

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

**VARIABILIDADE MOLECULAR SAZONAL DE *Drosophila*  
*mediopunctata* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

**NORBERT PADILHA HEINZ**

Guarapuava

2012

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

**VARIABILIDADE MOLECULAR SAZONAL DE *Drosophila*  
*mediopunctata* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

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)

Guarapuava

2012

Orientadora

Profa. Dra. LUCIANA PAES DE BARROS MACHADO

Co-orientador

Prof. Dr. ROGÉRIO PINCELA MATEUS

**Noturno**

*Aquela última janela acesa  
No casario  
Sou eu...*

*(Mario Quintana)*

## **Agradecimentos**

Aos orientadores Rogério e Luciana pela paciência, amizade e apoio;

A CAPES pela bolsa concedida;

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva;

Aos amigos do laboratório de Genética e Evolução: Emanuele, Carine, Gabriela, Vanessa, Bruna, Katiane, Samara e Willian;

Aos colegas do mestrado;

Ao Renato Cavasini pelos artigos e sugestões enviadas;

A minha mãe e meus irmãos;

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Localização das áreas de estudo de duas populações de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR: A. Parque Municipal das Araucárias. B. Fazenda Brandalise (Guairacá). Modificado do Atlas Geográfico (IBGE, 2004) ..... **09**
- Figura 02.** Análise de agrupamento Neighbor-Joining utilizando distância de Reynolds e colaboradores (1983) para as amostras sazonais de populações naturais de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR. PP = Parque Municipal das Araucárias – Primavera; PI = Parque Municipal das Araucárias – Inverno; GP = Guairacá – Primavera; GI = Guairacá - Inverno ..... **23**

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 01.</b> Número de alelos populacional e sazonal por <i>locus</i> de microssatélite analisado nas populações de <i>Drosophila mediopunctata</i> coletadas na região de Guarapuava/PR .....	<b>15</b>
<b>Tabela 02.</b> Frequências alélicas populacional e sazonal dos <i>loci</i> de microssatélites analisados nas populações de <i>Drosophila mediopunctata</i> coletadas na região de Guarapuava/PR .....	<b>16</b>
<b>Tabela 03.</b> Estatística <i>F</i> de Wright populacional e sazonal para oito <i>loci</i> de microssatélites em duas populações naturais de <i>Drosophila mediopunctata</i> coletadas na região de Guarapuava/PR. ....	<b>20</b>
<b>Tabela 04.</b> Distância ( <i>D</i> ) e identidade ( <i>I</i> ) genética de Nei (1978) populacional e sazonal entre duas populações naturais de <i>Drosophila mediopunctata</i> coletadas na região de Guarapuava/PR. <i>D</i> abaixo da diagonal e <i>I</i> acima da diagonal.....	<b>21</b>
<b>Tabela 05.</b> Distância de Reynolds e colaboradores (1983) sazonal entre duas populações naturais de <i>Drosophila mediopunctata</i> coletadas na região de Guarapuava/PR.....	<b>22</b>

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>07</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>08</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>



## RESUMO

A fragmentação de áreas pode resultar na redução da diversidade biológica devido à perda de variabilidade genética por meio da queda no número de indivíduos. A diminuição do tamanho populacional, por sua vez, contribui para o processo de isolamento das populações e consequente restrição do fluxo gênico, acarretando no aumento das diferenças genéticas entre elas e a diminuição da variabilidade intrapopulacional. Flutuações acentuadas no tamanho das populações também podem ocorrer em ciclos sazonais, geralmente por causa de especificidades ecológicas por locais de reprodução, e em resposta a disponibilidade de recursos. *Drosophila mediopunctata*, objeto deste estudo, é uma espécie com ampla distribuição geográfica nas Florestas Neotropicais, não estando associada com habitats humanos. A análise de diferentes marcadores genéticos em populações naturais de *D. mediopunctata* revelou a associação destes com variações sazonais, altitudinais e latitudinais. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise sazonal da variabilidade genética de populações de *D. mediopunctata*, através de *loci* de microssatélites, para contribuir com o entendimento da dinâmica populacional desta espécie em áreas de Mata de Araucária. Foram analisados oito *loci* de microssatélites em 92 indivíduos provenientes de áreas de Mata de Araucária da região de Guarapuava/PR: 60 coletados no Parque Municipal das Araucárias (PMA) (30 no inverno de 2008 e 30 na primavera de 2010), e 32 no distrito de Guairacá (GUA) (13 na primavera e 19 no inverno de 2008). Foi observada alta diversidade genética para os *loci* analisados, baixa diferenciação genética populacional ( $F_{st} = 0,0243$ ) e sazonal ( $F_{st} = 0,0249$ ), contudo o número de alelos exclusivos, a distância e identidade genéticas de Nei (1978) indicam certo isolamento reprodutivo entre as populações/subpopulações de *D. mediopunctata*. A diferenciação sazonal em GUA foi maior que em PMA (revelada pela análise de *Neighbor-Joining*) e a variabilidade intrapopulacional foi maior em PMA que GUA ( $H_o = 0,5385$  e  $H_o = 0,5062$ , respectivamente). Estes dados permitem sugerir que PMA, um parque de conservação ambiental, apesar de ser uma área de menor tamanho que GUA, uma fazenda extrativista de pinhão e erva-mate, teria uma população mais estável do ponto de vista genético devido a sua superior qualidade de preservação e diversidade de habitats.

**Palavras-chaves:** microssatélite, heterozigossidade, diversidade genética

## ABSTRACT

Environment fragmentation can result in reduction of biological diversity due to the genetic variability loss through the decline of specimens number in the populations. The decrease in population size can contribute to the population isolation and, therefore, to the restriction of gene flow, which can lead to increase the genetic differentiation among populations and to decrease of genetic variability within population. Accentuated fluctuations in population size can occur in seasonal cycles in response to reproduction ecological specificities linked to resource availability. *Drosophila mediopunctata* is a species that has a wide geographic distribution in Neotropical Forests and is not associated to humans. The analyses of several genetic markers in natural populations of this species revealed that they are associated with seasonal, altitudinal and latitudinal variation. The aim of this work was to perform a seasonal microsatellite genetic variability analysis in natural populations of *D. mediopunctata* in order to contribute to the understanding of this species populational dynamics in Araucaria Forest fragments. Eight microsatellite loci were analyzed in 92 individuals collected in two Araucaria Forest areas located in Guarapuava/PR: 60 specimens collected in the Parque Municipal das Araucárias (PMA) (30 in the winter of 2008 and 30 in the spring of 2010), and 32 collected in Guairacá district (GUA) (13 in the spring and 19 in the winter of 2008). It was detected a high genetic diversity and a low populational ( $F_{st} = 0.0243$ ) and seasonal ( $F_{st} = 0.0249$ ) genetic differentiation. However, the number of exclusive alleles and Nei (1978) genetic distance and identity indicated a certain reproductive isolation among *D. mediopunctata* populations/subpopulations. The seasonal differentiation in GUA was higher than in PMA (revealed through the Neighbor-Joining analysis) and the within populational variability was higher in PMA than in GUA ( $H_o = 0.5385$  and  $H_o = 0.5062$ , respectively). These data allow to suggest that PMA, a conservation park, in spite of having smaller size than GUA, a farm that presents pinion and mate extraction activities, have a more stable population in the genetic point of view due to its higher habitat preservation quality and diversity.

**Keywords:** microsatellite, heterozigosity, genetic diversity

## INTRODUÇÃO

A formação de fragmentos isolados em áreas florestais é gerada muitas vezes pelo processo de desmatamento, isso leva a formação de “ilhas” de mata cercadas por habitats não florestados. Em áreas fragmentadas pode haver redução da diversidade biológica e interferência no potencial evolutivo das espécies devido à perda de variabilidade genética através da queda no número de indivíduos.

A diminuição do tamanho populacional, por sua vez, contribui no processo de isolamento das populações (RATHCKE & JULES, 1993), e quanto maior a distância do fragmento a uma área com vegetação similar, maior será a diminuição do fluxo gênico entre populações da mesma espécie (BROWN & KODRIC-BROWN, 1977). O isolamento entre as populações acarreta no aumento das diferenças genéticas entre elas e diminui a variabilidade intrapopulacional, deixando-as mais suscetíveis à extinção (TEMPLETON *et al.* 1990, 2001).

A quebra da continuidade das populações por fragmentação de habitats também pode levar a tal diferenciação de grupos que pode contribuir para o processo de especiação, e até mesmo formação de gêneros e famílias morfologicamente distintos de seus antecedentes (HARTL & CLARK, 1997).

Outro fator que afeta a variabilidade genética das populações naturais é a flutuação no tamanho populacional, que também pode ter como resultado a diferenciação populacional (FUTUYMA, 2009). Esta flutuação em muitas espécies é sazonal (variações temporais) e pode ser influenciada por adaptações ligadas a fatores ambientais (KREBS, 1985). Mateus e Sene (2003), por exemplo, verificaram que a variação de alguns *loci* de isoenzimas analisados sazonalmente em uma população de *Drosophila antonietae* poderia ter correlação com índices de precipitação pluviométrica. De acordo com Brncic e colaboradores (1985), a sazonalidade de cada espécie é o resultado de um longo e contínuo processo de adaptação às condições ambientais. Segundo Frankham (1995), a flutuação no tamanho populacional é a variável que mais influencia no tamanho populacional efetivo em relação ao tamanho total. Este é um parâmetro crítico para a genética evolutiva e para a manutenção da biodiversidade, pois representa a taxa de endogamia e a perda da variabilidade genética em populações naturais.

A evolução é possível somente quando existe variação, desse modo, os processos evolutivos dependem da variabilidade genética de cada população, por isso, estudos sobre a variabilidade genética de populações naturais são extremamente importantes para compreender a história evolutiva de uma espécie (MATEUS & SENE, 2003). Para o entendimento mais amplo sobre a variação encontrada é necessário relacionar os dados genéticos com o contexto ecológico de cada espécie, e compreender os padrões e mecanismos evolutivos que concatenam a genética do organismo e o ambiente no qual ele vive (TIDON, 2006).

### **Variabilidade genética das populações naturais**

Os estudos da variabilidade genética nas populações tem sido realizados pela observação das modificações genéticas que se manifestam no fenótipo de várias formas. Pela genética clássica só era possível saber da existência de um gene e estudar suas propriedades quando alelos alternativos em um dado *locus* pudessem ser identificados, e em decorrência disso, os primeiros estudos dos genes nas populações foram realizados em variantes discretas.

Com o advento da eletroforese de isoenzimas foi possível estimar a variabilidade genética por meio da expressão direta de um produto gênico, surgindo daí as bases para a teoria neutralista sobre a manutenção da variabilidade genética molecular nas populações naturais (KIMURA, 1968, KING & JUKES, 1969), pois o polimorfismo observado era muito grande para ser explicado apenas por seleção natural. Nas últimas décadas, o sequenciamento do DNA permitiu que a variabilidade genética fosse detectada diretamente no DNA, e não apenas pela expressão dos produtos gênicos, revelando que a variação existente nas populações era ainda maior.

A Teoria Neutralista da Evolução Molecular propõe que a maioria dos polimorfismos e suas flutuações no tempo e espaço refletem a variação aleatória das frequências alélicas geração após geração nas populações finitas. Por outro lado, os geneticistas de população selecionistas sugerem que a teoria neutralista é deficiente e argumentam que os polimorfismos são respostas adaptativas à complexidade dos ambientes físico e biótico (MUELLER *et al.*, 1985). Atualmente a ideia predominante é a de que essas teorias não são excludentes e, provavelmente,

a variação natural seja resultado da interação entre seleção natural e deriva genética, e que a interpretação correta da variabilidade observada depende do entendimento de ambos os parâmetros.

O objetivo de muitos trabalhos que estudam a variabilidade genética nas populações naturais por meio de marcadores moleculares é determinar se a evolução das frequências alélicas em uma dada população pode ser explicada apenas por deriva genética, ou se a seleção natural, os cruzamentos preferenciais, o fluxo gênico, e outros fatores evolutivos também estariam implicados. Desse modo, o objetivo do estudo genético das populações naturais é melhor alcançado com a disponibilidade de marcadores neutros polimórficos, pois se um *locus* está ligado a uma região genômica a qual é alvo de seleção natural, ele deverá mostrar um desvio em relação à neutralidade esperada. O marcador de DNA microssatélite é hipervariável e, na maioria das vezes, neutro (por ser detectado preferencialmente nas regiões intergênicas), o que indica sua aplicação nesses estudos de genética de populações.

Além do alto polimorfismo observado para os microssatélites em diferentes organismos, como planta, poliqueta, inseto e mamífero (LABORDA *et al.*, 2009a; MACHADO *et al.*, 2010, 2012; CAO *et al.*, 2012; DELGADO-MARTINEZ *et al.*, 2012; KESÄNIEMI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012), o fato de ser codominante e densamente distribuído pelo genoma eucarioto, também o tornam uma ferramenta altamente informativa que possibilita várias abordagens.

As regiões de microssatélites do genoma são definidas por repetições *in tandem* de unidades curtas (não mais que seis bases por mote de repetição) (HANCOCK, 1999), e os alelos destes *loci* são caracterizados por seus tamanhos, determinados pelo número de repetições (ESTOUP & CORNUET, 1999). O modelo mais aceito para explicar as altas taxas de mutação observadas para este marcador quando comparadas às taxas de mutação de ponto (LEVINSON & GUTMAN, 1987; DALLAS, 1992; STRAND *et al.*, 1993; WEBER & WONG, 1993; SCHUG *et al.*, 1997) é o mecanismo de replicação *slippage*. Durante a replicação, o *slippage* pode ocorrer devido à perda de pareamento entre sequências complementares repetidas, com isto há a formação de alças, resultando tanto em deleção como duplicação de um segmento de DNA, dependendo se o *slippage* ocorre na direção 5' → 3', ou na direção oposta (LI & GRAUR, 1991).

Os erros que geram a instabilidade das sequências de microssatélites podem ser corrigidos por exonucleases que degradam a fita recém-sintetizada, ou pelo reparo *mismatch*, em que as repetições presentes nas alças da fita molde são incorporadas na fita em síntese. Desse modo, a instabilidade dos microssatélites pode ser considerada um balanço entre a geração de erros de replicação ocasionados pelo DNA *slippage* e os mecanismos de correção destes erros (EISEN, 1999). Também é proposto que o número de unidades repetitivas gerados possa sofrer alguma forma de restrição por seleção natural, pois foi observado que deleções são mais comuns do que adições em alelos maiores, e estas geralmente envolvem mais do que uma unidade de repetição (GOLDSTEIN & POLLOCK, 1997; PRIMMER & ELLEGREN, 1998; TÓTH *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002). Assim, em algumas sequências particulares pode haver pressão contra o aumento no número de repetições.

### ***Drosophila mediopunctata* (DOBZHANSKY & PAVAN, 1943)**

*Drosophila mediopunctata* (Diptera: Drosophilidae) pertence ao grupo *tripunctata*, o qual é endêmico das regiões Neotropicais e inclui outras 78 espécies que ocorrem em habitats de florestas (VILELA & BÄCHLI, 2000; BÄCHLI, 2012). O nome do grupo *tripunctata* é derivado da presença de três pintas escuras nos tergitos posteriores do abdome. Contudo, nem todas as espécies apresentam esta característica. Em algumas pode haver apenas uma banda no último tergito ao invés de três pintas, enquanto que em outras, como *D. mediopunctata*, existe variação intraespecífica. O padrão de coloração em *D. mediopunctata* varia consideravelmente, da ausência de pintas a três, nos quarto, quinto e sexto tergitos abdominais (FROTA-PESSOA, 1954).

*Drosophila mediopunctata* é uma espécie que reside estritamente em florestas e não é associada com habitats humanos, tem ampla distribuição geográfica na América do Sul, é frequente no Brasil (VAL *et al.*, 1981), apresentando maior abundância em altitudes elevadas durante os meses mais frios do ano (SAAVEDRA *et al.*, 1995). Uma área na qual este espécie é encontrada em alta frequência é a Floresta Ombrófila Mista (FOM) (CAVASINI, 2009), formação vegetal típica da região sul do Brasil. A FOM apresenta fisionomia alta e densa, sendo

estruturalmente constituídas de um estrato superior predominado por *Araucária angustifolia* e um inferior composto por angiospermas e gimnospermas (MACHADO & SIQUEIRA, 1980). Esta floresta, habitat de *D. mediopunctata*, é um dos ecossistemas mais ameaçados pela fragmentação (MEDEIROS *et al.*, 2005), no Brasil, a área original de FOM era de aproximadamente 200.000 km<sup>2</sup> (MAACK, 1948), atualmente ainda resiste nos Estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%), apresentando manchas esparsas no sul de São Paulo (3%), estendendo-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%) (KLEIN, 1960).

Vários aspectos de sua biologia fazem de *Drosophila mediopunctata* um interessante objeto de estudos em genética de populações naturais e evolução (KLACZKO, 1995, 2006): existe relação entre o polimorfismo de inversões cromossômicas e variação sazonal, clinas de altitude e latitude, das inversões com polimorfismo de cor; estudos da razão sexual desta espécie são utilizados na demonstração da regra de Fisher; e a presença do elemento transponível-P em *D. mediopunctata* revelou eventos de transferência horizontal de genes neste organismo. Além disso, o fato de *D. mediopunctata* ser restrita a Florestas Neotropicais e não ser encontrada associada a ambientes alterados a torna uma espécie bioindicadora para estudos sobre a qualidade ambiental.

Diferentes marcadores genéticos foram aplicados em estudos com a espécie *Drosophila mediopunctata*, por exemplo, polimorfismo no número de pintas abdominais (ROCHA *et al.*, 2009; LABORDA *et al.*, 2012), evolução da genitália do macho (ANDRADE *et al.*, 2009), polimorfismo de inversão cromossômica e relação com variação na forma e tamanho da asa (BITNER-MATHÉ & KLACZKO, 1999a,b; HATADANI & KLACZKO, 2008) e pigmentação (HATADANI *et al.*, 2004), polimorfismo para supressores autossômicos e do cromossomo Y e a razão sexual (CARVALHO & KLACZKO, 1993; CARVALHO *et al.*, 1997; CAVASINI *et al.*, 2008). Contudo, ainda são escassas as análises sobre a distribuição e flutuação da variabilidade genética através de marcadores moleculares em populações naturais de *D. mediopunctata*, sendo que apenas recentemente foram empregados *loci* de isoenzimas para este tipo de estudo (CAVASINI, 2009).

Mateus e colaboradores (2008) fizeram uma análise preliminar da variação de *loci* de isoenzimas em diferentes espécies do grupo *tripunctata*, e Cavasini e



colaboradores (2008) demonstraram que os *loci* analisados não apresentaram expressão corporal diferencial, permitindo que partes distintas do corpo dos indivíduos de *Drosophila mediopunctata* sejam usadas para a aplicação de diferentes marcadores, otimizando as coletas deste espécime. Cavasini (2009) realizou uma análise sazonal da variabilidade de *loci* de isoenzimas de duas populações de *D. mediopunctata* coletadas em Mata de Araucária. Este estudo revelou que ao final do inverno e no verão as populações desta espécie sofrem redução no tamanho populacional, o que resulta em subestruturação das populações por deriva genética ao longo do tempo, contudo, com o aumento da população no outono e primavera essa estruturação microgeográfica desaparece.

Os estudos em populações de *Drosophila mediopunctata* com marcadores morfológicos e genéticos revelaram que estes estão sob a ação de seleção natural, inclusive alguns *loci* de isoenzimas, que poderiam ser considerados seletivamente neutros, mostraram relação com fatores abióticos (CAVASINI, 2009). Para compreensão dos fatores evolutivos que atuam nas populações naturais é fundamental o conhecimento da variabilidade genética, a qual é estimada com mais precisão por meio de marcadores seletivamente neutros e altamente polimórficos, como os microssatélites.

Mais de uma centena de *loci* de microssatélites foram descritos para *Drosophila mediopunctata* (LABORDA *et al.*, 2009b), e o número de alelos observados e sua aplicação em outras espécies do grupo *tripunctata* e grupos relacionados foram averiguados (LABORDA *et al.*, 2009a). Alguns destes *loci* de microssatélites foram utilizados na construção de um mapa molecular de ligação que revelou uma região que controla a variação no número de pintas abdominais (LABORDA *et al.*, 2012). Os *loci* descritos por Laborda e colaboradores (2009b), contudo, até o presente trabalho, não foram aplicados para o estudo da estrutura populacional de *D. mediopunctata*. Desse modo, este trabalho é o primeiro a abordar a genética de populações de *D. mediopunctata* por meio do marcador molecular microssatélite, considerado neutro, com o objetivo de contribuir para o entendimento da dinâmica populacional desta espécie em áreas de Mata de Araucária.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a estrutura populacional de *Drosophila mediopunctata*, coletada em Mata de Araucária, através da variabilidade sazonal de *loci* de microssatélites.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar oito *loci* de microssatélites em indivíduos da espécie *Drosophila mediopunctata* coletados no Parque Municipal das Araucárias e Distrito Guairacá (Guarapuava/PR);
- Analisar a variabilidade genética sazonal das populações de *Drosophila mediopunctata*, considerando as estações primavera e inverno como subpopulações;
- Através do estudo da variação sazonal das populações naturais de *Drosophila mediopunctata*, inferir se existe efeito do gargalo da garrafa nas estações analisadas;

## MATERIAL E MÉTODOS

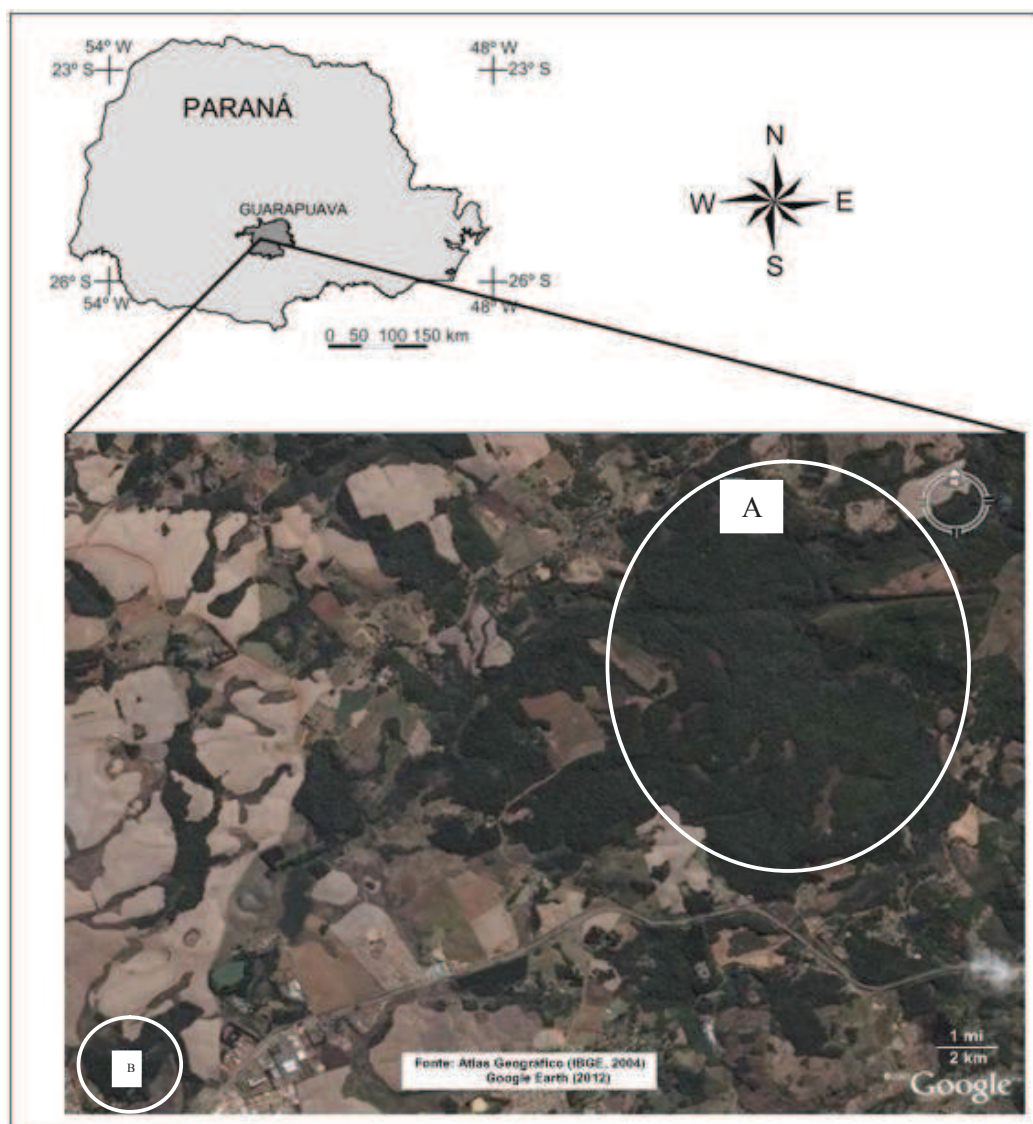
### Áreas de Coleta

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de indivíduos de *Drosophila mediopunctata* coletados em duas áreas representativas de Floresta Ombrófila Mista.

Os fragmentos onde foram realizadas as coletas de indivíduos de *Drosophila mediopunctata* (Figura 01) estão localizados no terceiro planalto paranaense, na sub-região denominada por Maack (1981) de Planalto de Guarapuava. A região de Guarapuava tem clima mesotérmico úmido e superúmido segundo a classificação climática de Köppen, sem estações secas e com verões frescos. As médias de temperatura dos meses mais quentes são inferiores a 22 °C. As geadas são severas e frequentes, e a temperatura média do mês mais frio é 12,9 °C. As duas áreas de coleta estão geograficamente separadas a uma distância de seis quilômetros, e entre elas existem outros fragmentos compostos por Floresta de Araucária.

Um dos fragmentos, o Parque Municipal das Araucárias, o qual será referido no restante do trabalho como “Parque” e abreviado como “PMA”, é uma unidade de conservação (25° 23' 36" S, 51° 27' 19" W, 1064 m de altitude) com uma área total de 104 ha composta por Mata de Araucária (43 ha), Floresta de Galeria (10,1 ha), Campo (6,8 ha), Várzea (11,1 ha), e áreas alteradas (33 ha) (Fonte: SEMAFLO – Guarapuava/PR).

O outro fragmento está situado em uma propriedade particular, denominada Fazenda Brandalise (25° 18' 58" S, 51° 24' 54" W, 1160 m de altitude), que se encontra no caminho de acesso ao distrito Guairacá. Esta área possui aproximadamente 400 ha, compreendendo Floresta de Araucária e áreas alteradas. Neste fragmento existe uma grande atividade antrópica extrativista de erva-mate e pinhão, além da substituição de habitats naturais por áreas cultivadas. Esta área será citada no restante do trabalho como “Guairacá” e abreviada como “GUA”.



**Figura 01.** Localização das áreas de estudo de duas populações de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR: A. Parque Municipal das Araucárias. B. Fazenda Brandalise (Guairacá). Modificado do Atlas Geográfico (IBGE, 2004)

## Coleta dos espécimes

Para realização deste trabalho foram utilizados 92 indivíduos, sendo 60 provenientes de PMA e 32 de GUA. Entre as amostras de PMA, 30 foram coletadas no inverno de 2008 (CAVASINI, 2009), e 30 foram coletados na primavera de 2010. Todas as amostras de GUA foram coletadas em 2008 (CAVASINI, 2009), sendo 13 indivíduos provenientes da primavera e 19 do inverno. Nas estações verão e outono não foram obtidos indivíduos suficientes para a realização das análises genéticas.

As coletas do ano de 2008 foram realizadas através de armadilhas fechadas, modificadas a partir de Medeiros e Klaczko (1999), com iscas compostas de banana, laranja e fermento biológico (SENE *et al.*, 1981). Já as coletas dos indivíduos de PMA da primavera foram realizadas durante quatro dias, utilizando armadilhas abertas contendo bananas, laranjas e fermento como isca (SENE *et al.*, 1981). A captura dos insetos ocorreu através de rede entomológica (GARCIA *et al.*, 2009) das 8 às 15 horas (SANTOS *et al.*, 2010). Os indivíduos adultos do gênero *Drosophila* capturados foram transferidos diretamente das redes para dentro de tubos de ensaio contendo meio de cultura, e transportados vivos até o laboratório.

Os espécimes coletados foram triados com o auxílio de microscópio estereoscópico e chave de identificação (FREIRE-MAIA & PAVAN, 1949). Para as análises dos *loci* de microssatélites, apenas as cabeças dos indivíduos de *Drosophila mediopunctata* foram estocadas individualmente em álcool 70% a – 20 °C, enquanto que as demais partes do corpo foram usadas em análises de isoenzimas (CAVASINI *et al.*, 2008; CAVASINI, 2009).

## Extração de DNA

Para a extração do DNA, as amostras foram individualmente maceradas em 167 µL de Solução de Lise de Núcleo (Promega) e 40 µL de EDTA (pH = 8,0). Foram adicionados 6 µL de Proteinase K (20 mg/mL) às amostras maceradas, e a solução foi agitada em vórtex e transferida para banho-maria a 65 °C por duas horas. Após a incubação, foram acrescentados 67 µL de Solução de Precipitação de Proteínas (Promega), a reação foi agitada por 20 segundos em vórtex e mantida em gelo por 10 minutos. Depois de centrifugação a 35.000 g por quatro minutos, as

proteínas precipitaram formando um *pelet* branco. Cerca de 208  $\mu\text{L}$  do sobrenadante contendo o DNA foram transferidos para outro microtubo de 1,5 mL. Foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol, a solução foi, então, misturada e submetida a novo ciclo de centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido para isolar o DNA que havia precipitado no fundo do microtubo. A purificação do DNA foi realizada em outro ciclo de centrifugação em 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados para secar em estufa a 40 °C. O DNA foi então ressuscitado em 60  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura e auto-clavada, armazenado a 4 °C por 12 h e depois congelado a – 20 °C.

### **Quantificação do DNA**

O DNA extraído foi quantificado com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) em eletroforese de gel de agarose 1%. O DNA foi visualizado por coloração com 0,5  $\mu\text{g}$  de brometo de etídeo (10  $\mu\text{L}$  de solução 10 mg/mL em 200 mL de gel), e o gel foi fotografado em luz ultravioleta utilizando câmera Sony 10.2 MP acoplada ao sistema de captura de imagens L-Pix (Loccus). O DNA foi então quantificado pelo método comparativo de intensidade de coloração de acordo com o fabricante do marcador.

### **Amplificação dos *loci* de microssatélites**

O DNA extraído foi utilizado para a realização das amplificações dos *loci* de microssatélites em 25  $\mu\text{L}$  de reação, de acordo com Laborda e colaboradores (2009b): 2,5 ng/ $\mu\text{L}$  do DNA genômico; 2,5  $\mu\text{L}$  tampão (10X) da taq DNA polimerase, com 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  (*Biotools*); 2,5  $\mu\text{L}$  de mix de nucleotídeos; 0,2 M do par de oligonucleotídeos; e uma unidade de Taq DNA polimerase (1U/ $\mu\text{L}$  – *Biotools*).

Foram amplificados oito *loci* de microssatélites para as análises das duas populações de *D. mediopunctata*: Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR034, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR041, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR057, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR087, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR095, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR096, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR099, Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR118 (LABORDA *et al*, 2009b).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Bio-Rad no programa *Touchdown* para todos os *loci*, com exceção de Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR087, como descrito por Laborda *et al.* (2009b). As condições da PCR foram: 94 °C por 2 min; 10 ciclos de 94 °C por 1 min, 65 °C por 1 min, com a temperatura diminuindo um grau a cada ciclo (até 56 °C), e 72 °C por 2 min; 18 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; finalizando a 72°C por 5 min. Para o *locus* Dmed<sup>UNICAMP</sup>SSR087, a PCR foi realizada da seguinte forma: 1 ciclo a 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, finalizando a 72 °C por 5 min.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (150 mm X 170 mm X 0,7 mm) não desnaturante (6 mL de solução acrilamida/bis 29:1; 5 mL de sacarose 70%; 1 mL TBE 10 X; 7 µL TEMED; 100 µL APS 10% para 10 mL de solução de gel). Os alelos dos *loci* amplificados foram visualizados por meio de coloração do gel por nitrato de prata, de acordo com Sanguinetti e colaboradores (1994). O gel foi fotografado utilizando uma câmera Sony 10.2 MP acoplada ao sistema de captura de imagens L-Pix (Loccus) e através da imagem os alelos foram numerados em ordem crescente, sendo o alelo "1" o de menor tamanho.

### **Análises populacionais**

No *software* TFGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) (MILLER, 1997) foram obtidas as frequências alélicas, proporção de *loci* polimórficos, os valores de heterozigidade médios observado e esperado, e realizado o teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o método da cadeia de Markov com 10 lotes e 1.000 replicações. Os testes realizados no *software* GDA (*Genetic Data Analysis*) (LEWIS & ZAYKIN, 2001) foram: detecção de alelos exclusivos, a estatística F de Wright, distância e identidade de Nei (1978), distância de Reynolds e colaboradores (1983), e análise de agrupamento Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987).

Os valores obtidos para Fst por meio da estatística F de Wright foram utilizados para classificação da diferenciação genética entre os fragmentos e entre as estações, 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).

O teste para detecção de *bottleneck* (gargalo da garrafa) foi realizado no *software Bottleneck* 1.2.02 (CORNUET & LUIKART, 1996), por meio das análises do teste do ranqueamento de sinal de *Wilcoxon* (sob o modelo *Stepwise* de mutação), e da distribuição das frequências alélicas pelo modelo em “L” (*L-shape* – *L-sh*). A amostra que tenha passado através de um gargalo de garrafa genético provavelmente irá exibir um deslocamento do modelo (*shift mode* – *SM*) nas distribuições das frequências alélicas (CORNUET & LUIKART, 1996; LUIKART *et al.*, 1999).

Em todas as análises foram realizadas duas abordagens, uma denominada neste trabalho de populacional, a qual as comparações foram feitas entre as populações, sem considerar as estações; e outra, denominada sazonal, em que as estações foram tratadas como subpopulações amostrais das regiões geográficas.



## RESULTADOS

Os oito *loci* analisados neste trabalho foram polimórficos. Um *locus* foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95%. Na análise sazonal das duas populações de *Drosophila mediopunctata*, o número de alelos variou de três (nos *loci* SSR034 e SSR057, na primavera do Guairacá) a 22 (no *locus* SSR034, no inverno do Parque). Na análise populacional, o número de alelos variou de cinco (no *locus* SSR041 no Parque) a 24 (no *locus* SSR034 do Parque). Considerando todos os *loci*, o maior número médio de alelos detectados foi na população do Parque ( $\approx 13,6$ ), onde foi observada maior homogeneidade quanto ao número de alelos para os *loci* ao longo das estações analisadas. Já para o Guairacá, foi observado um menor número médio de alelos (11), porém com uma variação maior entre os *loci* nas estações analisadas. No total, foram observados, em média, aproximadamente 15 alelos para as amostras analisadas (Tabela 01).

Com relação à ocorrência de alelos exclusivos observados nas populações de *Drosophila mediopunctata*, foi detectado que sazonalmente o *locus* SSR041 foi o que apresentou o maior número destes, quatro alelos exclusivos no inverno do Guairacá. Populacionalmente, o *locus* SSR034, com 11 alelos exclusivos, foi o que apresentou o maior número quando comparado com o Guairacá (Tabela 01).

Todos os *loci* analisados apresentaram-se com desvios significativos do esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), variando de duas (SSR041 em GUA e GI) a seis (SSR118, em todas as amostragens) amostras fora do equilíbrio. Além disso, todas as amostras, sazonais e populacionais, tiveram desvios significativos nas frequências esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, variando de quatro (GI e GP) a oito (GUA) *loci* fora do equilíbrio (Tabela 02).

A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) na análise populacional foi de 0,5385 para o Parque e 0,5062 para o Guairacá, e a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) foi de 0,8630 e 0,8654, respectivamente. Já na análise sazonal, a  $H_o$  variou entre 0,3443 e 0,5950 (primavera e inverno no Guairacá, respectivamente) e a  $H_e$  variou entre 0,7846 e 0,8534 (primavera e inverno no Guairacá, respectivamente). Em todas as amostras,  $H_e$  foi maior que  $H_o$  (Tabela 02).



**Tabela 01.** Número de alelos populacional e sazonal por *locus* de microssatélite analisado nas populações de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR

<i>Loci</i>	PMA			GUA			Total por <i>locus</i>
	Sazonal		Populacional	Sazonal		Populacional	
	Inverno	Primavera	Total	Inverno	Primavera	Total	
<b>SSR034</b>	22 (02)	20	24 (11)	12	03	13	24
<b>SSR041</b>	05	05	05 (01)	08 (04)	-	08 (04)	09
<b>SSR057</b>	08	08 (02)	11 (02)	08	03	09	11
<b>SSR087</b>	09	09	10 (02)	08 (01)	09 (02)	11 (03)	13
<b>SSR095</b>	13	16 (03)	18 (09)	08 (01)	04	10 (01)	19
<b>SSR096</b>	12	16 (03)	16 (04)	11 (01)	09	13 (01)	17
<b>SSR099</b>	10 (02)	08 (01)	11 (04)	06	05	07	11
<b>SSR118</b>	12	11 (01)	14 (01)	12 (03)	12	17 (04)	18
<b>Média</b>	≈ 11,4	≈ 11,6	≈ 13,6	≈ 9,1	≈ 5,6	11	≈ 15,2

PMA: Parque Municipal das Araucárias; GUA: Guairacá. Entre parênteses estão o número de alelos exclusivos.

**Tabela 02.** Frequências alélicas populacional e sazonal dos *loci* de microssatélites analisados nas populações de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR

<b>Locil/Alelos</b>	<b>PMA</b>	<b>GUA</b>	<b>PI</b>	<b>PP</b>	<b>GI</b>	<b>GP</b>
<b>SSR034</b>	(n = 58)	(n = 14)	(n = 29)	(n = 29)	(n = 12)	(n = 02)
1	0,0517	-	0,0690	0,0345	-	-
2	0,0431	-	0,0172	0,0690	-	-
3	0,0345	-	0,0517	0,0172	-	-
4	0,0517	0,1072	0,0863	0,0172	0,1250	-
5	0,0172	-	0,0345	-	-	-
6	0,0345	0,0714	0,0172	0,0517	0,0833	-
7	0,0431	0,0357	0,0172	0,0690	0,0417	-
8	0,0862	0,0357	0,0517	0,1208	0,0417	-
9	0,0345	0,0714	0,0345	0,0345	0,0833	-
10	0,0431	0,0357	0,0863	-	0,0417	-
11	0,0604	-	0,0517	0,0690	-	-
12	0,0172	-	0,0172	0,0172	-	-
13	0,0086	0,0357	-	0,0172	-	0,2500
14	0,0259	-	0,0172	0,0345	-	-
15	0,0345	0,0357	-	0,0690	0,0417	-
16	0,0345	0,0357	0,0690	-	0,0417	-
17	0,0431	0,0714	0,0345	0,0517	0,0417	0,2500
18	0,0517	0,2143	0,0517	0,0517	0,2499	-
19	0,0517	0,1072	0,0172	0,0862	0,1250	-
20	0,0690	-	0,0345	0,1034	-	-
21	0,0259	0,1429	0,0172	0,0345	0,0833	0,5000
22	0,0517	-	0,0863	0,0172	-	-
23	0,0690	-	0,1034	0,0345	-	-
24	0,0172	-	0,0345	-	-	-
<b>SSR041</b>	(n = 49)	(n = 08)	(n = 30)	(n = 19)	(n = 08)	(n = 00)
1	-	0,3125	-	-	0,3125	-
2	-	0,0625	-	-	0,0625	-
3	-	0,0625	-	-	0,0625	-
4	-	0,1250	-	-	0,1250	-
5	0,1633	0,1250	0,2167	0,0789	0,1250	-
6	0,3980	0,1250	0,4167	0,3685	0,1250	-
7	0,2449	0,1250	0,2332	0,2632	0,1250	-
8	0,1531	0,0625	0,1167	0,2105	0,0625	-
9	0,0408	-	0,0167	0,0789	-	-
<b>SSR057</b>	(n = 57)	(n = 14)	(n = 29)	(n = 28)	(n = 10)	(n = 04)
1	0,0088	-	-	0,0179	-	-
2	0,0088	0,0714	0,0172	-	-	0,2500
3	0,0088	0,0714	0,0172	-	0,1000	-
4	0,0526	0,2500	0,1034	-	0,1500	0,5000
5	0,1404	0,1072	0,2414	0,0357	0,1500	-
6	0,2193	0,1786	0,1897	0,2500	0,1500	0,2500
7	0,0965	0,0714	-	0,1964	0,1000	-
8	0,2719	0,0714	0,2069	0,3393	0,1000	-
9	0,0965	0,0714	0,1552	0,0357	0,1000	-
10	0,0614	0,1072	0,0690	0,0536	0,1500	-
11	0,0350	-	-	0,0714	-	-

Tabela 02. Continuação

<b>Locii/Alelos</b>	<b>PMA</b>	<b>GUA</b>	<b>PI</b>	<b>PP</b>	<b>GI</b>	<b>GP</b>
<b>SSR087</b>	(n = 51)	(n = 23)	(n = 24)	(n = 27)	(n = 10)	(n = 13)
1	0,0196	-	0,0208	0,0185	-	-
2	0,0784	-	0,0208	0,1296	-	-
3	0,1176	0,0216	-	0,2222	-	0,0385
4	0,0882	0,0435	0,0208	0,1482	0,0500	0,0385
5	0,1275	0,0870	0,1250	0,1296	0,1000	0,0769
6	0,2059	0,1739	0,2500	0,1667	0,1000	0,2308
7	0,1667	0,1522	0,2500	0,0926	0,1000	0,1922
8	0,1275	0,1957	0,2083	0,0556	0,1500	0,2308
9	0,0392	0,1304	0,0418	0,0370	0,3000	-
10	0,0294	0,0652	0,0625	-	0,1000	0,0385
11	-	0,0435	-	-	-	0,0769
12	-	0,0435	-	-	0,1000	-
13	-	0,0435	-	-	-	0,0769
<b>SSR095</b>	(n = 53)	(n = 15)	(n = 30)	(n = 23)	(n = 12)	(n = 03)
1	0,0094	-	-	0,0217	-	-
2	-	0,1333	-	-	0,1667	-
3	0,0189	-	-	0,0435	-	-
4	0,0094	0,1000	-	0,0217	0,1250	-
5	0,0094	0,0333	0,0167	-	-	0,1667
6	0,0473	0,0333	0,0500	0,0435	0,0417	-
7	0,0566	-	0,0333	0,0871	-	-
8	0,0283	0,1333	-	0,0652	0,0833	0,3333
9	0,0189	0,1667	0,0333	-	0,2083	-
10	0,0849	0,0668	0,1167	0,0435	-	0,3333
11	0,0943	0,1000	0,1167	0,0652	0,0833	0,1667
12	0,1509	0,2000	0,2333	0,0435	0,2500	-
13	0,1509	-	0,1500	0,1522	-	-
14	0,0849	-	0,0667	0,1087	-	-
15	0,0660	-	0,0333	0,1087	-	-
16	0,0849	-	0,0500	0,1304	-	-
17	0,0473	-	0,0667	0,0217	-	-
18	0,0283	0,0333	0,0333	0,0217	0,0417	-
19	0,0094	-	-	0,0217	-	-
<b>SSR096</b>	(n = 51)	(n = 30)	(n = 22)	(n = 29)	(n = 12)	(n = 18)
1	0,0098	-	-	0,0172	-	-
2	0,0098	-	-	0,0172	-	-
3	0,0196	0,0500	-	0,0345	0,1250	-
4	0,0196	0,0333	0,0227	0,0172	0,0417	0,0277
5	0,0490	0,0833	0,0682	0,0345	0,0833	0,0833
6	-	0,0168	-	-	0,0417	-
7	0,1961	0,0833	0,1591	0,2241	0,1250	0,0556
8	0,0686	0,1000	0,0682	0,0690	-	0,1667
9	0,0589	0,0500	0,0682	0,0517	0,1250	-
10	0,0589	0,1833	0,0227	0,0862	0,1250	0,2222
11	0,0392	0,1333	0,0227	0,0517	0,1250	0,1389
12	0,1078	0,0500	0,0682	0,1380	-	0,0833
13	0,1176	0,1167	0,0909	0,1380	0,0417	0,1667
14	0,0980	0,0667	0,1818	0,0345	0,0833	0,0556
15	0,0589	-	0,0909	0,0345	-	-
16	0,0686	0,0333	0,1364	0,0172	0,0833	-
17	0,0196	-	-	0,0345	-	-

Tabela 02. Continuação

<b>Locil/Alelos</b>	<b>PMA</b>	<b>GUA</b>	<b>PI</b>	<b>PP</b>	<b>GI</b>	<b>GP</b>
<b>SSR099</b>	(n = 27)	(n = 24)	(n = 13)	(n = 14)	(n = 06)	(n = 18)
1	<b>0,0186</b>	-	-	<b>0,0357</b>	-	-
2	<b>0,0370</b>	<b>0,1875</b>	<b>0,0385</b>	<b>0,0357</b>	0,2500	<b>0,1667</b>
3	<b>0,1296</b>	<b>0,1250</b>	<b>0,2308</b>	<b>0,0357</b>	-	<b>0,1667</b>
4	<b>0,1852</b>	<b>0,3333</b>	<b>0,1537</b>	<b>0,2143</b>	0,0833	<b>0,4166</b>
5	<b>0,0370</b>	<b>0,0417</b>	<b>0,0769</b>	-	0,1667	-
6	<b>0,2963</b>	<b>0,1458</b>	<b>0,2308</b>	<b>0,3571</b>	0,0833	<b>0,1667</b>
7	<b>0,0556</b>	<b>0,1250</b>	<b>0,0385</b>	<b>0,0715</b>	0,2500	<b>0,0833</b>
8	<b>0,1481</b>	<b>0,0417</b>	<b>0,0769</b>	<b>0,2143</b>	0,1667	-
9	<b>0,0370</b>	-	<b>0,0385</b>	<b>0,0357</b>	-	-
10	<b>0,0370</b>	-	<b>0,0769</b>	-	-	-
11	<b>0,0186</b>	-	<b>0,0385</b>	-	-	-
<b>SSR118</b>	(n = 50)	(n = 32)	(n = 29)	(n = 21)	(n = 13)	(n = 19)
1	-	<b>0,0313</b>	-	-	<b>0,0769</b>	-
2	-	<b>0,0156</b>	-	-	<b>0,0385</b>	-
3	-	<b>0,0156</b>	-	-	<b>0,0385</b>	-
4	<b>0,0200</b>	<b>0,0156</b>	-	<b>0,0476</b>	<b>0,0385</b>	-
5	<b>0,0200</b>	-	-	<b>0,0476</b>	-	-
6	<b>0,0300</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0172</b>	<b>0,0476</b>	<b>0,0385</b>	<b>0,0263</b>
7	<b>0,0800</b>	<b>0,1094</b>	<b>0,0690</b>	<b>0,0952</b>	<b>0,1923</b>	<b>0,0527</b>
8	<b>0,0800</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,0690</b>	<b>0,0952</b>	<b>0,1538</b>	-
9	<b>0,0700</b>	<b>0,1094</b>	<b>0,0517</b>	<b>0,0952</b>	<b>0,1538</b>	<b>0,0789</b>
10	<b>0,1800</b>	<b>0,1249</b>	<b>0,1552</b>	<b>0,2144</b>	<b>0,0385</b>	<b>0,1842</b>
11	<b>0,1700</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,1897</b>	<b>0,1430</b>	<b>0,0769</b>	<b>0,0527</b>
12	<b>0,1500</b>	<b>0,0469</b>	<b>0,1724</b>	<b>0,1190</b>	-	<b>0,0789</b>
13	<b>0,0800</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,1034</b>	<b>0,0476</b>	-	<b>0,0527</b>
14	<b>0,0600</b>	<b>0,0938</b>	<b>0,0690</b>	<b>0,0476</b>	<b>0,0769</b>	<b>0,1053</b>
15	-	<b>0,0781</b>	-	-	<b>0,0769</b>	<b>0,0789</b>
16	<b>0,0400</b>	<b>0,0313</b>	<b>0,0690</b>	-	-	<b>0,0526</b>
17	<b>0,0100</b>	<b>0,1249</b>	<b>0,0172</b>	-	-	<b>0,2105</b>
18	<b>0,0100</b>	<b>0,0156</b>	<b>0,0172</b>	-	-	<b>0,0263</b>
<b>Ho</b>	0,5385	0,5062	0,5783	0,4973	0,5950	0,3443
<b>He</b>	0,8630	0,8654	0,8461	0,8433	0,8534	0,7846
<b>P<sub>0,95</sub></b>	100	100	100	100	100	100
<b>DFA</b>	-	-	<i>L-sh</i>	<i>L-sh</i>	<i>L-sh</i>	<i>L-sh</i>

PMA = Parque Municipal das Araucárias; GUA = Guairacá; PI = Parque Inverno; PP = Parque Primavera; GI = Guairacá Inverno; e GP = Guairacá Primavera; n = número de indivíduos; Ho = heterozigidade média observada; He = heterozigidade média esperada; P<sub>0,95</sub> = porcentagem de *loci* polimórficos; DFA = Distribuição da frequência alélica. Os *loci* com frequências alélicas fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg estão em negrito.

A análise de *bottleneck* não mostrou sinal de excesso de heterozigotos pelos testes realizados conforme esperado quando a população tenha sofrido um gargalo de garrafa genético, pois quando uma população passa por este evento, o número de alelos diminui mais rapidamente que a heterozigosidade. Todas as amostras sazonais mostraram a distribuição das frequências alélicas de acordo com o modelo em “L” (*L-shape*), o que indica a presença de poucos alelos com frequência alta e muitos com baixa frequência, o padrão esperado quando o número de alelos não diminui mais rapidamente do que a heterozigosidade (Tabela 2).

A estatística *F* de Wright (Tabela 03) populacional resultou em deficiência de heterozigotos estatisticamente significativa e muito alta tanto nas populações quanto no total ( $F_{is} = 0,3963$  e  $F_{it} = 0,4110$ , respectivamente), e a análise de diferenciação mostrou ser baixa e estatisticamente significativa entre as populações ( $F_{st} = 0,0243$ ). A análise sazonal resultou num padrão semelhante ( $F_{is} = 0,3908$ ;  $F_{it} = 0,4059$ ;  $F_{st} = 0,0249$ ).

A distância (*D*) e a identidade (*I*) genética de Nei (1978) populacional (Tabela 04) foram de 0,2643 e 0,7677, respectivamente. A análise sazonal mostrou valores para *D* entre 0,1558 (entre as duas amostras sazonais do Parque) e 0,5652 (entre as duas amostras populacionais da primavera). Para *I*, os resultados mostraram um padrão semelhante e inversamente proporcional (menor *I* entre as duas amostras populacionais da primavera – 0,5682, e maior *I* entre as duas amostras sazonais do Parque – 0,8557). As distâncias de Reynolds e colaboradores (1983) obtidas foram baixas e mostraram o mesmo padrão acima (Tabela 05), sendo a maior distância estimada entre as duas amostras populacionais da primavera (0,0363) e a menor entre as duas amostras sazonais do Parque (0,0142).

Na análise de agrupamento entre as amostras sazonais pelo método de Neighbor-Joining (agrupamento dos vizinhos mais próximos) utilizando as distâncias de Reynolds e colaboradores (1983) pode ser observado que as amostras sazonais de cada população apresentaram-se agrupadas mais proximamente, mostrando que há uma maior similaridade intrapopulacional do que interpopulacional, e que há uma maior diferenciação entre as amostras sazonais do Guairacá do que entre as amostras do Parque (visualizada pelo comprimento dos ramos) (Figura 02).

**Tabela 03.** Estatística F de Wright populacional e sazonal para oito *loci* de microssatélites em duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR

<b>Populacional</b>			
<i>Locí</i>	<b>Fis</b>	<b>Fit</b>	<b>Fst</b>
<b>SSR034</b>	0,2435	0,2527	0,0122
<b>SSR041</b>	- 0,0438	0,0610	0,1003
<b>SSR057</b>	0,4891	0,5001	0,0216
<b>SSR087</b>	0,5581	0,5574	- 0,0017
<b>SSR095</b>	0,4243	0,4407	0,0285
<b>SSR096</b>	0,4610	0,4653	0,0081
<b>SSR099</b>	0,5096	0,5202	0,0215
<b>SSR118</b>	0,4792	0,4843	0,0098
<b>Todos os loci</b>	0,3963	0,4110	0,0243
<b>I.C. 95%</b>			
<b>Mínimo</b>	0,2677	0,2988	0,0096
<b>Máximo</b>	0,4947	0,5033	0,0478
<b>Sazonal</b>			
<i>Locí</i>	<b>Fis</b>	<b>Fit</b>	<b>Fst</b>
<b>SSR034</b>	0,2395	0,2500	0,0138
<b>SSR041</b>	- 0,0449	0,0023	0,0452
<b>SSR057</b>	0,4760	0,5007	0,0471
<b>SSR087</b>	0,5494	0,5609	0,0255
<b>SSR095</b>	0,4194	0,4353	0,0274
<b>SSR096</b>	0,4597	0,4642	0,0084
<b>SSR099</b>	0,5043	0,5187	0,0290
<b>SSR118</b>	0,4789	0,4826	0,0072
<b>Todos os loci</b>	0,3908	0,4059	0,0249
<b>I.C. 95%</b>			
<b>Mínimo</b>	0,2642	0,2857	0,0157
<b>Máximo</b>	0,4888	0,5023	0,0347

IC = intervalo de confiança ao nível de significância de 95%.

**Tabela 04.** Distância (*D*) e identidade (*I*) genética de Nei (1978) populacional e sazonal entre duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR. *D* abaixo da diagonal e *I* acima da diagonal

<b>Populações</b>	<b>PI</b>	<b>PP</b>	<b>GI</b>	<b>GP</b>
<b>PI</b>	****	0,8557	0,7318	0,6608
<b>PP</b>	0,1558	****	0,6431	0,5682
<b>GI</b>	0,3123	0,4415	****	0,5861
<b>GP</b>	0,4143	0,5652	0,5343	****
<b>Populações</b>	<b>PMA</b>	<b>GUA</b>		
<b>PMA</b>	****	0,7677		
<b>GUA</b>	0,2643	****		

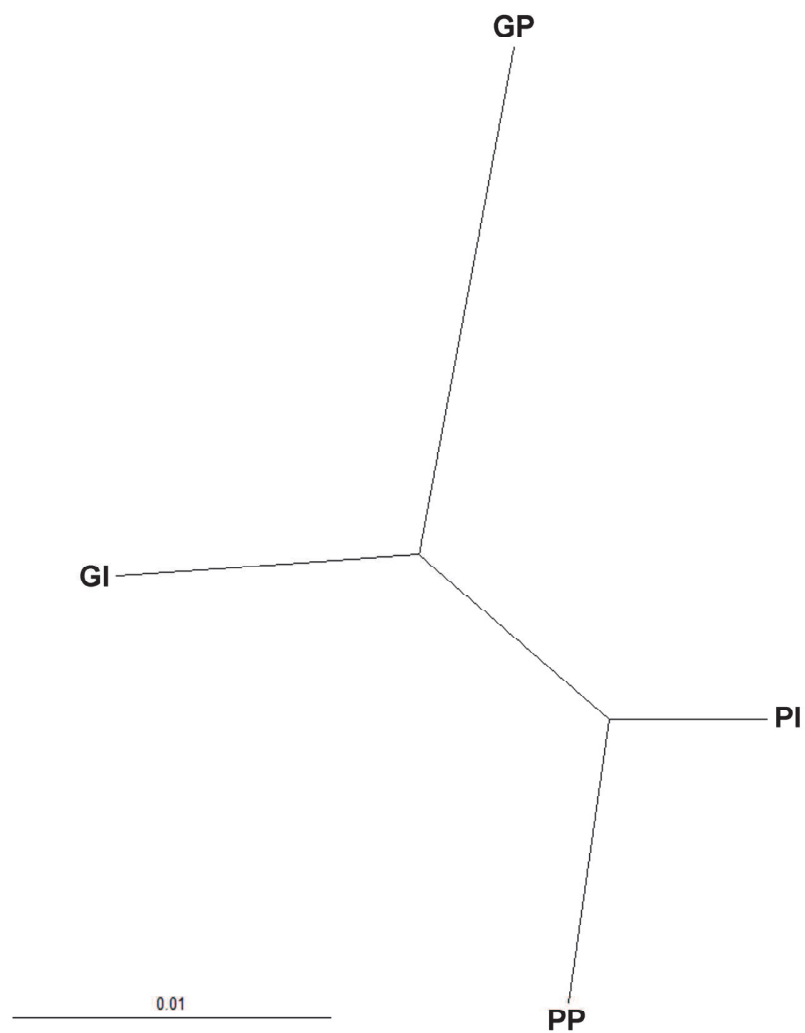
PMA = Parque Municipal das Araucárias; GUA = Guairacá; PI = Parque Inverno; PP = Parque Primavera; GI = Guairacá Inverno; GP = Guairacá Primavera.

**Tabela 05.** Distância de Reynolds e colaboradores (1983) sazonal entre duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR

<b>Populações</b>	<b>PI</b>	<b>PP</b>	<b>GI</b>	<b>GP</b>
<b>PP</b>	0,0142	****		
<b>GI</b>	0,0251	0,0243	****	
<b>GP</b>	0,0272	0,0363	0,0261	****

PMA = Parque Municipal das Araucárias; GUA = Guairacá; PI = Parque Inverno; PP = Parque Primavera; GI = Guairacá Inverno; GP = Guairacá Primavera.





**Figura 02.** Análise de agrupamento Neighbor-Joining utilizando distância de Reynolds e colaboradores (1983) para as amostras sazonais de populações naturais de *Drosophila mediopunctata* coletadas na região de Guarapuava/PR. PP = Parque Municipal das Araucárias – Primavera; PI = Parque Municipal das Araucárias – Inverno; GP = Guairacá – Primavera; GI = Guairacá - Inverno

## DISCUSSÃO

O conhecimento da estrutura populacional é de grande importância porque pode afetar a interpretação da diversidade genética observada (EXCOFFIER, 2001; BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002). Assim, a obtenção de estimativas da variabilidade genética e da diferenciação populacional é fundamental para compreensão das relações entre populações e representa uma ferramenta importante para desenvolver estratégias de conservação (ALMEIDA, 2007).

Tractz (2011) realizou uma análise da amplificação de 18 dos *loci* de microssatélites descritos para *Drosophila mediopunctata* por Laborda e colaboradores (2009b), sendo que estes *loci* foram escolhidos entre aqueles que apresentaram amplificação heteróloga e maior número de alelos (LABORDA *et al.*, 2009a) para futuras análises destes em espécies do grupo *guarani* de *Drosophila*. Entre os 18 *loci* analisados por Tractz (2011), os oito com melhor qualidade de amplificação e visualização no gel foram utilizados nas análises das duas populações de *D. mediopunctata*

A seleção preliminar dos *loci* por Tractz (2011) resultou na obtenção de um alto número médio de alelos ( $\approx 15$ ) observados nas populações de *Drosophila mediopunctata* analisadas neste trabalho quando comparado com o número médio observado inicialmente no trabalho de descrição desses mesmos *loci* ( $\approx 6$ ) de Laborda e colaboradores (2009a). Este número médio foi maior também que o detectado para microssatélites de outra espécie de *Drosophila*, *D. antonietae*, coletada na região de Mata de Araucária do Paraná em áreas com vegetação xerofítica (4,67 – MACHADO *et al.*, 2012). Esta diversidade foi também maior do que a encontrada para alozimas em *D. mediopunctata* nas mesmas populações (PMA = 3,04; GUA = 2,69; CAVASINI, 2009). Recentemente, Machado e colaboradores (2012) e Silva (2011) analisaram a variabilidade de alozimas de duas espécies de um grupo irmão ao grupo *tripunctata* de *D. mediopunctata*, *D. ornatifrons* e *D. maculifrons* do grupo *guarani*, e observaram um alto número de alelos para este marcador nestas espécies (6,86 e 6,57, respectivamente), porém foram menores do que os obtidos no presente trabalho.

A heterozigosidade média observada mostrou que há uma alta variabilidade genética ( $H_o = 0,5385$  – PMA;  $H_o = 0,5062$  – GUA) nas populações de *Drosophila*

*mediopunctata*. No geral, estes valores foram mais altos que os relatados para espécies não cactofílicas ( $H_o = 0,160$ ) e cactofílicas ( $H_o$  variando de 0,087 a 0,319) de *Drosophila*, provenientes de ambientes que não são de Mata de Araucária (dados de alozimas de ZOUROS, 1973; JOHNSON, 1974; BARKER & MULLEY, 1976; MORAES & SENE, 2002; MATEUS & SENE, 2007; MATEUS *et al.*, 2010). A heterozigosidade média observada neste trabalho para *D. mediopunctata* foi superior também à obtida para a espécie cactofílica *D. antonietae*, coletada em Mata de Araucária da região de Guarapuava/PR ( $H_o = 0,4907$ , estimada por meio de *loci* de microssatélites por Machado e colaboradores, 2012).

Os valores obtidos aqui foram também maiores que os observados nestas mesmas populações em estudo de alozimas de Cavasini (2009) (PMA –  $H_o = 0,232$ ; GUA –  $H_o = 0,202$ ). Além disso, no estudo com alozimas de Cavasini (2009) foi observada menor variabilidade genética para as populações do Guairacá quando comparadas com as do Parque, também detectada neste trabalho.

A menor variabilidade genética observada para a população de *Drosophila mediopunctata* do Guairacá, estimada por meio de dois marcadores genéticos diferentes, permite sugerir que embora esta área possua uma maior cobertura florestal, aproximadamente quatro vezes maior, o Parque é mais heterogêneo em relação a tipos de habitats na sua composição quando comparado com o Guairacá, podendo apresentar mais microhabitats, ampliando as oportunidades de nichos, e assim, uma maior diversidade poderia ser mantida no Parque. Ainda, o Parque é uma reserva ecológica desde 1991, portanto é uma área que é efetivamente preservada e conservada, enquanto que no Guairacá existe uma grande atividade antrópica extrativista (erva-mate e pinhão), o que poderia afetar a distribuição da variabilidade genética neste local, explicando assim a menor diversidade observada em comparação ao Parque. Contudo, não pode ser descartada a hipótese que as diferenças na variabilidade genética observadas entre o Parque e Guairacá possam ser devidas ao número diferente de indivíduos coletados nestas populações, que resultou em praticamente o dobro de amostras analisadas do Parque em relação as analisadas do Guairacá (60 para PMA e 32 para GUA, neste trabalho; e 110 para PMA e 47 para GUA, no estudo de isoenzimas de Cavasini, 2009), apesar do esforço de coleta ter sido o mesmo em ambas as áreas. Ou seja, a diferença

observada entre as populações pode ser devido a coleta e/ou ao tamanho populacional.

A análise da estatística F de Wright mostrou que há uma baixa diferenciação genética tanto populacional ( $F_{st} = 0,0243$ ) quanto sazonal ( $F_{st} = 0,0249$ ), corroborada pelos valores obtidos para a distância de Reynolds e colaboradores (1983). Porém, apesar desta baixa diferenciação genética, foi encontrado um grande número de alelos exclusivos para cada uma das populações, o que indica que há uma certa restrição ao fluxo gênico e isolamento reprodutivo entre as mesmas, podendo resultar num aumento da frequência de cruzamentos endogâmicos, confirmado pelos valores muito altos obtidos de  $F_{is}$  (0,3963 – populacional; 0,3908 – sazonal),  $F_{it}$  (0,4110 – populacional; 0,4059 – sazonal), e também pelas diferenças encontradas entre as heterozigosidades médias esperadas e observadas.

De acordo com Prout e Barker (1993), existem diversas razões possíveis para um  $F_{is}$  positivo, além da endogamia, tais como, acasalamentos preferenciais, alelos nulos e efeito de Wahlund, e ainda alelos raros e seleção contra heterozigotos. Dentre estes fatores, o mais provável é a endogamia, uma vez que cruzamentos preferenciais não tem sido observados em *Drosophila* (KELLY & NOOR, 1996; MACHADO *et al.*, 2002); alelos nulos parecem não afetar as análises de genética populacional com marcador microssatélite (MACHADO *et al.*, 2010); alelos raros tiveram frequência muito baixa nas amostras para serem considerados; não deve haver efeito de Wahlund em nossas amostragens uma vez que as coletas foram realizadas em espaços de tempo distantes; e, por fim, os microssatélites são localizados preferencialmente em regiões intergênicas, o que minimiza o efeito da seleção natural neste marcador.

A análise de agrupamento *Neighbor-Joining* mostrou que há uma proximidade maior entre as amostras sazonais de cada população, isto é, há uma maior similaridade intrapopulacional do que interpopulacional, o que seria esperado em vista à restrição ao fluxo gênico detectada. Porém, nesta análise também foi observado que há uma maior diferenciação entre as amostras sazonais do Guairacá do que entre as amostras do Parque (visualizada pelo comprimento dos ramos), este fato pode ser devido também a maior heterogeneidade de habitats e a menor influência antrópica no Parque que no Guairacá.

As distâncias ( $D$ ) e identidades ( $I$ ) genéticas de Nei (1978) obtidas reforçam o isolamento entre as populações uma vez que os valores estimados para  $D$  estão acima de 0,1 e de  $I$  estão abaixo de 0,9. Segundo Avise e Smith (1977) e Thorpe (1983), populações da mesma espécie tendem a apresentar similaridades genéticas ( $I$  de Nei) acima de 0,9 (e conseqüentemente  $D < 0,1$ ), e espécies diferentes do mesmo gênero tendem a apresentar valores de  $I$  entre 0,25 e 0,85 ( $0,16 < D < 1,39$ ). Portanto, existe uma diferenciação real nas frequências alélicas entre as populações amostradas (pelos dados de alelos exclusivos e de distância e identidade de Nei, 1978), porém esta não está refletida nos valores de  $F_{st}$  e a distância de Reynolds e colaboradores (1983), que estimam a diferenciação genética com base nas heterozigosidades médias das populações. Wright (1978) observa, porém, que a diferenciação entre populações não é, de modo algum, insignificante, mesmo se o  $F_{st}$  for tão pequeno quanto 0,05 ou ainda menor.

Cavasini (2009), analisando a variabilidade alozimática, destacou a existência de estruturas subpopulacionais no Outono no Parque e na Primavera no Guairacá para *Drosophila mediopunctata*, e propôs que deve haver um aumento da probabilidade da ocorrência de deriva genética nestes períodos devido a um “gargalo de garrafa” genético (*bottleneck*) que deve ter ocorrido na estação anterior (verão e inverno, respectivamente), e que, possivelmente, este seja um dos principais processos evolutivos que levem a formação de estruturas microgeográficas através do tempo nesta espécie. Neste trabalho, o teste do “gargalo de garrafa” genético (CORNUET & LUIKART, 1996; LUIKART *et al.*, 1999) não mostrou excesso de heterozigotos em nenhuma amostra sazonal analisada, como seria esperado se alguma delas tivesse sofrido um processo desse tipo recentemente. A diferença encontrada para esta análise entre os diferentes marcadores deve ser devido ao fato de ter sido encontrada uma relação importante das alozimas com fatores abióticos (CAVASINI, 2009), o que não seria esperado para microssatélites uma vez que é considerado um marcador seletivamente neutro.

Assim, pode ser concluído que os dados obtidos neste trabalho mostram que o Parque Municipal das Araucárias, uma unidade de conservação ambiental, apesar de ser uma área de menor tamanho que o Guairacá, uma fazenda extrativista de pinhão e erva-mate, apresentou uma população mais estável geneticamente devido a sua superior qualidade de preservação e diversidade de habitats. Isto permite

sugerir que estes fatores encontrados no Parque são mais importantes do ponto de vista da conservação genética para as populações de *Drosophila mediopunctata*, do que o tamanho da área.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. A. R. Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA – microssatélites: uma perspectiva de conservação. Tese de Doutorado. *Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real*, 333p., 2007.

ANDRADE, C. A.; VIEIRA, R. D.; ANANINA, G.; KLACZKO, L. B. Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica*, v. 135, p. 13-23, 2009.

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

BÄCHLI, G. Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae. 2012. Disponível em: <<http://www.taxodros.uzh.ch/>> Acessado em junho de 2012.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 155-165, 2002.

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

BITNER-MATHÉ, B. C.; KLACZKO, L. B. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity*, v. 83, p. 688-696, 1999a.

BITNER-MATHÉ, B. C.; KLACZKO, L. B. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. *Genetica*, v. 105, p. 35-42, 1999b.

BRNCIC, D.; BUDNIK, M.; GUINEZ, R. An analysis of a Drosophilidae community in Central Chile during a 3 year period. *Zeitschrift fur Zoologische Systematik und Evolution-sforschung*, v. 23, p. 90-100, 1985.

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

CAO, J.; LI, J.; NIU, J.; LIU, X.; ZHANG, Q. Population structure of *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae) on pear trees in China identified using microsatellites. *J. Econ. Entomol.*, v. 105, p. 583-591, 2012.

CARVALHO, A. B.; KLACZKO, L. B. Autosomal supressors of sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity (Edinb.)*, v. 71, p. 546-551, 1993.

CARVALHO, A. B.; VAZ, S. C.; KLACZKO, L. B. Polymorphism for Y-linked supressors of sex-ratio in two natural populations of *Drosophila mediopunctata*. *Genetics*, v. 146, p. 891-902, 1997.

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.; GUSTANI, E. C.; RODRIGUES, P. T.; SIMÃO, D. P.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Differential body expression of isoenzymatic loci in adults of the *Drosophila mediopunctata* (Diptera: Drosophilidae). *Drosophila Information Service*, v. 91, p. 90-91, 2008.

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.



DALLAS, J. F. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, v. 3, p. 452-456, 1992.

DELGADO-MARTINEZ, F. J.; AMAYA, I., SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F.; GOMEZ-JIMENEZ, M. C. Microsatellite marker-based identification and genetic relationships of olive cultivars from the Extremadura region of Spain. *Genet. Mol. Res.*, v. 11, p. 918-932, 2012.

DOBZHANSKI, T.; PAVAN, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências Universidade de São Paulo*, v. 36, p. 1-72, 1943.

EISEN, J. A. *Mechanistic basis for microsatellite instability*. In: *Microsatellites Evolution and applications*. Cap. 4. Goldstein, D. B.; Schlötterer, C. (eds.). Oxford University Press, Oxford, p. 34-48, 1999.

ESTOUP, A.; CORNUET, J. M. *Microsatellite evolution: inferences from population data*. In: *Microsatellites: Evolution and application*. Goldstein, D. B.; Schlötterer, C. Oxford University Press. Oxford, p. 49-65, 1999.

EXCOFFIER, L. *Analysis of population subdivision*. In: *Handbook of statistical genetics*. Balding, D. J.; Bishop, M.; Cannings, C. (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, p. 271-308, 2001.

FRANKHAM, R. Inbreeding and Extinction - a Threshold Effect. *Conservation Biology*, v. 9, p. 792-799, 1995.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da *Drosófila*. *Cultus*, v. 1, p. 3-66, 1949.

FROTA-PESSOA, O. Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense*, v. 10, p. 253-329, 1954.

FUTUYMA, D. J. *Evolution*. 2<sup>a</sup>. ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 633p., 2009.

GARCIA, A. C. L.; GOTTSCHALK, M. S.; MONTES, M. A.; VALIATI, V. H.; ROHDE, C.; VALENTE, V. L. S. Spatial and temporal variation in *Drosophilidae* (Diptera) abundance in three environments with different vegetal cover levels in a park in Porto Alegre, Southern Brazil. *D. I. S.*, v. 92, p. 80, 2009.

GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, v. 88, p. 335-342, 1997.

HANCOCK, J.M. *Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. In: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Goldstein, D. B.; Schlöttere, C. (Eds.). Oxford University Press, Oxford. p. 1-9, 1999.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 541p., 1997.

HATADANI, L. M.; KLACZKO, L. B. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica*, v. 133, p. 335-342, 2008.

HATADANI, L. M.; BAPTISTA, J. C.; SOUZA, W. N.; KLACZKO, L. B. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata* genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* (Edinb.), v. 93, p. 525-534, 2004.

IBGE. *Atlas geográfico escolar*. 2 ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

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

KELLY, J. K.; NOOR, M. A. F. Speciation by reinforcement: A model derived from studies of *Drosophila*. *Genetics*, v. 143, p. 1485-1497, 1996.

KESÄNIENI, J. E.; GEUVERINK, E.; KNOTT, K. E. Polymorphism in developmental mode and its effect on population genetics structure of a Spionid Polychaete, *Pygospio elegans*. *Integr. Comp. Biol.*, publicação on line, 2012.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, v. 217, p. 624-626, 1968.

KING, L.; JUKES, T. Non-darwinian evolution. *Science*, v. 164, p. 788-789, 1969.

KLACZKO, L. B. *Population Genetics of Drosophila mediopunctata*. In: Genetics of natural populations. The continuing importance of Theodosius Dobzhansky. Levine, L. (ed.), Columbia University Press, New York, p. 140-153, 1995.

KLACZKO, L. B. Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica*, v. 126, p. 43-55, 2006.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. *Sellowia*, v. 12, p. 17-44, 1960.

KREBS, C. J. The experimental analysis of distribution and abundance. 3. ed., Harper and Row, New York, 816p., 1985.

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 Genet. Resour.*, v. 1, p. 281-296, 2009a.

LABORDA, P. R.; MORI, G. M., SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. *Conservation Genet. Resour.*, v. 1, p. 297-307, 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. Mol. Biol.*, v. 21, p. 89-95, 2012.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, v. 15, p. 5323-5338, 1987.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data, Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. 2001.

LI, W-H.; GRAUR, D. *Gene structure of Molecular Evolution*. In: Fundamentals of Molecular Evolution. Cap. 1. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, p. 3-19, 1991.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LUIKART, G.; CORNUET, J. M.; ALLENDORF, F. W. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. *Conserv. Biol.*, v. 13, p. 523-530, 1999.

MAACK, R. Notas preliminares sobre clima, solos e vegetação do Estado do Paraná. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 2, p.102-200, 1948.

MAACK, R. Geografia Física do Estado do Paraná. Livraria J. Olympio Editora, Rio de Janeiro e Curitiba, 450p., 1981.

MACHADO, S. A.; SIQUEIRA, J. D. P. *Distribuição natural da Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze.* In: Problemas florestais do gênero *Araucaria* (*Forestry problems of Genus Araucaria*), Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná (FUPEF), p. 49, 1980.

MACHADO, L. P. B.; CASTRO, J. P.; MADI-RAVAZZI, L. Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). *Braz. J. Biol.*, v. 62, p. 601-608, 2002.

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*, v. 100, p. 573-584, 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.

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.; SENE, F. M. Population genetic study of allozyme variation in natural populations of *Drosophila antonietae* (Insecta, Diptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 45, p. 136-143, 2007.

MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; CAVASINI, R.; GUSTANI, E. C. Isoenzymatic analysis of South American species of the *Drosophila tripunctata* group (Diptera, Drosophilidae). *Drosophila Information Service*, v. 91, p. 53-56, 2008.

MEDEIROS, H. F.; KLACZKO, L. B. A weakly biased *Drosophila* trap. *Drosophila Information Service*, v. 82, p. 100-102, 1999.

MEDEIROS, J. D.; SAVI, M.; BRITO, B. F. A. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. *Biotemas*, v. 2, p. 33-50, 2005.

MILLER, M. P. Tools for Population Genetic Analysis – TFPGA – 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. Computer software distributed by author. 1997.

MORAES, E. M; SENE, F. M. Breeding structure of an isolated cactophilic *Drosophila* population on a sandstone table hill. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v. 40, p. 123-128, 2002.

MUELLER, L. D.; BARR, L. J.; AYALA, F. J. Natural selection vs. random drift: evidence from temporal variation in allele frequencies in nature. *Genetics*, v. 111, p. 517-554, 1985.

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

PRIMMER, C. R.; ELLEGREN, H. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology*, v. 15, p. 997-1008, 1998.

PROUT, T.; BARKER, J. S. F. F statistics in *Drosophila buzzatii*: Selection, population size and inbreeding. *Genetics*, v. 134, p. 369-375, 1993.

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

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, v.105, p.767-779, 1983.

ROCHA, F.; MEDEIROS, H. F.; KLACZKO, L. B. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution*, v. 63, p. 280-287, 2009.

SAAVEDRA, C. C.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; NAPP, M.; VALENTE, V. L. S. A descriptive and analytical study of neotropical drosophilid communities. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v. 33, p. 62-74, 1995.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.

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. 209-214, 1994.

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

SCHUG, M. D.; MACKAY, I. F. C.; AQUADRO, C. F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, v. 15, p. 99-102, 1997.

SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R.; BIZZO, N. M. V. Influence of different ways to set baits for collection of *Drosophila* flies in three natural environments. *Drosoph Inf Serv*, v. 56, p. 118–121, 1981.

SILVA, D. C. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de *Drosophila maculifrons* e *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) em fragmentos de Mata Atlântica no Sul e Sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Associação Ampla entre as Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), 98p., 2011.

SILVA, A. C.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. S.; EGITO, A. A.; SANTOS, S. A.; LIMA, F. C.; CASTRO, S. T.; MARIANTE, A. S.; CORREA, P. S.; MCMANUS, C. M. Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers. *Genet. Mol. Res.*, v. 11, p. 881-890, 2012.

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.

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: Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance. Oxford, G. S; Rollinson, D. (eds.). 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.

TÓTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, v. 10, p. 967-981, 2000.



TRACTZ, C. C. Análise sazonal da variabilidade de *loci* de microssatélites em populações naturais de *Drosophila mediopunctata* (Diptera: Drosophilidae). Trabalho de Conclusão de Curso. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), 22p., 2011.

VAL, F. C.; VILELA, C. R.; MARQUES, M. D. *Drosophilidae of the Neotropical Region*. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. 3. ed. Ashburner, M.; Carson, H. L.; Thompson Jr., J. N. (eds). Academic Press, New York, p. 123-168, 1981.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Five new species of Neotropical *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, v. 73, p. 49-65, 2000.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, v. 2, p. 1123-1128, 1993.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of population. *Variability within and among natural populations*. Vol. 4. Univ. Chicago Press, Chicago, 590p., 1978.

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

Catalogação na Publicação	
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg	
H472v	Heinz, Norbert Padilha Variabilidade molecular sazonal de <i>Drosophila mediopunctata</i> (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) / Norbert Padilha Heinz. -- Guarapuava, 2012 x, 39 f. : il. ; 28 cm
	Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2012
	Orientadora: Luciana Paes de Barros Machado Co-orientador: Rogério Pincela Mateus Banca examinadora: Ana Sílvia Lapenta, Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki
	Bibliografia
	1. Microssatélite. 2. Heterozigozidade. 3. Diversidade genética. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.
	CDD 595.7