptic species of the *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera: Drosophilidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 410-415, 2010.

MEDEIROS, H. F.; KLACZKO, L. B. How many species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) remain to be described in the forests of Sao Paulo, Brazil Species lists of three forest remnants. **Biota Neotropica**, v. 4, 12p., 2004.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses –TFPGA – 1.3:** A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by autor. 1997.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>> Acesso em 02 janeiro 2015.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, J.; MIITERMEIER, C. G.; LAMOURUX, J.; FONSECA, G. A. B. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. **Cemex**, Washington, 2005.

MORAES, E. M.; SENE, F. M. Breeding structure of an isolated cactophilic *Drosophila* population on a sandstone table hill. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 40, p. 123-128, 2002.

MORAES, E. M.; SENE, F. M. Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 336–344, 2007.

MORAES, E. M.; YOTOKO, K. S. C.; MANFRIN, M. H.; SOLFERINI, V. N.; SENE, F. M. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136–2147, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NEI, M. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetic**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 28, p. 105, 1997.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants, **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143–1155, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, p. 793–810, 2000.

PARSONS, P. A. Biodiversity conservation under global climatic change: the insect *Drosophila* as a biological indicator? **Global Ecology and Biogeography Letters**, v. 1, p. 1195-1198, 1991.

PATTEN, M. A., ROTENBERRY, J. T., ZUK, M. Habitat selection, acoustic adaptation, and the evolution of reproductive isolation. **Evolution**, v. 58, p. 2144-2155, 2004.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.10, p. 1275–1287, 1998.

PENARIOL, L. V.; MADI-RAVAZZI, L. *Drosophilid* assemblages as indicators for conservation monitoring. **SpringerPlus**. v. 2, p. 114, 2013.

PENARIOL, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MADI-RAVAZZI, L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, 2008.

PFEILER, E.; MARKOW, T. A. Ecology and population genetics of Sonoran Desert *Drosophila*. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1787–1791, 2001.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

RATHCKE, J. L.; JULES, E. S. Habitat fragmentation and plant-pollinator interactions. **Current Science**, v. 65, p. 273-277, 1993.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distribution? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RIZZINI, C. T. Tratado de fitogeografia do Brasil. 2 ed. **Ambito Cultural Edições** Ltda, 1997.

ROBE, L. J.; VALENTE, V. L. S.; BUDNIK, M.; LORETO, E. L. S. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 623-640, 2005.

ROBE, L. J.; VALENTE, V. L. S.; LORETO, E. L. S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* "radiation" (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v. 138, p. 725–735, 2010a.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the "Drosophila" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, p. 310–321, 2010b.

RODERJAN, C.V., GALVÃO, F., KUNIYOSHI, Y.S.; HATSCHBACH, G.G. 2002. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. **Ciência & Ambiente** v. 24, p.78-118, 2002.

SANGUINETTI, C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, p. 209, 1994.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615–629, 2006.

SENE, F. M., CARSON, H. L. Genetic variation in hawaiian *Drosophila*. IV. Allozymic similarity between *D. silvestris* and *D. heteroneura* from island of Hawaii. **Genetics**, v.86, p.187-198, 1977.

SILVA, D. C. ; MACHADO, L. P. B. ; MATEUS, R. P. Migration rate and genetic diversity of two *Drosophila maculifrons* (Duda, 1927) populations from Highland Araucaria Forest Fragments in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 2014.

SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v. 39, p. 292–299, 1985.

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, p. 274-276, 1993.

STREIFF, R.; VEYRIER, R.; AUDIOT, P.; MEUSNIER, S.; BROUAT, C. Introgression in natural populations of bioindicators: a case study of *Carabus splendens* and *Carabus punctatoauratus*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3775-3786, 2005.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TEMPLETON, A. R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E.; DAVIS, S. K. The genetic consequences of habitat fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, p. 13-27, 1990.

TEMPLETON, A. R.; ROBERTSON, R. J.; BRISSON, J.; STRASBURG, J. Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 5426-5432, 2001.

THORPE, J. P. Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. In: Oxford, G.S., Rollinson, D. (Eds.), **Protein Polymorphism: Adaptive and Taxonomic Significance**. Academic Press, New York, p. 131-152, 1983.

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, p. 233-247, 2006.

TONIATO, M. T. Z.; LEITÃO FILHO, H. F.; RODRIGUES, R. R. Fitossociologia de um remanescente de floresta higrófila (mata de brejo) em Campinas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, p. 197-210, 1998.

TORRES, R. B; MATTHES, L. A. F.; RODRIGUES, R. R. Florística e estrutura do componente arbóreo de mata de brejo em Campinas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 17, p. 189-194, 1994.

TORRES, F. R.; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila spp* (Diptera) in two woodlond in the state of São Paulo, Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 96, n. 4, p. 437-444, 2006.

TRACTZ, C. C.; SALOMON, G. R.; ZORZATO, S. V.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Allele diversity of cross-species microsatellite amplification on populations of *Drosophila guarani* species group from Araucaria Forest in Brazil. **Drosophila Information Service**, v. 95, p. 76-79, 2012.

TRAVA, B. M. Morfometria da asa e do edeago de duas espécies de *Drosophila* endêmicas da América do Sul. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, UNICENTRO, Guarapuava/PR, 2014.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal**. Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, 1991.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population**. Variability within and among natural populations. Univ. Chicago Press, Chicago, v. 4, 1978.

YOTOKO, K. S. C.; MEDEIROS, H. F.; SOLFERINI, V. N.; KLACZKO, L. B. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, p. 614–619, 2003.

ZORZATO, S. V. Variabilidade de *loci* de microssatélites de populações naturais de *Drosophila ornatifrons* (Diptera; Drosophilidae) coletadas em fragmentos de Mata de Araucária. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação**. Licenciatura em Ciências Biológicas, UNICENTRO, Guarapuava/PR, 2012.

ZOUROS, E. Genic differentiation associated with the early stages of speciation in the mulleri subgroup of *Drosophila*. **Evolution**, v.27, p.601-621, 1973.