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

**BIODIVERSIDADE DE DROSOFILÍDEOS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
DROSOPHILA ANTONIETAE EM FRAGMENTOS DE HABITAT NO CURSO MÉDIO
DA BACIA DOS RIOS PARANÁ-URUGUAI**

DAIANE PRISCILA SIMÃO

Guarapuava

2010

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

**BIODIVERSIDADE DE DROSOFILÍDEOS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
DROSOPHILA ANTONIETAE EM FRAGMENTOS DE HABITAT NO CURSO MÉDIO
DA BACIA DOS RIOS PARANÁ-URUGUAI**

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

2010

Catálogo na Publicação

Biblioteca UNICENTRO, Campus Guarapuava

Simão, Daiane Priscila
S588 Biodiversidade de drosophilídeos e variabilidade genética de *Drosophila antonietae* em fragmentos de habitat no curso médio da bacia dos rios Paraná-Uruguai. / Daiane Priscila Simão. -- Guarapuava, 2010.
107f. : il
Digitado
Orientador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus
Co-Orientadora: Dra Luciana Paes de Barros Machado
Dissertação(Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual do Centro-Oeste/Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, 2010

1. Biologia Evolutiva. 2. Drosophilidae - estrutura de comunidades.
3. *Drosophila antonietae* – variabilidade genética I. Título.

CDD 574

Orientador

Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus

Co-orientadora

Profa. Dra. Luciana Paes de Barros Machado

Ao Criador da vida e da Evolução

Agradecimentos

Não farei referências a que agradeço, pois são inumeráveis as razões as quais agradecer:

Aos professores Dr. Rogério Pincela Mateus, Dra. Luciana Paes de Barros Machado e Dra. Maria Luisa Tunes Buschini.

Carinhosamente aos meus pais, Antonio J. Simão Neto e Beatriz P. Simão, e também minhas irmãs, Likelli, Lidiane e Caroline.

Com muito amor ao meu esposo, Jefferson.

A todos do Laboratório de Genética e Evolução (UNICENTRO) em especial Renato, Manu, Priscila, Kati, Norbert e Dani.

A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva (UNICENTRO / UEPG),

À Fundação Araucária, CAPES e ao CNPq.

A todos do MUR – Ministério Universidades Renovadas;

E a todas as pessoas que estiveram de uma forma ou de outra envolvidas neste processo.

Obrigada!

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a composição da fauna de drosofilídeos em uma área de Floresta Ombrófila Mista, a fim de obter subsídios para entender o efeito da fragmentação deste bioma sobre a biodiversidade deste grupo de insetos. Além disso, pretende-se inferir aspectos sobre eventos históricos e ecológicos ocorridos em uma espécie cactofílica do cluster *D. buzzatii*, *D. antonietae*, o que pode levar a uma melhor compreensão sobre como ocorrem às especiações nas regiões tropicais e subtropicais. Os dados de ocorrência de espécies, riqueza de espécies e diversidade beta vertical e horizontal resultaram em uma grande contribuição para o entendimento da dinâmica das comunidades de drosofilídeos de áreas fragmentadas de Floresta Ombrófila Mista da região de Guarapuava, e pode servir de referência futura para projetos de conservação da biodiversidade deste bioma, que está em intenso processo de degradação. Para *D. antonietae*, baixa diferenciação genética entre as populações foi observada na Análise Regional, não havendo correlação significativa entre as distâncias genéticas e físicas. Na Análise Macrogeográfica, foi encontrada uma diferenciação genética moderada, e índices de distâncias genéticas representativos desta diferenciação moderada. A distância genética ainda evidenciou como mais semelhantes as populações do alto e baixo da bacia, ficando mais distantes as populações localizadas na porção média. Os dados de correlação entre as distâncias genéticas e físicas, através do teste de Mantel, não foram significativos, confirmando que não há correlação entre os mesmos. Assim, a homogeneidade e alto índice de polimorfismo nas populações naturais de *D. antonietae* devem ser devido de uma manutenção de polimorfismos ancestrais compartilhados, com a atuação do fluxo gênico durante as expansões e retrações populacionais que ocorreram na história evolutiva desta espécie.

Abstract

This work aimed to evaluate the composition of the Drosophilidae fauna in an area of Araucaria forest in order to obtain data to understand the effects of fragmentation of this biome on the biodiversity of this group of insects. In addition, we intend to infer aspects of ecological and historical events that occurred in a cactophilic species of the *D. buzzatii* cluster, *D. antonietae*, which could shed light to better understand how speciation occurs in the tropical and subtropical regions. The data on species occurrence, species richness, vertical and horizontal beta diversity resulted in a high contribution to comprehend the Drosophilidae community dynamics on fragmented areas of Araucaria forest in the Guarapuava region, and will serve as a reference for future projects regarding conservation of this biome biodiversity, which is under intense process of degradation. For *D. antonietae*, low genetic differentiation among populations was observed in the Regional Analysis, with no significant correlation between genetic and physical distances. In the Macrogeographical Analysis, a moderate genetic differentiation was found and the genetic distance index was representative of the moderate differentiation. The genetic distance was more similar between the populations located in the higher and lower portion of the basin, and the populations located in the middle portion were more distant. The correlation between genetic and physical distances, analysed through the Mantel test, was also not significant, indicating no correlation between them. Thus, homogeneity and high degree of polymorphism in natural populations of *D. antonietae* must be due to maintenance of shared ancestral polymorphisms, and the gene flow should have acted during the populations expansions and retractions that have occurred in the evolutionary history of this species.

LISTA DE FIGURAS
CAPÍTULO I

FIGURA 1: Localização da área de estudo.....	15
FIGURA 2: Plotagem da abundância de espécies de drosofilídeos.....	19
FIGURA 3: Frequência de ocorrência (FO) das espécies em dimensão espacial estratos verticais.....	21
FIGURA 4: Dendograma de dissimilaridade de Bray-Curtis entre os pontos, desde o ponto 1 (P1), na borda recente, até o ponto 5 (P5), na borda mais antiga do fragmento, passando pelo interior do fragmento.....	25
FIGURA 5: Dendograma de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as estações.....	26
FIGURA 6: Análise de correspondência de espécies para as 4 estações.....	27

CAPÍTULO II

FIGURA 1: Localização geográfica das espécies pertencentes ao cluster <i>D. buzzatii</i>	44
FIGURA 2: Localização geográfica das populações de <i>Drosophila antonietae</i> utilizadas na Análise Macrogeográfica....	54
FIGURA 3: PAGE 6% corada com nitrato de prata para visualização dos loci de microsatélites amplificados em indivíduos da espécie <i>Drosophila antonietae</i> coletados no Rio do Poço em Guarapuava/PR.....	55
FIGURA 4: Agrupamento entre os vizinhos mais próximos (Neighbor-Joining) para as populações dentro da análise regional, utilizando as distâncias de Reynolds <i>et al.</i> (1983).....	63
FIGURA 5: Análise de agrupamento dos vizinhos mais próximos (Neighbour-Joining) para todas as populações dentro da análise macrogeográfica, utilizando as distâncias de Reynolds <i>et al.</i> (1983).....	75

LISTA DE TABELAS
CAPÍTULO I

TABELA 1: Número total de espécies e suas abundâncias totais na fazenda do Rio do Poço/PR.....	18
TABELA 2: Diversidade alfa espacial.....	22
TABELA 3: Teste de Tukey comparando a diversidade das estações do ano.....	24
TABELA 4: Índice de similaridade, Jaccard (J), entre as estações do ano.....	28

CAPÍTULO II

TABELA 1: Coordenadas geográficas das áreas de coleta, no estado do Paraná, de indivíduos da espécie <i>Drosophila antonietae</i> utilizados para Análise Regional.....	49
TABELA 2: Localização das populações da espécie <i>Drosophila antonietae</i> utilizadas na Análise Macrogeográfica, e a bacia hidrográfica a qual a área de coleta pertence.....	53
TABELA 3: Freqüências alélicas de cada <i>locus</i> de microsatélite, para cada população, na Análise Regional.....	56
TABELA 4: Freqüências genotípicas encontradas dentro de cada <i>locus</i> de microsatélite, para cada população, na Análise Regional.....	57-58
TABELA 5: Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis loci de microsatélite nas 3 populações estudadas.....	60
TABELA 6: Teste exato para diferenciação de populações comparando todas as populações, duas a duas, dentro da Análise Regional.....	61
TABELA 7: Distâncias de Reynolds <i>et al.</i> (1983) entre todas as populações, dentro da Análise Regional.....	62
TABELA 8: Estatística <i>F</i> de Wright para todos os <i>loci</i> analisados, em todas as populações, dentro da análise regional..	62
TABELA 9: Freqüência alélica para cada <i>locus</i> de microsatélite, calculada para cada população na Análise Macrogeográfica.....	65-66
TABELA 10: Freqüências genotípicas encontradas para cada genótipo de cada <i>locus</i> de microsatélite, em cada população dentro da Análise Macrogeográfica.....	67-70
TABELA 11: Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os <i>loci</i> dentro da Análise Macrogeográfica.....	71
TABELA 12: Estatística <i>F</i> de Wright para todos os <i>loci</i> dentro da Análise Macrogeográfica.....	72
TABELA 13: Distâncias de Reynolds <i>et al.</i> (1983) entre todas as populações dentro da Análise Macrogeográfica.....	74

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS GERAIS	06
MATERIAL E MÉTODOS	07
RESULTADOS	08
CAPÍTULO I	09
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	11
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	23
AGRADECIMENTOS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO II	36
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	38
OBJETIVOS	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	76
AGRADECIMENTOS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

INTRODUÇÃO

Esta pesquisa faz parte de um projeto maior, que busca elucidar e melhor compreender os processos evolutivos geradores e mantenedores da grande diversidade da fauna em regiões neotropicais. Para isso, a busca de informações sobre a sistemática, estrutura da comunidade, composição genética, distribuição geográfica, ecologia e comportamento de drosófilas de ocorrência nas formações vegetais da América do Sul vêm sendo realizada, e este organismo tem se mostrado um importante modelo biológico para estudos evolutivos.

Mudanças climáticas globais, tais como glaciações e períodos interglaciais com aquecimento global, possuem efeitos sobre a expansão e/ou retração dos vários domínios morfoclimáticos vegetais da América do Sul, resultando em fragmentação de habitats (Ab'Saber, 1977, 1992, 2000). Mais recentemente, o principal fator gerador de fragmentação de áreas naturais tem sido o uso da terra, o que não apenas resulta na diminuição da cobertura vegetal como também em uma assimétrica distribuição dos remanescentes, com tamanhos e formas variadas (Didham *et al.*, 1996). Geralmente, o desmatamento provoca a fragmentação de áreas contínuas, gerando o aparecimento de verdadeiras ilhas de vegetação isoladas umas das outras por áreas cobertas com pastagens ou outro tipo de cultura (Lovejoy, 1980).

A fragmentação de vegetações nativas, tanto por processos antrópicos recentes quanto por expansões e/ou retrações históricas, é um processo que gera a perda da biodiversidade, podendo levar muitas espécies à extinção. Vários são os mecanismos que levam a esse desbalanço. Os mais comuns são aqueles relacionados ao desenho do fragmento: área, formato e isolamento. A redução da cobertura vegetal original pode provocar a eliminação de certas espécies simplesmente por não haver mais espaço suficiente para acomodar todos os indivíduos originalmente presentes (Preston, 1962). O formato do fragmento pode implicar em aumento do "stress" ambiental, pela eliminação da proteção anteriormente oferecida pelas faixas marginais (Kapos, 1989; Kiviniemi, 2008). Além disso, quanto mais isolado estiver o fragmento, isto é, quanto mais distante estiver de uma área com vegetação similar, mais difícil será o intercâmbio de espécies entre os dois locais e também o fluxo gênico entre populações da mesma espécie (Brown e Kodric-Brown, 1977; Keller e Largiadèr, 2003). Isso causaria reduções no

tamanho populacional podendo levar ao endocruzamento, o qual aumenta a probabilidade de extinção de populações (Frankham, 1995; O'Grady *et al.*, 2006). Reduções no tamanho populacional também levam a perda de variabilidade genética, o que pode restringir a capacidade da população de se adaptar a novas condições ambientais (Soulé, 1986; Caswell, 2001).

Na região Sul do Brasil dois tipos de vegetação fragmentada são encontrados, resultante dos processos de fragmentação descritos acima: o Bioma Floresta de Araucária (Floresta Ombrófila Mista) e relíctos de vegetação xerofítica. A Floresta de Araucária sofre, como todos os Biomas brasileiros, um processo acentuado de fragmentação dada à utilização dos espaços em atividades agropecuárias e do avanço cada vez maior do entorno das cidades. Essa diminuição drástica na cobertura vegetal desse bioma indica-o como área de extrema importância biológica, ficando evidente sua prioridade em pesquisas que tratem da realização de inventários de suas espécies e do levantamento da variabilidade genética de espécies encontradas em tais áreas. Em 2002, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) criou um grupo de trabalho para propor medidas de preservação e recuperação desse ecossistema em Santa Catarina. Após um levantamento de onde estão e qual a situação dos remanescentes, a conclusão foi que a Floresta Ombrófila Mista está no fim e, se não for criada, imediatamente, uma série de unidades de preservação, corre-se um grande risco de perder esse ecossistema, uma vez que os raros remanescentes florestais nativos são de dimensões reduzidas, encontram-se isolados e com evidentes alterações estruturais. A principal recomendação do estudo foi criar um corredor ecológico ligando as áreas remanescentes de Santa Catarina e do Paraná, através de unidades de conservação de proteção integral, associadas com Áreas de Preservação Ambiental (APAs) e Áreas de Relevante Interesse Ecológico (ARIEs), onde as atividades econômicas são permitidas, mas devem seguir regras rigorosas. Assim, ainda em dezembro de 2002, quatro áreas no Paraná e três em Santa Catarina foram consideradas áreas prioritárias para criação de unidades de conservação: Água Doce, Abelardo Luz e Ponte Serrada, em Santa Catarina, e, no Paraná, Tumeiras do Oeste, Candói, Palmas e Guarapuava, a maior delas, com 120 mil hectares (fonte: Ministério do Meio Ambiente).

No caso da vegetação xerofítica, existe na América do Sul uma extensa área no eixo nordeste-sudoeste, incluindo a Caatinga, o Cerrado e o Chaco, designada

“diagonal seco”, e localizada entre as florestas tropicais úmidas Amazônica e da Mata Atlântica (Prado e Gibbs, 1993). Os domínios morfoclimáticos da Caatinga e do Chaco, juntamente com o litoral Caribenho da Colômbia e da Venezuela, apresentam alta densidade e diversidade de espécies de cactos (Hueck, 1972). Contudo, domínios adjacentes, incluindo as Florestas de Araucária, também contêm cactos em populações isoladas, principalmente em afloramentos rochosos e em formações com substratos arenosos. Estas populações de cactos são interpretadas como remanescentes da retração da vegetação xerofítica nos períodos interglaciais (Ab'Saber, 1977, 1992, 2000). De acordo com Ab'Saber (1977, 2000), a Caatinga e o Chaco se conectaram pelo menos 4 vezes durante o Quaternário devido as glaciações, períodos onde o clima era frio e seco. Já nos períodos interglaciais, o clima tornou-se quente e úmido, levando a retração das vegetações xerofíticas e a expansão das florestas tropicais. Como os cactos são bons indicadores de áreas razoavelmente secas, sua distribuição é alterada com mudanças climáticas. Atualmente, a distribuição descontínua e o tamanho dos fragmentos de vegetação xerofítica são resultados não apenas dos ciclos paleoclimáticos, como também da ação antrópica. Nesse contexto, é esperado que as espécies de *Drosophila* associadas a estes cactos tenham seguido as expansões e retrações das áreas secas do paleoambiente, e suas estruturas populacionais reflitam tais alterações.

Alguns estudos têm inferido a possibilidade de se utilizar drosofilídeos como bioindicadores da qualidade e da diversidade do ambiente. Esses animais têm capacidade de refletir mudanças ecológicas uma vez que espécies diferentes apresentam diferentes exigências com relação à qualidade do ambiente (Ferreira e Tidon, 2005; Mateus *et al.*, 2006a), e a maioria das espécies possui limitada capacidade de dispersão (Markow e Castrezana, 2000). Mais recentemente, o gênero *Drosophila* tem sido foco em estudos de Biodiversidade (van der Linde e Sevenster, 2002; Tidon, 2006; Torres e Madi-Ravazzi, 2006; de Toni *et al.*, 2007). Esta utilização tem sido baseada na grande diversidade, tanto morfológica quanto ecológica deste grupo de organismos. Neste sentido, esses insetos são apropriados para estudos que envolvem abordagens ecológicas, biogeográficas e evolutivas relacionadas a mudanças históricas e recentes.

Dentro do aspecto histórico, a espécie *Drosophila antonietae* é um bom modelo de estudo por estar associado às ilhas de vegetação xerofítica. Suas populações são encontradas em áreas de ocorrência do cacto *Cereus*

hildmaniannus nas regiões sul e sudeste do Brasil e ao norte da borda leste do chaco argentino (Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Monteiro (1997), através da análise da morfometria do edeago, observou baixa diferenciação entre as populações de *Drosophila antonietae*, sugerindo a existência de fluxo gênico entre elas, provavelmente devido ao fato delas ocorrerem ao longo dos cursos dos rios. Também foi observado que quanto maior a distância entre elas ao longo dos rios (distância ecológica), maior a divergência morfológica. O mesmo padrão foi observado para marcadores isoenzimáticos (Mateus e Sene, 2007). Análises de diferentes marcadores em *Drosophila antonietae* mostraram que as populações desta espécie constituem um grupo bem definido que pode ter sofrido a ação de eventos de vicariância e expansão de suas populações (Manfrin *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2003; Mateus e Sene, 2003; Manfrin e Sene, 2006; Mateus e Sene, 2007). O estudo de novas áreas de ocorrência desta espécie, e a comparação destes dados com os demais publicados na literatura, possibilitaria novas proposições sobre a dinâmica populacional e os processos evolutivos que possam ser responsáveis pelo padrão de similaridade encontrado nas populações desta espécie.

O desenvolvimento da biologia molecular nas últimas décadas possibilitou a mensuração da variabilidade genética em populações naturais diretamente do DNA dos organismos, o que, associado a outras informações, constitui uma importante ferramenta para a elucidação dos processos e mecanismos evolutivos geradores da diversidade biológica. Dentre estas ferramentas, o marcador microssatélite, descrito em 1987 (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989; Tautz, 1989) vem sendo amplamente empregado, principalmente devido a sua versatilidade de aplicação e resolução para diferentes questões biológicas, tais como, a avaliação do nível de diferenciação entre organismos, a genética e estruturação de populações, detecção de eventos ecológicos e evolutivos em populações naturais, correlação de comportamento de acasalamento com isolamento reprodutivo, avaliação de níveis de fluxo gênico, dispersão de sementes e, ainda, introgressão em populações naturais de bioindicadores (Hutchison e Templeton, 1999; Chambers e Mac Avoy, 2000; Achmann *et al.*, 2004; Franck *et al.*, 2004; Gee, 2004; Patten *et al.*, 2004; Dieringer *et al.*, 2005; Streiff *et al.*, 2005; Selkoe e Toonen, 2006; Kimberly *et al.*, 2006, como exemplos).

A razão para esta versatilidade de estudos está nas propriedades dos

microssatélites: é um marcador codominante, altamente polimórfico e distribuído amplamente pelo genoma eucarioto, preferencialmente nas regiões intergênicas, podendo, deste modo, ser considerado seletivamente neutro. Assim sendo, este marcador poderá auxiliar no entendimento da história evolutiva de *D. antonietae* através da análise genética e evolutiva de populações naturais desta espécie.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar a composição da fauna de drosofilídeos em uma área de Mata Atlântica de interior (Floresta Ombrófila Mista), a fim de obter subsídios para entender aspectos relacionados com o efeito da fragmentação deste bioma sobre a biodiversidade deste grupo de insetos. Além disso, pretende-se inferir aspectos sobre eventos históricos e ecológicos ocorridos em espécies cactofílicas do cluster *D. buzzatii*, o que pode levar a uma melhor compreensão sobre como ocorrem às especiações nas regiões tropicais e subtropicais, processo pelo qual a grande diversidade de fauna nestas regiões é gerada.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta dissertação, a pesquisa foi realizada a partir de duas frentes distintas, o que resultou em dois trabalhos, um com escopo ecológico, e o outro, genético. Cada um destes trabalhos apresenta metodologias peculiares. Portanto, as mesmas serão apresentadas apenas dentro de cada capítulo.

RESULTADOS

Os resultados estão organizados em dois capítulos, correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I:

“Diversidade alfa e beta da assembléia de drosofilídeos de uma área alterada do sul do Brasil”.

Capítulo II:

“Análise da diversidade genética em *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae) através de DNA microssatélite”.

CAPÍTULO I:

“Diversidade alfa e beta da assembléia de drosofilídeos de uma área alterada do sul do Brasil”

Deste capítulo será submetido um artigo para publicação na revista *Biodiversity and Conservation* (Qualis CAPES A2).

RESUMO

A diversidade de insetos encontrada na região neotropical é bastante significativa. Os drosofilídeos vêm se apresentando como um grupo de grande importância para estudos ecológicos na região neotropical, porém, são escassos os estudos ecológicos em Florestas Ombrófila Mista. Assim, o presente estudo teve como objetivos: ampliar o conhecimento sobre a composição de fauna de drosofilídeos em região de Mata Atlântica; analisar espacialmente a diversidade de drosofilídeos em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista do sul do Brasil; investigar a riqueza e diversidade temporal de espécies de drosofilídeos deste fragmento, e; inferir aspectos ecológicos sobre a composição faunística de áreas fragmentadas. Este trabalho foi realizado em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista em Guarapuava/PR (25° 28' 67" S, 51° 87' 62" O, 1.120 m de altitude). Foram identificadas 1.608 moscas, pertencentes a 3 subgêneros, 13 grupos e 32 espécies de *Drosophila*. Estas 32 espécies correspondem a 52% das já descritas para Matas de Araucária. Foi verificada a ocorrência de espécies dominantes em pequena escala, e o elevado número de espécies raras. Nossos resultados de diversidade beta, em estrutura vertical, não evidenciaram diferenças significativas na diversidade e abundância de indivíduos entre os estratos. Dentro da estrutura horizontal, houve uma diversidade significativamente indistinta, com similaridades entre alguns pontos. Temporalmente o inverno foi a estação com maiores índices de diferenciação, possivelmente devido ao frio rigoroso da região. Não foi possível diagnosticar preferência das espécies dentro do estrato vertical, assim como não houve um padrão de estratificação horizontal definido para espécies ou grupo de espécies. Isto pode ser resultante da ação de um processo de modificação devido à intensa ação antrópica. Assim, este trabalho apresentou uma grande contribuição para o entendimento da dinâmica das comunidades de drosofilídeos de áreas fragmentadas de Floresta Ombrófila Mista da região de Guarapuava, e pode servir de referência futura para projetos de conservação da biodiversidade deste bioma, que está em intenso processo de degradação.

Palavras chave: estrutura de comunidades, Drosophilidae, Floresta Ombrófila Mista, biodiversidade, conservação.

INTRODUÇÃO

A diversidade de espécies presente nas florestas neotropicais é única em relação à área geográfica por elas ocupada (Mayr, 1963; Prance, 1982). Estes ecossistemas neotropicais apresentam uma grande flexibilidade e alto potencial de sustentação a permanente capacidade evolutiva desse vasto complexo de espécies, populações e comunidades (Dumont, 2005).

A biodiversidade neotropical, resultado de milhões de anos de evolução contínua e interações de espécies, populações, comunidades e ecossistemas (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2008), assim como os processos que geram um grau tão alto de diversidade, ainda são pouco conhecidos. Porém, a região neotropical vem apresentando taxas de perda e destruição de habitats entre as mais altas do mundo (Dobson, 2005).

Inserida na região neotropical, a Mata Atlântica abriga, aproximadamente, 7% de todas as espécies do Planeta. Com tamanha riqueza biológica e altos níveis de ameaça, esse bioma foi considerado como um dos 25 hotspots mundiais, com prioridade na conservação da biodiversidade (MMA, 2002). Segundo Margules e Pressey (2000), uma das primeiras medidas recomendadas para um planejamento conservacionista é a compilação dos dados da diversidade.

A diversidade biológica compreendida em multi-escala apresenta graus de estrutura espacial nas comunidades, sendo estes definidos em termos de diversidade alfa, beta e gama. A diversidade alfa foi identificada como a diversidade dentro do habitat. A diversidade gama representa a diversidade total de uma região, incluindo vários habitats. E a diversidade beta foi utilizada para descrever as diferenças entre as diversidades alfa e gama (MacArthur, 1965; Whittaker, 1972). A diversidade, em seus graus (alfa, beta e gama), somada à variação ao longo do tempo, constituem fontes importantes para uma melhor compreensão dos processos que a regulam (Schluter e Ricklefs, 1993).

Diversas informações essenciais para o estudo de populações naturais têm sido obtidas através dos padrões espaciais de distribuição dos organismos, expressos em dimensão tanto vertical quanto horizontal (Tidon-Sklorz e Sene, 1987). Smith (1973) evidenciou que há várias camadas ou estratos de plantas em um ecossistema florestal, cada uma caracterizada por um grupo de espécies, resultando em estratificação de microclima e, assim, os recursos alimentares e a

comunidades faunísticas também se apresentam de maneira característica em cada estrato. Nesta dimensão estratificada é possível observar uma tendência do ambiente físico de dossel, em florestas fechadas, apresentar uma maior heterogeneidade vertical e relativa homogeneidade horizontal. Nas florestas com brechas e regiões de borda o ambiente físico apresenta um padrão tridimensional mais complexo (Young e Mitchell, 1994). Desta forma, a heterogeneidade e complexidade ambiental são fatores importantes para determinação da composição da comunidade, sendo a variação espacial, em relação à abundância de espécies, fundamental para a compreensão da dinâmica de comunidades (Wala *et al.*, 2004).

Além das variações estruturais, as populações em si são entidades em estado de mudança e a sazonalidade de cada espécie reflete um longo e contínuo processo de adaptações às condições climáticas, sendo que as variáveis sazonais podem ser críticas na flutuação populacional (Brncic *et al.*, 1985).

No estudo “Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias para Conservação”, realizado no Brasil pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2002), na região Sul as Florestas de Araucária (Floresta Ombrófila Mista) são as áreas mais atingidas e estão seriamente ameaçadas. Este bioma está inserido no domínio Mata Atlântica e constitui uma das principais fitofisionomias da Região Sul do Brasil, contendo uma das mais altas biodiversidades do planeta (Myers *et al.*, 2000). Anteriormente ao intenso processo exploratório ocorrido nas últimas décadas, a Floresta de Araucária ocupava cerca de 30% do território brasileiro, porém, encontra-se restrita a menos de 3% da área original (Leite e Klein, 1990). No Estado do Paraná, a área de cobertura não soma 1% do florestamento original (Castela e Britez, 2004). O desmatamento gerou fragmentação da mata antes contínua, resultando em ilhas de mata isoladas por áreas cobertas por pasto e culturas de interesse econômico de outros tipos. A fragmentação florestal tem sido evidenciada como uma das maiores ameaças a biodiversidade, pois causa desbalanço nas comunidades, gerando desde redução no número de indivíduos até perda de espécies (Lovejoy, 1980; Turner, 1996; Harrison e Bruna, 1999; Chapin III *et al.*, 2000). Abundância e riqueza específica, assim como a distribuição e interação entre as espécies, também são alteradas em resposta a fragmentação e remoção de habitats (Murcia, 1995; Tocher *et al.*, 1997; Alford e Richards, 1999).

A região de Guarapuava é classificada como de extrema importância biológica no que se refere à comunidade de invertebrados. Os estudos com este

grupo de organismos foram realizados de forma a avaliar apenas quantitativamente em termos de área remanescente dos biomas. A diversidade biológica em si não foi mensurada nestas regiões, apresentando um escasso conhecimento dos invertebrados do bioma Mata Atlântica, sendo este imprescindível para ações conservacionistas efetivas (MMA, 2002).

A diversidade de insetos encontradas na região neotropical é bastante significativa (Valente e Araujo, 1991). Dentre os insetos, a família Drosophilidae apresenta 3.800 espécies distribuídas em 65 gêneros até agora descritos (Bächli, 2010). Constitui um táxon amplamente estudado nos mais diversos níveis do conhecimento, principalmente com relação às moscas do gênero *Drosophila* (Tidon, 2006), que apresentam uma grande quantidade de informações disponíveis (Grumbling e Strelets, 2006; Bachli, 2010). Desta forma, os drosofilídeos vêm se apresentando como um grupo de grande importância para estudos ecológicos na região neotropical (Dobzhansky e Pavan, 1950; Pavan, 1959; Sene *et al.*, 1980; Bizzo e Sene, 1982; Vilela *et al.*, 1983; Powell, 1997; Tidon, 2006; da Mata *et al.*, 2008). Porém, são escassos os estudos ecológicos em Florestas Ombrófila Mista (Saavedra *et al.*, 1995).

Assim, o presente estudo teve por objetivo: (1) ampliar o conhecimento sobre a composição de fauna de drosofilídeos em região de Mata Atlântica; (2) analisar espacialmente a diversidade de drosofilídeos em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista do sul do Brasil; (3) investigar a riqueza e diversidade temporal de espécies de drosofilídeos deste fragmento, e; (4) inferir aspectos ecológicos sobre a composição faunística de áreas fragmentadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As coletas foram realizadas em uma fazenda na região de Guarapuava, Paraná - Brasil, denominada Fazenda Rio do Poço (25° 28' 67" S, 51° 87' 62" O, 1.120 m de altitude). A região apresenta clima subtropical úmido com invernos caracterizados por períodos com geadas intensas. A temperatura média anual é de 16,8°C, com média máxima 36°C e mínima de 6,8°C. Esta fazenda apresenta afloramentos rochosos e fragmentos de Floresta Ombrófila Mista, localizada dentro da bacia do Rio Iguaçu, no vale do Rio do Poço. O fragmento estudado tem uma borda mais antiga, na divisa da fazenda, e outra mais recente, ao lado da área de cultivo de grãos (Figura 1). A região é composta por 48 ha, com Floresta Ombrófila Mista permeada por áreas de região xerofítica e cultura de grãos.

Coleta das Amostras

As coletas ocorreram durante as quatro estações do ano (Inverno: Agosto/2004; Primavera: Novembro/2004; Verão: Fevereiro/2005; e Outono: Abril/2005). Foram utilizadas 10 armadilhas fechadas (tipo *robot*), distribuídas em cinco pontos equidistantes 10 m, perfazendo uma transecção no sentido da borda recente à borda antiga, passando pelo interior da mata, os pontos foram denominados de P1 na borda recente seguindo respectivamente até o P5 na borda antiga. As armadilhas foram instaladas a 1,5 m e também a 6,5 m do solo, que corresponde ao limite do dossel nos fragmentos desta região.

As armadilhas contendo as iscas de banana com laranja e fermento biológico, permaneceram durante três dias na mata conforme metodologia de Sene *et al.* (1981). Posteriormente, os adultos, coletados diretamente das armadilhas, foram transferidos para tubos de excursão contendo meio de cultura, sendo que estes foram etiquetados, acondicionados e transportados até o laboratório. Todos os indivíduos coletados foram identificados até o nível específico utilizando chaves de identificação existentes na literatura (Freire-Maia e Pavan, 1949; Frota-Pessoa, 1954).

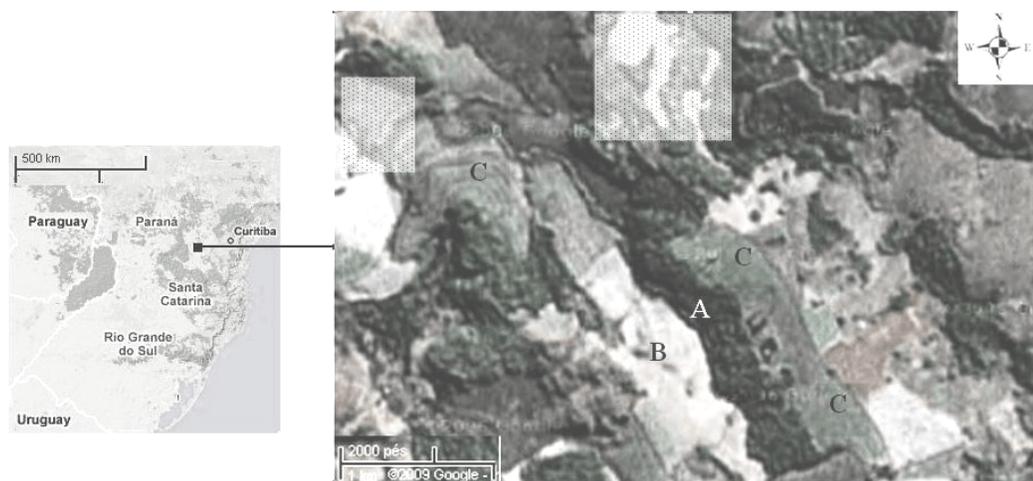


Figura 1. Localização da área de estudo. Em A, o fragmento florestal estudado; B, borda antiga do fragmento; letra C área de cultivo e a porção hachurada consta de áreas xerofíticas.

Análise estatística

Diversidade Gama (γ): A abundância total (A) das espécies foi calculada através da contagem do número de indivíduos por espécie e ranqueada da maior para a menor abundância, conforme descrito por Whittaker (1965). Foram avaliadas também, conforme Palma (1975), a frequências de ocorrência (FO) das espécies e suas dominâncias (D), conforme segue:

$$FO = \frac{NCi}{NA} \times 100$$

onde: NCi = número de coletas com a espécie i ; NA = número de amostragens.

$$D = \frac{Ai}{A} \times 100$$

onde: Ai = abundância da espécie i ; A = abundância total.

De acordo com os resultados para FO, as espécies puderam ser classificadas como primárias (FO > 50%), secundárias (50% > FO > 25%), e acessórias (FO < 25%). Para Dominância (D), as espécies puderam ser classificadas como dominantes – d (D > 5%), acessórias – c (5% > D > 2%), e acidentais – a (D < 2%).

Para cálculo da diversidade regional (γ) da região do Rio do Poço, foi utilizado o índice de Shannon-Winner (H'). O índice de Jackknife (Heltsh e Forrester, 1983) foi usado para estimar a riqueza de espécies para esta região.

Diversidade Alfa (α): a abundância total (A) e a frequência de ocorrência (FO) das espécies também foram analisadas ao longo do tempo, isto é, nas diferentes estações (dimensão temporal). E também no espaço, considerando duas alturas na mata: 1,5 e 6,5 m. E ainda entre os 5 pontos da transecção (dimensão espacial).

Utilizando-se o índice de Shannon-Winner (H'), foi calculada a diversidade alfa para cada estação e para cada estrato, e com os índices de Margalef (D_{Mg}) e de Pielou (J'), as riquezas e as equitabilidades locais, de acordo com o descrito por Ludwig e Reynolds (1988). Posteriormente, foi aplicado um Teste-t para verificar se houve diferença entre os valores de Shannon-Wiener (Magurran, 2004).

Diversidade Beta (β): o índice de Jaccard foi utilizado para medir a similaridade entre as estações com relação à presença e ausência de espécies (Ludwig e Reynolds, 1988). As mudanças na composição das espécies entre as estações, e entre os pontos no espaço, foram analisadas a partir dos dados de abundância das espécies, utilizando o coeficiente de distância de Bray-Curtis e o método de agrupamento UPGMA (Ludwig e Reynolds, 1988).

O coeficiente cofenético de correlação foi calculado para determinar o nível de adequação dos dendogramas obtidos. As matrizes de similaridade foram comparadas através do teste de Mantel, utilizando o programa NTSYS. O programa NCSS 2007 foi utilizado para realizar a análise de correspondência, visando avaliar a similaridade na distribuição das espécies entre as estações, e se houve preferência de alguma espécie por alguma das estações.

RESULTADOS

Diversidade gama

Foram identificadas 1.608 moscas, pertencentes a 3 subgêneros, 13 grupos e 32 espécies de *Drosophila* (Tabela 1). A abundância total de indivíduos (por espécie) pode ser observada na Figura 2. A espécie mais abundante e com maior frequência de ocorrência foi *Drosophila simulans*, seguida por *D. montium*, *D. polymorpha* e *D. mediotriata*. Essas espécies também foram dominantes. As espécies consideradas acessórias foram *D. maculifrons*, *D. mercatorum*, *D. neocardini* e *D. bromelioides*. As outras 24 espécies (76% do total) foram acidentais (Tabela 1).

Das 32 espécies, sete foram consideradas primárias (21%) pela frequência de ocorrência (Tabela 1), sendo elas dominantes e acessórias, com exceção de *Drosophila cardini*, *D. guaru* e *D. antonietae*.

A diversidade regional (γ) do Rio do Poço foi de $H' = 0,962$ e a riqueza estimada (pelo método Jackknife) foi de 39,8 (limite de confiança de 95%).

Tabela 1. Abundância absoluta das espécies (A) na Fazenda do Rio do Poço/PR. D = índice de dominância com respectivas classificações: a = espécies acidentais; c = espécies acessórias; d = espécies dominantes. FO = frequência de ocorrência (em %) com relação ao total.

Espécie	A	D	FO	Espécie	A	D	FO
Subgênero <i>Dorsilopha</i>				Continuação			
<i>D. busckii</i>	18	a	50	<i>D. immigrans</i>	6	a	25
Subgênero <i>Drosophila</i>				- Grupo <i>D. repleta</i>			
- Grupo <i>D. annulimana</i>				<i>D. antonietae</i>	23	a	75
<i>D. annulimana</i>	2	a	25	<i>D. hydei</i>	3	a	25
<i>D. ararana</i>	1	a	12.5	<i>D. fascioloide</i>	3	a	25
- Grupo <i>D. bromeliae</i>				<i>D. mercatorum</i>	58	c	87.5
<i>D. bromelioide</i>	48	c	37.5	<i>D. senei</i>	12	a	25
- Grupo <i>D. canalinea</i>				<i>D. onca</i>	1	a	13
<i>D. canalinea</i>	5	a	38	- Grupo <i>D. tripunctata</i>			
- Grupo <i>D. cardini</i>				<i>D. mediotriata</i>	96	d	100
<i>D. cardini</i>	19	a	75	<i>D. mediopunctata</i>	18	a	25
<i>D. neocardini</i>	55	c	62.5	<i>D. prosimilis</i>	3	a	25
<i>D. polimorpha</i>	183	d	100	- Grupo <i>D. caponei</i>			
- Grupo <i>D. coffeata</i>				<i>D. caponei</i>	3	a	13
<i>D. fumosa</i>	13	a	50	Subgênero <i>Sophophora</i>			
- Grupo <i>D. dreyfusi</i>				- Grupo <i>D. melanogaster</i>			
<i>D. camargoi</i>	26	a	50	<i>D. ananassae</i>	3	a	25
- Grupo <i>D. guarani</i>				<i>D. simulans</i>	484	d	100
<i>D. guaraja</i>	5	a	13	<i>D. montium</i>	429	d	75
<i>D. guarani</i>	7	a	37.5	- Grupo <i>D. saltans</i>			
<i>D. maculifrons</i>	59	c	50	<i>D. prosaltans</i>	10	a	37.5
<i>D. ornatifrons</i>	2	a	25	<i>D. sturtevanti</i>	3	a	13
<i>D. guaru</i>	8	a	62.5	- Grupo <i>D. willistoni</i>			
- Grupo <i>D. immigrans</i>				<i>D. willistoni</i>	2	a	13

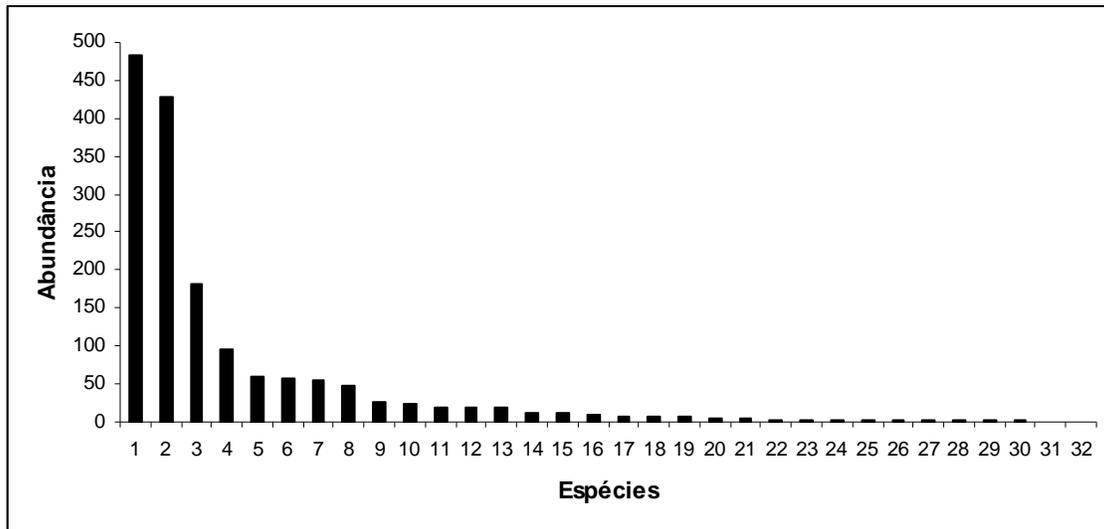


Figura 2. Plotagem da abundância absoluta (A) de espécies de drosofilídeos. 1. *Drosophila simulans*; 2. *D. montium*, 3. *D. polymorpha*, 4. *D. mediotriata*, 5. *D. maculifrons*, 6. *D. mercatorum*, 7. *D. neocardini*, 8. *D. bromelioides*, 9. *D. camargoi*, 10. *D. antonietae*, 11. *D. cardini*, 12. *D. mediopunctata*, 13. *D. buscki*, 14. *D. prosaltans*, 15. *D. fumosa*, 16. *D. senei*, 17. *D. guaru*, 18. *D. guarani*, 19. *D. imigrans*, 20. *D. guaraja*, 21. *D. canalinea*, 22. *D. hydei*, 23. *D. fascioloide*, 24. *D. prosimilis*, 25. *D. caponei*, 26. *D. ananassae*, 27. *D. sturtevantii*, 28. *D. annulimana*, 29. *D. willistoni*, 30. *D. ornatifrons*, 31. *D. ararana*, 32. *D. onca*.

Diversidade alfa (α)

Dimensão espacial: a frequência de ocorrência (FO) das espécies nos dois estratos (1,5 m e 6,5 m) pode ser observada na Figura 3. A maior riqueza ($D_{Mg} = 10,09$) foi à 6,5 m, e a menor à 1,5 m ($D_{Mg} = 8,86$). A equitabilidade a 1,5 m foi de 0,592 e a 6,5 m de 0,561. Não houve diferença significativa entre as diversidades encontradas nos dois estratos (ANOVA: $F = 0,047$, $df = 4,77$, $p = 0,836$) e dentro de cada estrato (Teste de Tukey: 1,5 m = 0,833 e 6,5 m = 0,307). A diversidade (H') foi estatisticamente semelhante entre as duas alturas, com $H'_{1,5} = 0,848$ e $H'_{6,5} = 0,828$.

Analisando cada ponto de coleta separadamente, das 32 espécies registradas, 9 foram comuns a todos eles. A abundância total de cada ponto pode ser observada na Tabela 2, assim como o índice de diversidade e riqueza. Obteve-se equitabilidades (J') semelhantes nos três pontos centrais da mata, e o menor índice encontrado foi para a borda antiga da mata (ponto 5), o qual apresentou, juntamente com o ponto 2, as maiores índices de riqueza de espécies (Tabela 2). A menor riqueza ocorreu no ponto 4. Os índices de diversidade foram estatisticamente semelhantes nos cinco pontos amostrados (Tabela 2).

Dimensão temporal: do total de espécies amostradas, quatro espécies ocorreram nas quatro estações do ano; *Drosophila simulans* (FO = 100%), *D. polimorpha* (FO = 100%), *D. mercatorum* (FO = 88%) e *D. antonietae* (FO = 75%). As espécies *Drosophila ananassae* (FO = 25%), *D. ararana* (FO = 13%), *D. caponei* (FO = 13%) e *D. sturtevantii* (FO = 13%) ocorreram apenas no verão, período de maior abundância de indivíduos, com riqueza de 4,97 (Tabela 2). No inverno ocorreram apenas 10 espécies ($D_{Mg} = 4,17$) e o segundo maior número de indivíduos (433). A riqueza de espécies foi maior na primavera ($D_{Mg} = 8,28$), sendo registradas 19 espécies, e a abundância a mais baixa (149 indivíduos). *Drosophila prosimilis* (FO = 25%) foi capturada somente nesta estação. No outono foram capturados 366 indivíduos, distribuídos em 18 espécies ($D_{Mg} = 6,63$). *Drosophila mediopunctata* (FO = 25%) foi capturada apenas neste período.

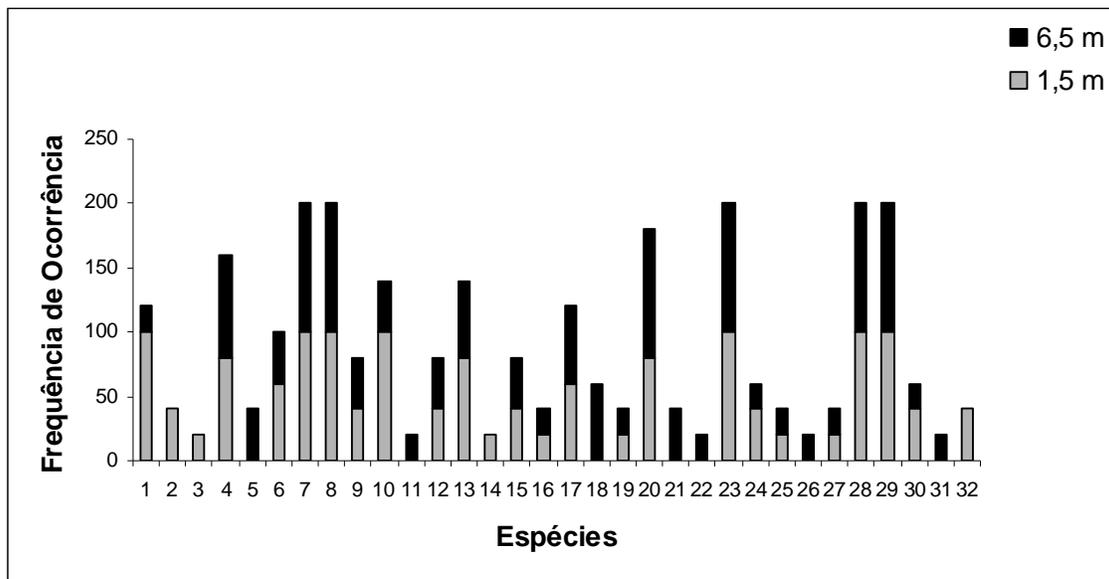


Figura 3. Frequência de ocorrência (FO) das espécies em dimensão espacial estratos verticais nas duas diferentes alturas (1,5m e 6,5m). 1. *D. busckii*, 2. *D. annulimana*, 3. *D. ararana* 4. *D. bromelioide*, 5. *D. canalinea*, 6. *D. cardini*, 7. *D. neocardini*, 8. *D. polymorpha*, 9. *D. fumosa*, 10. *D. camargoi*, 11. *D. guaraja*, 12. *D. guarani*, 13. *D. maculifrons* 14. *D. ornatifrons*, 15. *D. guaru*, 16. *D. imigrans*, 17. *D. antonietae*, 18. *D. hydei*, 19. *D. fascioloide*, 20. *D. mercatorum* 21. *D. senei*, 22. *D. onca*, 23. *D. mediotriata*, 24. *D. mediopunctata*, 25. *D. prosimilis*, 26. *D. caponei*, 27. *D. ananassae*, 28. *D. simulans*, 29. *D. montium*, 30. *D. prosaltans*, 31. *D. sturtevantii*, 32. *D. willistoni*.

Tabela 2. Diversidade alfa espacial. Valores de abundancia total (A), diversidade (H'), riqueza (D_{Mg}) e equitabilidade (J') para cada um dos 5 pontos amostrados (P1, P2, P3, P4 e P5) e também para as 4 estações (inverno, primavera, verão e outono).

	A	H'	D_{Mg}	J
P1	306	0,648	8,05	0,497
P2	293	0,695	8,92	0,517
P3	335	0,698	6,73	0,568
P4	298	0,631	5,66	0,549
P5	373	0,617	8,94	0,452
Inverno	433	0,372	4,17	0,344
Primavera	149	0,948	8,28	0,741
Verão	660	0,762	4,97	0,545
Outono	366	0,868	6,63	0,692

A diversidade (H') entre as estações pode ser observada na Tabela 2. As maiores riqueza e equitabilidade ocorreram na primavera, e as menores no inverno. Uma oscilação na diversidade foi observada entre as estações, porém ela não foi significativa (ANOVA: $F= 8,109$, $df = 2,164$ e $p = 0,099$). Diferença estatisticamente significativa entre a diversidade das estações foi detectada apenas entre a primavera e o inverno (Teste de Tukey: $p = 0,03998$; Tabela 3).

Diversidade Beta (β)

Dimensão espacial (Figura 4): o dendograma de dissimilaridade, obtido utilizando o coeficiente de Bray-Curtis, demonstrou que o ponto 5 (borda antiga) apresenta-se isolado dos pontos 1 e 2 (borda recente do fragmento) e 3 e 4 (parte central do fragmento), que mostraram-se mais próximos entre si ($r = 0,85$).

Dimensão temporal (Figura 5): a maior similaridade encontrada com relação à abundância, através do coeficiente de Bray-Curtis, ocorreu entre a primavera e o outono. Por outro lado, o inverno foi à estação que apresentou a maior dissimilaridade ($r = 0,80$). Estes resultados foram corroborados pela análise de correspondência de espécies entre as estações (Figura 6) e pelo índice de Jaccard (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Segundo Nascimento e Laurance (2006), os efeitos de borda e de área são os mais importantes fatores que levam às mudanças em comunidades fragmentadas, sendo que quanto menor o tamanho do fragmento florestal maior é a razão borda/área, o que torna os fragmentos mais sujeitos aos efeitos de borda (Zuidema *et al.*, 2006). Para dimensionar os efeitos de fragmentação, trabalhos com insetos têm sido feitos considerando regiões de floresta não perturbadas e fragmentos florestais com maior grau de perturbação (Brown e Kodric-Brown, 1977; DeVries *et al.*, 1999; Tanabe, 2002; Tidon, 2006; de Toni *et al.*, 2007; da Mata *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008).

Tabela 3. Teste de Tukey comparando a diversidade das estações do ano. *p < 0,05.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Inverno	0	0.03998*	0.1298	0.06423
Primavera	6.171	0	0.5553	0.9265
Verão	4.178	1.993	0	0.8485
Outono	5.321	0.8509	1.142	0

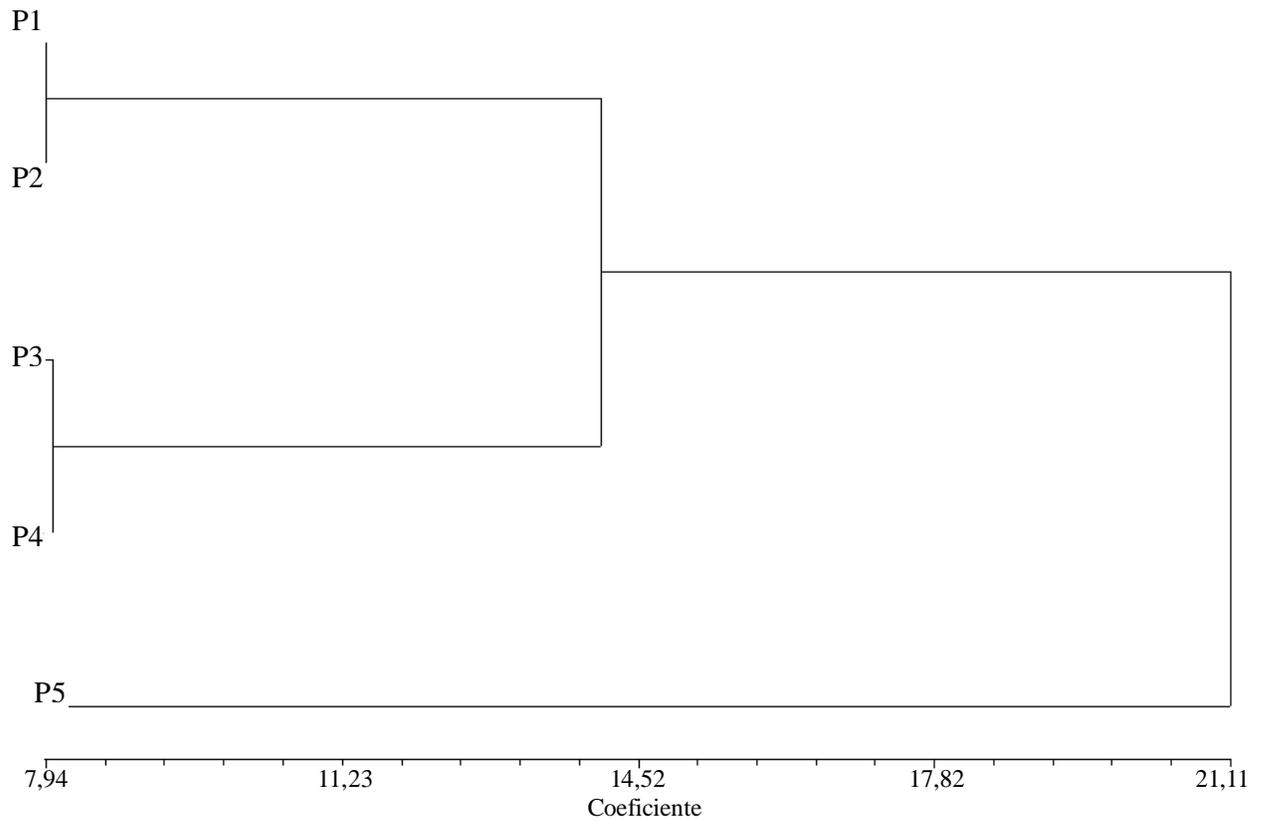


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade de Bray-Curtis entre os pontos, desde o Ponto 1 (P1), na borda recente, até o ponto 5 (P5), na borda mais antiga do fragmento, passando pelo interior do fragmento.

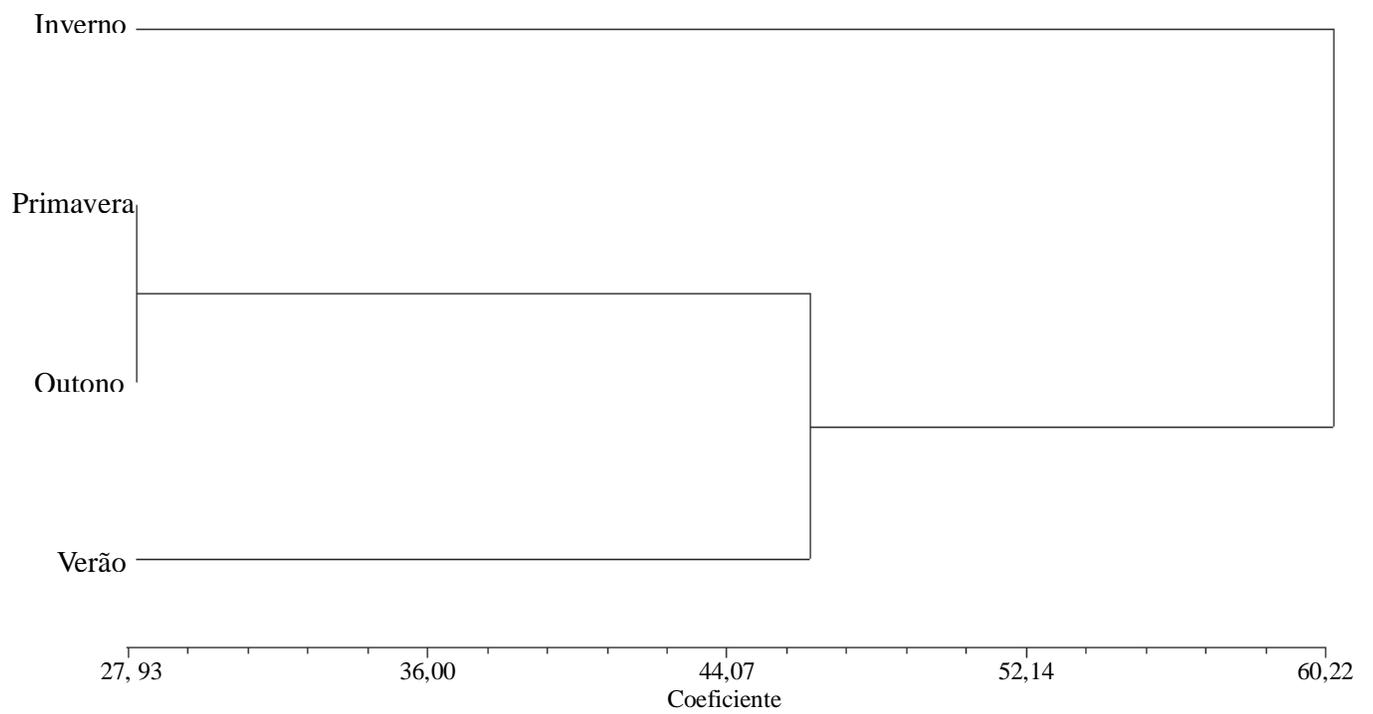


Figura 5. Dendrograma de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as estações.

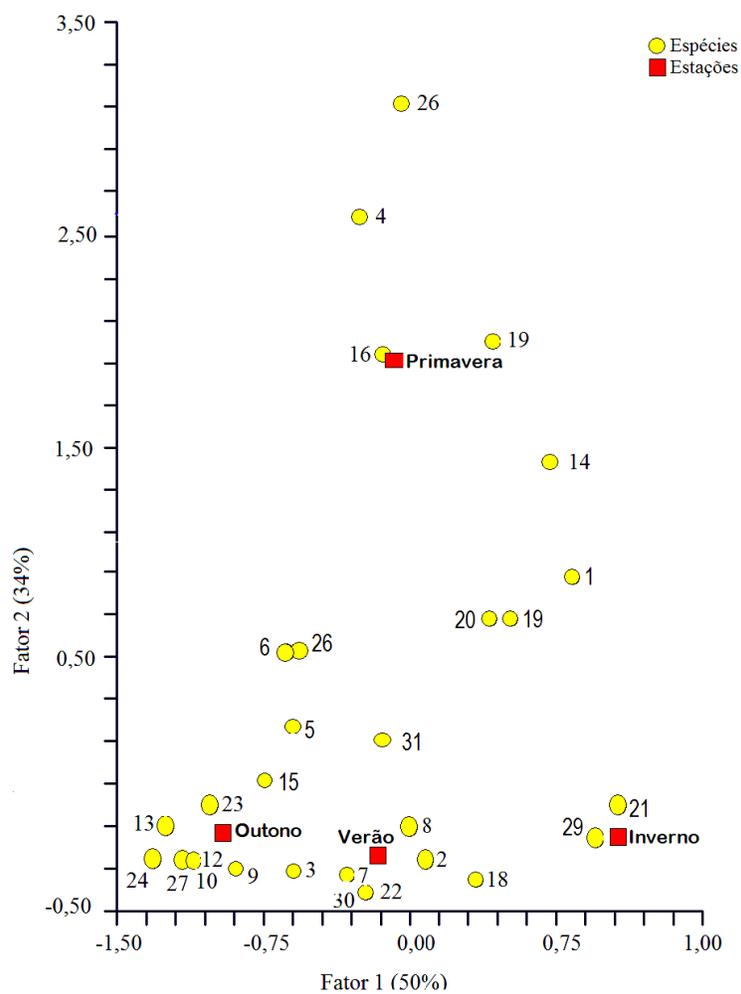


Figura 6. Análise de correspondência de espécies para as 4 estações.

Tabela 4. Índice de Similaridade, Jaccard (J), entre as estações do ano.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Inverno	****			
Primavera	0.409	****		
Verão	0.276	0.419	****	
Outono	0.304	0.480	0.433	****

Considerando a região em estudo, suas peculiaridades climáticas e geográficas, não restaram regiões onde a mata tenha permanecido sem algum grau de perturbação por uso agrícola e outras atividades antrópicas, realçando a necessidade de estudos que possibilitem estratégias de conservação. Desta forma, o levantamento de drosofilídeos possibilitou uma avaliação do fragmento de acordo com padrões já descritos.

As 32 espécies amostradas correspondem a 52% das espécies já descrita para Matas de Araucária, segundo levantamento feito por Chaves e Tidon (2008). Nove espécies não detectadas anteriormente em Matas de Araucária (Chaves e Tidon, 2008) foram encontradas neste trabalho: *Drosophila canalinea*, *D. caponei*, *D. annulimana*, *D. camargoi*, *D. guaru*, *D. senei*, *D. hydei*, *D. prosimilis*; *D. neocardini*. Dentre estas, *Drosophila neocardini* apresentou-se como uma das 4 espécies dominantes, sendo esta espécie observada por Vilela *et al.* (2002) como tendo ocorrência no estado do Paraná, porém em outro domínio florestal.

A verificação de ocorrência de espécies dominantes em pequena escala, e o elevado número de espécies raras, estão de acordo com dados da região levantados por Morato e Campos (2000), Buschini *et al.* (2006), Loyola e Martins (2006) e Buschini e Woiski (2008) em estudos com abelhas, por Torres e Madi-Ravazzi (2006) e Cavasini (2009) para drosofilídeos de Floresta Ombrófila Mista, e por Lucky *et al.* (2002) para coleópteros. Mateus *et al.* (2006a), analisando a composição da comunidade de drosofilídeos presente em vegetações xerofíticas, obtiveram, pelo índice de constância de espécies, uma menor porcentagem para espécies acidentais, e maior para dominantes. Índices distintos dos nossos foram utilizados para tais análises, porém em relação à avaliação de abundância, os dados de Mateus *et al.* (2006a) possuem a mesma proporção de poucas espécies abundantes. Nossos dados apresentam duas espécies do grupo *D. repleta* como primárias em frequência de ocorrência (Tabela 1), provavelmente devido a proximidade de uma área xerofítica ao local de coleta. Possivelmente, as diferenças encontradas com os dados de Mateus *et al.* (2006a) ocorram devido ao distinto domínio florestal estudado, pois pela presença de espécies cactófilas, como do grupo *D. repleta*, as comunidades xerofíticas possivelmente apresentam a ocorrência mais homogênea de espécies compatíveis com esse domínio.

A ocorrência de riqueza de espécies abaixo do esperado pode ser reflexo de vários fatores que influenciam este índice, entre eles o esforço amostral. Outro fator

importante é a questão da complexidade estrutural da vegetação. Em formigas da região tropical, por exemplo, a riqueza de espécies é menor em ambientes homogêneos, com baixa complexidade estrutural, quando comparada a de ambientes heterogêneos, com alta complexidade vegetacional (Matos *et al.*, 1994). Young e Mitchell (1994) evidenciaram uma tendência do ambiente de dossel em florestas fechadas apresentar uma maior heterogeneidade vertical e relativa homogeneidade horizontal, e florestas com brechas e regiões de borda apresentar um padrão tridimensional mais complexo, como seria o caso da área estudada no presente trabalho. Para regiões temperadas, estudos com drosofilídeos evidenciaram esse mesmo tipo de distribuição vertical, com ocorrência preferencial no dossel, com algumas espécies restritas a esse ambiente (Shorrocks, 1975; Lumme *et al.*, 1979; Beppu, 1985; Toda, 1986; Tanabe, 2002). Em regiões tropicais e subtropicais, a estratificação vertical de drosofilídeos tem sido pouco estudada (Tidon, 2006). Dados de Tidon-Sklorz e Sene (1992) para o Brasil verificaram que as populações de *Drosophila* distribuem-se em agregados, que variam em tamanho e localização ao longo do ano. Walla (2004), em estudos com borboletas em região tropical, juntamente com DeVries e Walla (2001), encontraram que nem perturbações em pequena escala, nem as flutuações temporais, influenciaram significativamente a abundância dos indivíduos em estrutura vertical bem definida.

Nossos resultados de diversidade beta, em estrutura vertical, não evidenciaram diferenças significativas na diversidade e abundância de indivíduos entre os estratos. Foi possível verificar uma oscilação da frequência de ocorrência (Figura 3), com apenas espécies acidentais ocorrendo peculiarmente em algum dos estratos. Walla (2004), em estudos com borboletas para região tropical em ambientes tanto alterados quanto conservados, também não encontrou estratificação vertical significativa em estudo comparativo de ambientes com amostras amplas em tempo e espaço e amostragens de curto período e pequeno tamanho amostral. De acordo com Tidon (2006), a estratificação de ocorrência de drosofilídeos é decorrente dos diversos microhabitats gerados desde o subbosque até o dossel da floresta, porém nossa área em estudo, assim como os fragmentos subjacentes a região, não ultrapassa 10m de altura, com clareiras evidentes, além de ampla borda.

Nossos dados ainda constataram que, dentro da estrutura horizontal, houve uma diversidade significativamente indistinta, com similaridades entre alguns pontos

(Figura 4). Associação entre os dois pontos da borda recente (ponto 1 e ponto 2) e os dois pontos do centro da mata (ponto 3 e ponto 4) foi observada. Estas associações não foram claras quando se observam somente os índices de riqueza e diversidade. Porém, a ocorrência exclusiva, mas de forma acidental, das espécies *Drosophila cardini* e *D. canalinea* nestes pontos da borda recente do fragmento pode ter levado a tal associação. *Drosophila cardini* é rara em ambientes de floresta e comum em ambientes abertos (Tidon-Sklorz e Sene, 1999; Medeiros, 2000) e possui baixo índice de vulnerabilidade (Chaves e Tidon, 2008), e *D. canalinea* é endêmica de regiões neotropicais e rara em iscas de banana (Dobzhabsky e Pavan, 1950). Walla (2004) observou, em estudos de estratificação espacial de borboletas, que uma maior abundância de espécies comuns a dossel ocorre no sub-bosque quando em regiões de borda florestal, bem como que espécies raras são mais frequentes no dossel do que em ambientes não perturbados.

A partir da abundância de espécies, a borda antiga (ponto 5) mostrou-se não associada a nenhum outro ponto. Nesta borda houve a ocorrência acidental das espécies *Drosophila guaraja* e *D. caponei*. Gottschalk *et al.* (2007) descreveram a primeira como uma espécie de ocorrência desde ambientes não urbanos até urbanizados, e Döge *et al.* (2008) colocam que esta espécie apresenta ocorrência associada a limite de fragmento de mata. *Drosophila caponei* é descrita por Döge *et al.* (2008) como ocorrendo em região de Mata Atlântica secundária, com reduzida interferência antrópica. Nesta borda antiga, uma das maiores riquezas e maior abundância absoluta de espécies foram verificadas. Estes resultados podem ser devido ao fato de que a perturbação dos ambientes tem efeito positivo sobre a riqueza de espécies (Connell, 1978).

Nosso estudo não possibilitou diagnosticar preferências de estrato vertical, assim como não apresentou um padrão de estratificação horizontal definido para espécies ou grupo de espécies. Isto pode ser resultante de vários fatores, entre eles um efeito de Massa (Shmida e Wilson, 1985), que se refere à chegada de espécies inadequadas para um habitat, onde não é possível uma auto-manutenção, a partir de habitats adequados adjacentes, que apresentam espécies migratórias ou não permanentes, resultando na não estruturação evidente. Ou ainda, pode ser resultante da recente fragmentação, estando à área em processo de modificação devido à intensa ação antrópica.

Os resultados relativos a ocorrências das espécies no fragmento estudado

indicam que a área em questão sob a ação do segundo fator citado acima. Foram encontradas, em ocorrência acidental, espécies avaliadas como indicadoras de matas não perturbadas (da Mata *et al.*, 2008), tais como, *Drosophila ornatifrons* (da Mata *et al.*, 2008) e *D. willistoni* (Saavedra *et al.*, 1995; da Mata *et al.*, 2008). Além disso, esta última foi detectada por Gottschalk *et al.* (2007) como abundante em ambiente de intensa ação antrópica em região de Mata Atlântica no estado de Santa Catarina.

As espécies apontadas como presentes em áreas de perturbação intermediária, tais como *Drosophila hydei* (da Mata *et al.*, 2008), também ocorreram de forma acidental. Já as espécies dominantes encontradas estão associadas a ambientes modificados e sob intensa ação antrópica, tais como *Drosophila simulans* e *D. montium*. *Drosophila simulans* foi introduzida na região neotropical e é freqüente em áreas abertas (Perondini *et al.*, 1979). Outra espécie, também dominante, foi *Drosophila polymorpha*, que pode ser encontrada em diversos tipos de ambiente, sendo relativamente abundante nos diferentes domínios morfoclimáticos, exceto nas caatingas, e está associada à presença humana (Sene *et al.*, 1980). A única espécie de mata que ocorreu como dominante foi *Drosophila mediotriata*.

Das espécies acessórias, *Drosophila maculifrons* tem sido registrada em matas, cerrados e dunas paulistas (Sene *et al.*, 1980; Bizzo e Sene, 1982), e é uma espécie amplamente distribuída no Brasil. *Drosophila mercatorum* é abundante em ambientes naturais e urbanos, especialmente em áreas abertas (Sene *et al.*, 1981; Vilela *et al.*, 1983).

Uma espécie característica de ambientes florestais, segundo Pavan (1959) e Sene *et al.* (1980), encontrada em quantidade considerável, foi *D. neocardini*, uma espécie amplamente distribuída no Brasil, e que ocorreu em todos os pontos, em maior quantidade na borda antiga da mata e menor na borda recente. Além disso, ela ocorreu principalmente nas coletas realizadas no verão e no outono não ocorrendo na primavera.

A região onde a área estudada se encontra apresenta invernos rigorosos e extensos. A análise sazonal demonstrou que a menor riqueza de espécies foi encontrada no inverno. Porém, esta estação apresentou a segunda maior abundância de indivíduos, com ampla ocorrência da espécie dominante *Drosophila simulans*. De acordo com modelo proposto por Sevenster e van Alphen (1993), a

escassez de recursos promove diminuição da abundância de espécies de curto ciclo de vida, e aumento de abundância de espécies de ciclo longo. O alto número de indivíduos nesta estação, com menor número de espécies, pode ser, portanto, resultante de uma menor competição interespecífica numa fase onde recursos alimentares são menos abundantes. A relação dos períodos de floração e frutificação de várias espécies vegetais fornece a maior parte dos sítios para a oviposição e alimentação da comunidade (Brncic *et al.*, 1985), permitindo a expansão do número dos indivíduos que permaneceram na adversidade ambiental. Existem ainda fatores biológicos de relações de predação, competição e densidade populacional, entre outros, que podem ter importantes conseqüências sobre o número de espécies em determinados ambientes, tanto a nível temporal quanto espacial (Begon *et al.*, 1996).

No verão foi verificada a maior abundância, diferindo dos dados de Döge *et al.* (2008), cujo pico de abundância foi no outono na região de Mata Atlântica no estado de Santa Catarina. Porém, foi similar ao estudo de Torres e Madi-Ravazzi (2006) no estado de São Paulo. Nesta estação, houve a ocorrência exclusiva da espécie acidental *Drosophila caponei*, encontrado por Bizzo e Sene (1982) utilizando como sítio de criação flores de *Costus spiralis* (Roscoe – Zingiberaceae), planta que apesar de perene, não tolera frio e geadas. Este fato possivelmente afeta a ocorrência da espécie associada ao período de floração. Outra espécie acidental exclusiva do verão foi *Drosophila sturtevantii*, que também demonstra aumento da população no verão, de acordo com Tidon-Sklorz e Sene (1992), e é uma espécie com ocorrência amplamente influenciada pela precipitação (Torres e Madi-Ravazzi, 2006).

Assim como observado por Tidon-Sklorz e Sene (1987) no estado de São Paulo, a coleta de primavera apresentou a menor abundância, porém a maior riqueza e equitabilidade de espécies, em contraste com o inverno. No outono o grupo *D. tripunctata* foi o melhor representado, dado também observado por Cavasini (2009) em duas outras áreas de Floresta Ombrófila Mista da região de Guarapuava, o Parque Municipal das Araucárias e a Fazenda Brandalize. O grupo *D. guarani* também foi o melhor representado no outono. Dentro deste grupo, a espécie *Drosophila guaru* foi uma das mais frequentes em ocorrência para todas as estações. Ambos os grupos são descritos como de ocorrência preferencial de períodos de inverno (Martins, 1987; Medeiros e Klaczko, 2004).

Com relação à diversidade beta, as coletas de primavera e outono, nos três índices aplicados, apresentaram maior correlação e similaridade entre si, sendo a estação de inverno a mais dissimilar e distante (Figura 5). No gráfico de análise de correspondência (Figura 6), pode ser observado o compartilhamento de espécies entre outono e primavera. O padrão de isolamento do inverno possivelmente reflete a variação climática que a região apresenta, porém a dissimilaridade entre estações próximas, como geralmente é observado, necessita ser melhor avaliada.

O índice de diversidade revelou estratificação sazonal significativa apenas entre a primavera e o inverno. Os dados de Martins (1987) e Tidon-Sklorz e Sene (1992), em estudos de sazonalidade com drosofilídeos de área tropical, também não indicaram padrões consistentes sobre a relação da abundância das moscas com fatores climáticos. Tidon (2006) evidenciou que, na região tropical, a disponibilidade de sítios de alimentação e reprodução tem maior pressão sobre a flutuação das populações de drosofilídeos. Dentro da dinâmica sazonal, como inferido por Tidon (2006) em estudos de área de savana, pode ocorrer de alguns drosofilídeos migrarem, no caso da vegetação de savana, para as florestas na estação seca, uma vez que as condições climáticas devem então ser menos estressantes. Já no caso do fragmento em estudo, o frio intenso deve ser o fator que poderia gerar processos migratórios.

Buschini *et al.* (2006), num estudo com vespas na região de Guarapuava, observaram que a espécie *Trypoxylon lactitarse*, geralmente observada mais em áreas abertas em outras regiões do Brasil, é encontrada fundando ninhos nas áreas florestais da região durante a primavera e verão, e se move para o pastos e pântanos durante o outono. Buschini (2007) discute que esta mudança de comportamento está mais relacionada à luminosidade no interior da floresta do que com a disponibilidade de alimentos. Porém, no caso dos drosofilídeos, em que muitas espécies se alimentam de microorganismos, especialmente leveduras, presentes em frutos, partes vegetais e fungos em decomposição, e utilizam frutos principalmente como sítio de reprodução, os fatores e a possibilidade de migração devem ser ainda investigados. Sevenster e van Alphen (1996) apontam ainda a questão do tamanho do fragmento dentro deste aspecto, pois quanto menor o tamanho da área, maior é a competição entre as espécies que coexistem.

Desta forma, o estudo de uma área em recente processo de fragmentação possibilitou apresentar a ocorrência de espécies para Floresta Ombrófila Mista que

não haviam sido detectadas anteriormente, além de espécies características de áreas florestadas e de áreas alteradas (ou abertas), contribuindo para aumentar o conhecimento sobre a fauna de drosofilídeos deste bioma. Estes dados evidenciam a necessidade de medidas de conservação e na ampliação dos estudos que tornem possível elucidar os processos geradores de indistinta diversidade alfa, tanto no nível espacial quanto temporal. A análise da diversidade beta possibilitou entender alguns aspectos ecológicos da variação temporal e caracterizar outros aspectos da variação espacial da área fragmentada, evidenciando um ambiente heterogêneo, podendo servir de referência futura para projetos de conservação da biodiversidade deste bioma, que está em intenso processo de degradação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Fundação Araucária pela bolsa de Mestrado. A CAPES, FINEP, CNPq e UNICENTRO pelo auxílio. A Profa. Dr. Maria Luisa Tunes Buschini pelas sugestões e correções. Aos colegas de laboratório pelo auxílio nas coletas e identificação das moscas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

CAPÍTULO II:

“Análise da diversidade genética em *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae) através de DNA microssatélite”

Deste capítulo um trabalho será submetido para publicação na revista *Molecular Ecology* (Qualis CAPES A1).

RESUMO

Drosophila antonietae é uma espécie cactofílica, pertencente ao cluster *buzzatii*, e pode ser encontrada ao longo da bacia dos rios Paraná-Uruguai. O estudo, através de um marcador molecular seletivamente neutro, de populações localizadas em áreas dentro da porção média da bacia dos rios Paraná-Uruguai (Análise Regional), até o presente trabalho não amostradas, possibilitou a análise comparativa de populações de *Drosophila antonietae* do alto, médio e baixo da bacia, verificando a variabilidade genética através de *loci* microssatélites destas populações recém descobertas. Baixa diferenciação genética entre as populações foi observada na Análise Regional, e não houve correlação significativa entre as distâncias genéticas e físicas na porção média da bacia, não corroborando com a proposição de similaridade gradual ao longo de toda a distribuição geográfica da espécie. Além disso, a detecção de um possível alelo nulo para um *locus* de microssatélite indica um estado incipiente de diferenciação populacional na espécie *D. antonietae*. Na Análise Macrogeográfica, foi encontrada, entre as 14 populações analisadas, uma diferenciação genética moderada e índices de distâncias genéticas representativos desta diferenciação moderada. Estes dados estão de acordo com a similaridade genética das populações de *Drosophila antonietae*, porém novamente não corroboram que está similaridade seja contínua ao longo da bacia dos Rios Paraná-Uruguai, pois a porção média apresentou maior distância, assim como a maior variabilidade genética. Não houve correlação significativa entre as distâncias físicas e genéticas no alto, médio e baixo, indicando que não há correlação entre os mesmos. Pode ser levantada a hipótese de que a homogeneidade e alto índice de polimorfismo nas populações naturais de *D. antonietae* sejam decorrentes de uma manutenção histórica de polimorfismos compartilhados. Por outro lado, os nossos dados parecem indicar que está havendo uma diversificação incipiente, que pode ser em resposta adaptativa regional, ou simplesmente por eventos estocásticos.

Palavras chave: *loci* de microssatélite, bacia dos rios Paraná-Uruguai, *Drosophila antonietae*, variabilidade genética.

INTRODUÇÃO

Esta pesquisa faz parte de um projeto maior, que busca elucidar e melhor compreender os processos evolutivos geradores e mantenedores da grande diversidade da fauna em regiões neotropicais. Para isso, a busca de informações sobre a sistemática, composição genética, distribuição geográfica, ecologia e comportamento de drosófilas de ocorrência nas formações vegetais da América do Sul vêm sendo realizada, e este organismo tem se mostrado um importante modelo biológico para estudos evolutivos.

A compreensão dos padrões e processos evolutivos responsáveis pela história evolutiva de um grupo pode envolver estudos ecológicos e genéticos, sendo o acesso à variabilidade genética dos organismos de fundamental importância, pois a maioria das teorias evolutivas baseia-se na observação de mudanças fenotípicas nas populações, resultantes de alterações sobre a variabilidade genética pré-existente. A variabilidade genética pode ser estudada através da observação de polimorfismos, ocorrência de duas ou mais formas geneticamente distintas, e é esse polimorfismo que pode ser produto para a ação da seleção natural, favorecendo as variantes vantajosas e, por consequência, adaptativas (Strickberger, 2000).

Segundo a Teoria Neutralista da Evolução Molecular proposta por Kimura (1968) e King e Jukes (1969), a maioria dos polimorfismos seria devido a mutações neutras ou aproximadamente neutras e que não seriam mantidos permanentemente na população, sendo o polimorfismo uma fase transitória da evolução molecular (Kimura e Ohta, 1971). A proposta neutralista é que a maioria dos polimorfismos e suas flutuações no tempo e espaço são resultado de deriva genética nas frequências alélicas geração após geração nas populações finitas. Por outro lado, os selecionistas consideram a teoria neutralista deficiente, argumentando que os polimorfismos são respostas adaptativas à complexidade dos ambientes físico e biótico (Mueller *et al.*, 1985). Esta discussão, com auge nas décadas de 70 e 80, ainda continua, porém atualmente predomina a idéia que ambas as teorias não são excludentes, sendo provavelmente a variação natural resultante da interação entre os processos de seleção natural e deriva genética (Schlötterer *et al.*, 1997).

O desenvolvimento da biologia molecular nas últimas décadas possibilitou a mensuração da variabilidade genética em populações naturais diretamente do DNA dos organismos, o que, associado a outras informações, constitui uma importante

ferramenta para a elucidação dos processos e mecanismos evolutivos geradores da diversidade biológica. Dentre estas ferramentas, o marcador microssatélite, descrito em 1987 (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989; Tautz, 1989) vem sendo amplamente empregado, principalmente devido a sua versatilidade de aplicação e resolução para diferentes questões biológicas (Chambers e Mac Avoy, 2000; Selkoe e Toonen, 2006; Kimberly *et al.*, 2006).

O termo microssatélite foi utilizado em analogia à satélite, que são bandas de seqüências muito longas de DNA repetitivo descobertas nos anos 60, cujas unidades de repetição apresentam de 15 a 400 pares de bases. Posteriormente, em meados da década de 80, foram encontradas regiões de DNA repetitivo mais curtas, denominadas minissatélite ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*), que apresentam repetições de 15 a 80 bases. Já as regiões de microssatélites são repetições *in tandem* de unidades ainda mais curtas, não mais que seis bases (Hancock, 1999), embora a definição do número de nucleotídeos que compõe a sequência repetitiva, ou seja, o mote do *locus*, varie entre os autores (Armour *et al.*, 1999; Schlötterer, 1998; Goldstein e Pollock, 1997). Diversos outros termos são encontrados na literatura para os microssatélites: STR (*Short Tandem Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ou SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*).

Chambers e MacAvoy (2000) sugerem que deve ser considerado microssatélite as unidades de repetições *in tandem* com no mínimo oito nucleotídeos repetidos, pois, segundo Rose e Falush (1998), unidades de repetição mono, di e tetranucleotídeos que apresentam oito ou menos nucleotídeos no comprimento total podem ocorrer a uma frequência ao redor daquela que seria esperada se eles fossem encontrados aleatoriamente no genoma. As unidades com menos de oito nucleotídeos são denominadas de regiões de simplicidade crítica e podem ser considerados segmentos de protomicrossatélites.

A diversidade de alelos dos *loci* de microssatélites o torna um excelente marcador para análises de variabilidade genética e aplicação em estudos evolutivos (Bartholomei-Santos *et al.*, 2003). Essa diversidade é resultado da instabilidade (variação) no número de repetições dos motes dos microssatélites (Eisen, 1999), dessa forma, os diferentes alelos são caracterizados pelos seus tamanhos, os quais são determinados pelo número de repetições (Estoup e Cornuet, 1999).

Dois mecanismos são propostos para explicar as altas taxas de instabilidade

dos microssatélites: *crossing-over* desigual, que é recombinação entre cromossomos homólogos não alinhados corretamente devido a presença das unidades de repetição (Jeffreys *et al.*, 1994); e o mecanismo de DNA *slippage* durante a replicação (Levinson e Gutman, 1987). Este último modelo, DNA *slippage*, é o mais aceito como causa da alta variação no número de repetições dos motes de microssatélites. O DNA *slippage* pode acontecer devido a um “deslizamento” da fita de DNA durante a replicação, tendo como consequência a formação de *loops*. Esse deslizamento é resultado da perda de pareamento entre as cadeias, contudo, devido a presença de unidades repetidas nos *loci* de microssatélites, o pareamento com a fita complementar pode continuar após o *loop*. Esse erro pode resultar em deleção de uma ou mais unidades de repetição se o *loop* ocorrer na fita molde, ou a adição dessas unidades caso o deslizamento tenha ocorrido na fita recém-sintetizada (Li e Graur, 1991; Ellegren, 2000).

O sistema de reparo do DNA pode corrigir o mecanismo *slippage*, tanto pela ação de uma exonuclease que degrade o *loop* formado na fita recém sintetizada, quanto por reconhecimento e reparo de mal-pareamento (*mismatch repair*) na fita molde. Dessa forma, a fixação da instabilidade nos *loci* de microssatélites depende do balanço entre a geração de erros durante a replicação, e o reparo destes pela exonuclease e/ou pelo reparo de mal-pareamento (Eisen, 1999).

Eventos mutacionais nas regiões flangeadoras de alelos ou *loci* de microssatélite podem impedir a ligação dos oligonucleotídeos nas reações de amplificação por PCR, resultando em alelos nulos (Callan *et al.*, 1993; Chambers e MacAvoy, 2000; Ballard *et al.*, 2005). Por exemplo, Callan *et al.* (1993) e Van Treuren (1998), descreveram alelos nulos em análises de *pedigrees* humanos e de uma espécie de ave, respectivamente, e sugerem que esses alelos podem, com o tempo, se fixar na população. Em insetos, Machado *et al.* (2010), através de análise de *pedigree* de linhagem de *Drosophila antonietae*, verificaram a ocorrência de alelos nulos para um dos sete *loci* de microssatélites analisados.

Estudos recentes têm considerado também o papel dos transposons na origem de microssatélites e de alelos nulos. Megléczy *et al.* (2007) encontraram associação entre microssatélites e elementos transponíveis apontando a alta taxa de mutação desses elementos na elevação da ocorrência de alelos nulos em estudos populacionais. Esta associação de microssatélites e elementos

transponíveis já havia sido evidenciada em dípteros (Fagerberg *et al.*, 2001; Wilder e Hollocher, 2001) e em seis espécies de *Drosophila* (Megléczy *et al.*, 2007), sendo necessário considerar este fator na descrição de *loci* de microsatélites.

Os mecanismos abordados como geradores de instabilidade dos *loci* de microsatélites resultam na elevação das taxas de mutação dos mesmos, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração. Em humanos é sugerida uma taxa de 10^{-3} eventos por *locus* por geração (Weber e Wong, 1993), sendo a taxa média de mutações para microsatélites no cromossomo Y estimada em torno de 2×10^{-3} por *locus* por geração (Heyer *et al.*, 1997). Em *Drosophila*, as taxas de mutação parecem ser relativamente baixas. Schug *et al.* (1997) encontraram uma taxa média de mutação de $6,3 \times 10^{-6}$ por geração em linhagens de *D. melanogaster*, e justificaram que essa taxa de mutação comparativamente mais baixa seja primariamente em função de repetições de curto comprimento no genoma de *D. melanogaster*.

Outra peculiaridade dos microsatélites é a neutralidade, pois eles são encontrados preferencialmente em regiões não codificantes (Dokholyan *et al.*, 2000; Katti *et al.*, 2001). Contudo, algumas funções são sugeridas para o marcador, como organização da cromatina, regulação da transcrição de um gene e recombinação (Kashi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002). Algumas doenças humanas são caracterizadas por alterações em regiões de microsatélite, como por exemplo, a síndrome do X frágil, a qual é causada pela elevada expansão no número de repetições na região final não-codificante do gene. Estas funções poderiam levar as sequências de microsatélites a sofrerem efeito de seleção, porém Slatkin e Barton (1989) argumentam que análises robustas para estudos populacionais são capazes de amenizar os traços de seleção. Outro fator que poderia interferir na neutralidade das regiões de microsatélite seria a ligação destes *loci* a outros sobre o efeito de seleção (Slatkin, 1995), resultando no que é chamado de efeito carona.

O fato dos microsatélites serem poderosos marcadores moleculares para estudos de estrutura populacional e conservação da diversidade (Bowcock *et al.*, 1994) faz com que a lista das espécies das quais eles já foram caracterizados seja grande e também muito diversificada (Amós, 1999). Abrange, por exemplo, filogenia de vespas (Zhu *et al.*, 2000), evolução em fungos *Neurospora* (Dettman e Taylor, 2004), variabilidade genética em plantas (Stafstrom e Ingram, 2004; Paun e Horandl, 2006), moluscos (Angers *et al.*, 2000), peixes (Gomez-Uchida e Banks, 2005),

mamíferos (Asano *et al.*, 1997; Ellegran, 2000). No gênero *Drosophila*, estudos com microssatélites foram realizados em *D. melanogaster* (Goldstein e Clark, 1995; Bachtrog *et al.*, 1999), *D. simulans* (Hutter *et al.*, 1998; Irvin *et al.*, 1998), *D. pseudoobscura* e *D. persimilis* (Noor *et al.*, 2000), moscas do grupo *D. tripunctata* (Laborda *et al.*, 2009), e no *cluster buzzatii* foram estudadas *D. buzzatii*, (Frydenberg *et al.*, 2002), *D. antonietae* (Machado *et al.*, 2003) e *D. gouveai* (Moraes e Sene, 2007).

Desta forma, este marcador molecular vem sendo amplamente utilizado em estudos de populações naturais (Moritz e Hillis 1996; Chakraborty e Kimmel, 1999; Francisco *et al.*, 2006). Para análise da estrutura populacional e fluxo gênico nas populações de *Drosophila antonietae*, Machado *et al.* (2003) indicam como ideal o uso de DNA microssatélite devido à sua alta variabilidade, além de ser considerado seletivamente neutro, amplamente distribuído nos genomas eucariotos, codominante e hipervariável (Strassmann *et al.*, 1996).

Objeto de estudo

A família Drosophilidae possui ampla distribuição geográfica e ocorrência nas mais diversas situações ecológicas. Pode ser encontrada em praticamente todas as partes do mundo, com aproximadamente 3.800 espécies distribuídas em 78 gêneros até agora descritos (Bächli, 2010). A família Drosophilidae constitui um táxon amplamente estudado nos mais diversos níveis do conhecimento, principalmente as moscas do gênero *Drosophila* (Tidon, 2006), no qual quase 60% das espécies estão alocadas (Bächli, 1998).

O grupo *Drosophila repleta* apresenta 100 espécies descritas, sendo o segundo maior grupo dentro do subgênero *Drosophila* (Bachli, 2010). Este grupo ocupa diferentes habitats, com espécies endêmicas e outras cosmopolitas. Uma característica importante do grupo é que quase metade das espécies são cactofílicas, ou seja, as larvas se desenvolvem em cladódios em decomposição de diferentes espécies de cactos neotropicais (Heed, 1982; Pereira *et al.*, 1983; Wassermam, 1992). Esta adaptação tem permitido ao grupo ocupar zonas áridas e desertos do novo mundo (Ruiz e Fontdevila, 1981).

O grupo *Drosophila repleta* é composto por seis subgrupos: *D. mulleri*, *D.*

fasciola, *D. hydei*, *D. mercatorum*, *D. repleta* e *D. inca* (Vilela, 1983; Rafael e Arcos, 1989). O subgrupo *D. mulleri* é dividido em cinco complexos de espécies: *D. mulleri*, *D. meridiana*, *D. anceps*, *D. eremophila* e *D. buzzatii*. Este último possui três clusters: *D. buzzatii*, *D. stalker* e *D. martensis* (Ruiz e Wasserman, 1993). O cluster *D. buzzatii* é um grupo monofilético atualmente composto por sete espécies endêmicas da América do Sul: *Drosophila buzzatii* (Patterson e Wheeler, 1942), *D. serido* (Vilela e Sene, 1977), *D. seriema* (Tidon-Sklorz e Sene, 1995), *D. gouveai* (Tidon-Sklorz e Sene, 2001), *D. borborema* (Vilela e Sene, 1977), *D. koepferae* (Fontdevila *et al.*, 1988) e *D. antonietae* (Tidon-Sklorz e Sene, 2001). A distribuição geográfica das espécies deste *cluster* pode ser observada na Figura 1.

O caráter diagnóstico das espécies do cluster *D. buzzatii* é o edeago, o órgão copulador do macho, sendo que a diferenciação das espécies *Drosophila serido*, *D. gouveai*, *D. seriema*, *D. antonietae* e *D. koepferae* pode ser realizada apenas através de análises morfométricas. Devido a essa semelhança da morfologia do edeago, inicialmente essas espécies eram consideradas morfotipos (A à E, respectivamente) de *D. serido*. *Drosophila buzzatii* apresenta morfologia do edeago bastante distinta das demais espécies do *cluster*, assim foi sugerida ancestralidade comum entre os morfotipos A à E de *D. serido* e *D. Borborema* (Tidon-Sklorz e Sene, 1995; Monteiro, 1997) e estas espécies foram agrupadas por Ruiz *et al.* (2000) no subcluster *D. serido*. Além da diferenciação das espécies do cluster *D. buzzatii* pela morfologia do edeago, uma análise anterior dos cromossomos politênicos também já revelava inversões paracêntricas no cromossomo II características de algumas espécies (Tosi e Sene, 1989). Manfrin e Sene (2006) sugerem que a diversificação histórica das espécies deste *cluster* provavelmente ocorreu através de eventos vicariantes que definiram áreas centrais para cada espécie.

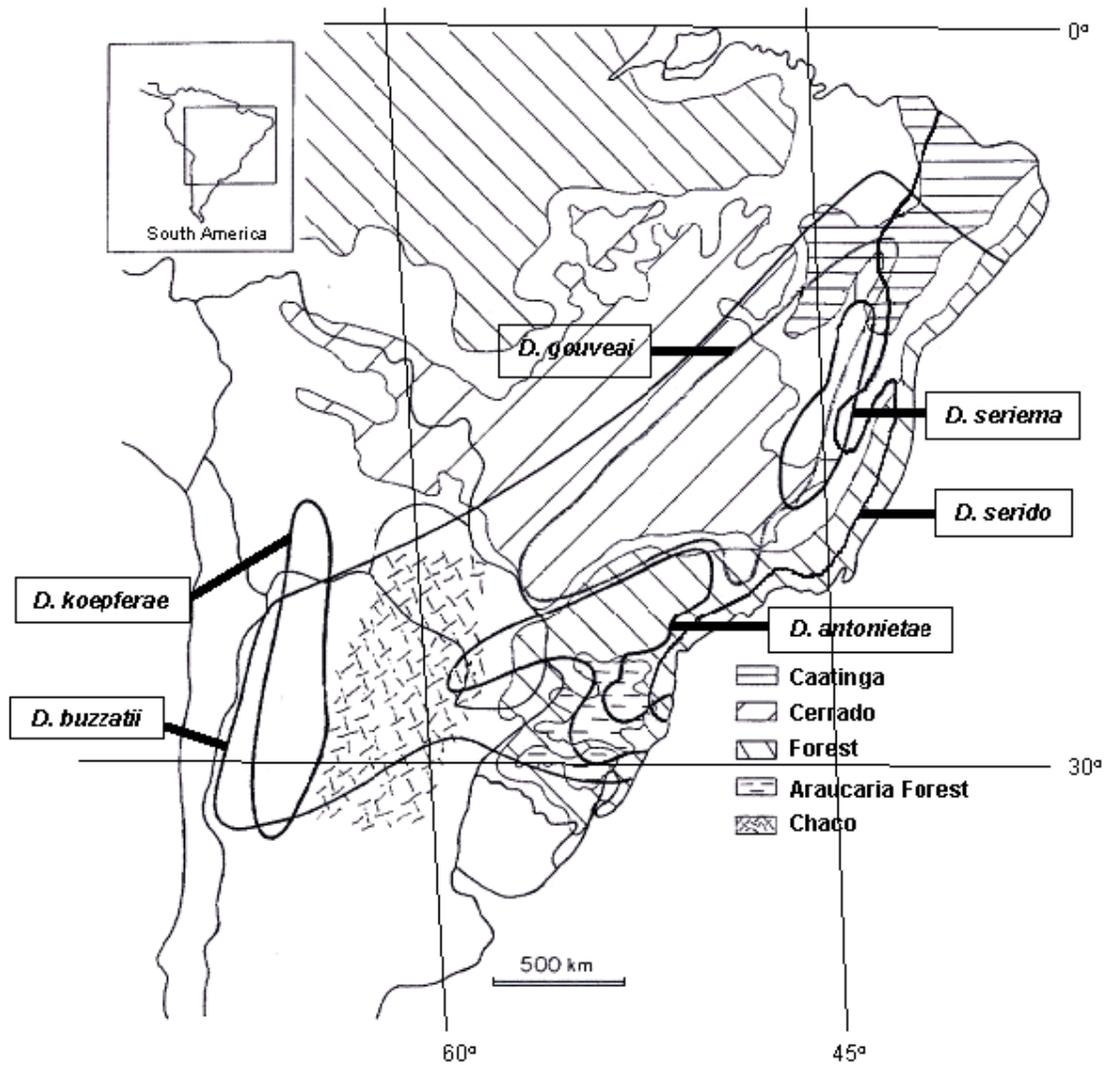


Figura 1. Localização geográfica das espécies pertencentes ao cluster *D. buzzatii*. Retirado de Mateus *et al.* (2006b).

As espécies do cluster *D. buzzatii*, assim como grande parte das espécies do grupo *D. repleta*, são cactofílicas e, devido a esta especificidade ecológica, populações de drosófilas cactófilas podem ter acompanhado as expansões e retrações das áreas xerofíticas, causadas por mudanças cíclicas paleoclimáticas. A origem do padrão atual de distribuição geográfica das espécies do cluster *D. buzzatii* é bastante discutido (Manfrin e Sene, 2006), pode ter se originado no Período Terciário (Beven *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1990) ou ser resultado dos ciclos climáticos frio/seco e quente/úmido do Quaternário (Bigarella *et al.*, 1975; Ab'Saber, 2000). Contudo, mais recentemente, tem sido aceito que a distribuição geográfica destas espécies é consequência não apenas do último ciclo de glaciação, mas também de ciclos anteriores, no Período Terciário (Manfrin *et al.*, 2001).

Drosophila serido morfotipo "D" (Silva e Sene, 1991) foi descrita por Tidon-Sklorz e Sene (2001) como *Drosophila antonietae*, em referência a pesquisadora Maria Antonieta Milani de Moraes. As populações de *D. antonietae* são encontradas em áreas de ocorrência do cacto *Cereus hildmaniannus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil e ao Norte da borda Leste do Chaco Argentino. Esta espécie possui inversão cromossômica fixa $2x^7$ e padrão característico de inversões polimórficas (Ruiz *et al.*, 2000). A inversão $2x^7$ de *D. antonietae* é compartilhada com *D. serido*, espécie que ocorre do nordeste do Brasil, a leste da Cadeia do Espinhaço, e ao longo da costa Atlântica do nordeste até o estado do Rio Grande do Sul.

Com relação à placa metafásica, *Drosophila antonietae* apresenta o mesmo tipo ao longo de toda sua distribuição geográfica, tipo V (Baimai *et al.*, 1983). Esta homogeneidade não é observada em outras espécies do cluster. *Drosophila serido*, por exemplo, é polimórfica para os cromossomos metafásicos (tipo I no nordeste e na maioria das populações do litoral, tipo III em Arraial do Cabo/RJ, e tipo IV em Peruíbe/SP) (Baimai *et al.*, 1983). A espécie *D. koepferae* também apresenta diferenciação populacional em relação à placa metafásica tipo VI, ao longo de sua distribuição entre Argentina e Bolívia, e ainda estas populações apresentam considerável diferenciação genética isoenzimática (Fontdevila *et al.*, 1988).

Da mesma forma que as inversões cromossômicas e placa metafásica de *Drosophila antonietae*, o tipo morfológico de edeago D não apresenta discriminação entre as populações (Monteiro e Sene, 1995). O que ocorre é apenas uma maior divergência morfológica quanto maior à distância entre elas ao longo dos rios (Monteiro, 1997). Este padrão de similaridade entre as populações de *D. antonietae*

com relação à morfometria do edeago também não é observado nas outras espécies do *cluster*. *Drosophila gouveai*, por exemplo, de ocorrência na parte oeste da caatinga e nas regiões centro-sudeste do Brasil até o pantanal sul-matogrossense, tipo morfológico B de adeago, apresenta discriminação entre suas populações, sugerindo isolamento entre elas (Monteiro e Sene, 1995). Estudos utilizando outros marcadores para esta mesma espécie, morfologia da asa e a variação de frequências alélicas de *loci* microsátélites, apontaram uma possível fragmentação separando as populações de *D. gouveai* em três grupos: um grupo no norte, outro na região oeste e o terceiro abrangendo as populações do sul da distribuição da espécie (Moraes *et al.*, 2004; Moraes e Sene, 2007).

Estudos realizados com diferentes marcadores em populações naturais de *Drosophila antonietae* (Monteiro e Sene, 1995; Monteiro, 1997; Machado *et al.*, 2003; Mateus e Sene, 2007; Machado *et al.*, 2010) tem indicado homogeneidade entre as populações analisadas. Mateus e Sene (2007) e Machado *et al.* (2010), utilizando polimorfismo isoenzimático e DNA microsatélite respectivamente, observaram diferenciação genética moderada entre as populações de *D. antonietae*. Mateus e Sene (2007) propõem fluxo gênico histórico e seleção estabilizadora para os *loci* de isoenzimas, não descartando a hipótese de manutenção de polimorfismo ancestral também sugerida por Machado *et al.* (2010) como possível explicação para a similaridade encontrada.

A filogenia do cluster *D. buzzatii* proposta por Manfrin *et al.* (2001) e de Brito *et al.* (2002), através de haplótipo de DNA mitocondrial, indicou certa diferenciação geográfica entre as populações de *Drosophila antonietae*, separando populações do alto da bacia do rio Paraná da parte baixa desta bacia. Estas análises de mtDNA sugerem uma divisão em dois grupos: o primeiro ao norte da distribuição da espécie, e o segundo ao sul, ao longo da costa do estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porém, segundo Manfrin e Sene (2006), a região intermediária a esses dois grupos ainda não foi analisada, não sendo possível discriminar entre um possível evento de fragmentação entre as duas regiões ou um gradiente em decorrência de fluxo gênico histórico.

As inferências sobre eventos históricos e ecológicos ocorridos nas espécies deste *cluster* levam a melhor compreensão sobre como ocorrem às especiações em regiões tropicais e subtropicais, processo pelo qual grande diversidade de fauna nestas regiões é gerada. Estudos intra-específicos de determinação de estrutura

genética e frequência de polimorfismo compreendem um fator importante para comparação e determinação de filogenia de espécies relacionadas (Marinkovic *et al.*, 1978). Estudos intra-específicos foram realizados em *Drosophila antonietae* por Monteiro (1997) e Mateus e Sene (2003, 2007), porém, fazendo uso de marcadores genéticos que podem estar sobre efeito de seleção natural, além de outros estudos que não contemplaram a porção média da distribuição de *D. antonietae*. Assim sendo, um marcador considerado seletivamente neutro e hipervariável, como os *loci* de microssatélites, poderão auxiliar no entendimento da história evolutiva de *D. antonietae*. Desta forma, é de fato relevante a análise genética e evolutiva de populações naturais desta espécie de ocorrência na região do curso médio da bacia do rio Paraná-Uruguai, ainda não amostrados, em contraste com a porção alta e baixa, utilizando de um marcador molecular com alto poder de resolução como é o DNA microssatélite.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Caracterizar populações da espécie *Drosophila antonietae* através de *loci* de microssatélites em áreas do curso médio da bacia dos rios Paraná-Uruguai, dentro do contexto da história evolutiva desta espécie, ampliando o conhecimento da estrutura populacional e da variabilidade genética de suas populações naturais;
2. Inferir o efeito dos fatores evolutivos no padrão obtido, através da análise da estatística F de Wright, relacionando as distâncias genéticas com distâncias geográficas e ecológicas. Deste modo, será possível testar a hipótese de fluxo gênico através dos rios em menor escala do que as amostradas nos demais trabalhos (Monteiro e Sene, 1995; Monteiro, 1997; Mateus e Sene, 2007);
3. Correlacionar os dados sobre *Drosophila antonietae* do alto, médio e baixo curso da bacia dos rios Paraná-Uruguai, com a finalidade de inferir eventos históricos e ecológicos que determinam o padrão evolutivo da espécie em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a caracterização genética, através de *loci* de DNA microssatélite, de populações naturais da espécie *Drosophila antonietae* da porção do curso médio da bacia dos rios Paraná–Uruguai, denominada neste trabalho de Análise Regional. Uma segunda análise, comparando os dados de variabilidade genética obtidos neste trabalho para as populações do curso médio com outros de populações dos cursos alto e baixo da bacia Paraná-Uruguai (Machado, 2003), foi realizada, e denominada Análise Macrogeográfica.

Coleta e Triagem do material

As análises genéticas foram realizadas com indivíduos machos adultos coletados em três áreas de ocorrência do cacto *Cereus hildmaniannus* no Estado do Paraná (Tabela 1): represa de Segredo; Fazenda Rio do Poço; e Cantagalo. Essas regiões de coleta são caracterizadas por Floresta Ombrófila Mista e pertencem à porção média da bacia dos rios Paraná-Uruguai.

As coletas foram realizadas utilizando armadilhas abertas com iscas de banana, laranja e fermento biológico (Sene *et al.*, 1981). Após três dias, os indivíduos adultos foram coletados com o auxílio de redes entomológicas. Fêmeas do grupo *D. repleta* foram colocadas em vidros com meio de cultura para oviposição e posterior identificação dos seus descendentes machos a nível específico, visto que o caráter diagnóstico para moscas deste grupo é a morfologia do edeago. Uma vez identificada como sendo da espécie *Drosophila antonietae*, as fêmeas parentais foram congeladas à -20 °C para posterior análise de microssatélites. Todos os machos do grupo *repleta* coletados na natureza foram identificados e aqueles pertencentes à espécie *D. antonietae* foram separados para as análises genéticas.

Tabela 1. Coordenadas geográficas das áreas de coleta, no estado do Paraná, de indivíduos da espécie *Drosophila antonietae* utilizados para Análise Regional.

Localidade	População	Coordenadas
Município de Mangueirinha	Segredo	25° 46' 27,2" S, 52° 06' 55,6" W
Município de Guarapuava	Rio do Poço	25° 17' 42" S, 51° 53' 07,1" W
Município de Cantagalo	Cantagalo	25° 25' 00" S, 52° 04' 14,9" W

Extração de DNA e Amplificação dos Loci de Microssatélite

O DNA dos indivíduos de *Drosophila antonietae* foi extraído da cabeça, pois o tórax e abdômen foram armazenados a -20 °C para futuras análises combinadas utilizando outros marcadores.

As cabeças foram resfriadas em gelo e individualmente maceradas em 40 µL de EDTA (0,5 M, pH 8,0) e 167 µL de Solução de Lise de Núcleo (Promega). Foram adicionados 6 µL de Proteinase K (20 mg/mL) às amostras maceradas, e a solução foi agitada 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 e mantida em gelo por 10 minutos. Depois de centrifugação a 14000 rpm por 4 minutos, o sobrenadante contendo o DNA foi retirado, e a este foi acrescentado 200 µL de isopropanol a temperatura ambiente, e então submetido a novo ciclo de centrifugação, sendo que após esta etapa, o DNA foi precipitado no fundo do tubo e o sobrenadante removido. O DNA foi purificado em etanol 70% e centrifugação, e, após retirada do sobrenadante, os tubos foram secos em estufa a 40° C por 40 minutos. O DNA foi então ressuspendido em 30 µL de água ultra-pura e armazenado a 4° C.

Através do DNA extraído foram amplificados sete *loci* de microssatélites descritos por Machado *et al.* (2003): AluRSAlanto-1, Haelllanto-2, Haelllanto-3, Haelll400anto-4, Haelll400anto-5, AluRSAlanto-6, AluRSAlanto-7. As condições da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a corrida das reações em gel de poliacrilamida 6% foram realizadas como em Machado *et al.* (2003). Os alelos dos *loci* amplificados foram visualizados através de coloração do gel por nitrato de prata, de acordo com Sanguinetti *et al.* (1994). A denominação dos alelos foi realizada em ordem decrescente, sendo o alelo 1 o de maior tamanho, conforme genotipagem realizada para estes mesmos *loci*, porém em outras populações, por Machado (2003).

Análise dos dados

Após genotipagem dos *loci* de microssatélites das populações listadas na Tabela 1, foram realizadas as análises populacionais denominadas de Análise Regional. Nesta análise o *locus* Haelllanto-2 não foi considerado, pois houve amplificação em apenas quatro indivíduos. Assim, os dados obtidos foram inseridos

em uma matriz geral, a qual continha mais 11 populações da área de distribuição da espécie *Drosophila antonietae* amostradas por Machado (2003). Essa análise geral foi denominada de Análise Macrogeográfica. Nesta, o *locus* Haelllanto-2 foi considerado por não ter havido problema com relação a sua amplificação nas demais amostras.

- Análise Regional

Para esta análise foram amostrados 75 indivíduos, sendo 25 de cada população do curso médio da bacia dos rios Paraná-Uruguai (Figura 2, pontos 12 ao 14). No programa estatístico TFPGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) (Miller, 1997) foram realizadas as seguintes análises populacionais: frequências alélicas e genotípicas; teste exato para verificação de diferenciação de populações (Raymond e Rousset, 1995); e teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Com o auxílio do programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (Lewis e Zaykin, 2001) foram calculadas as heterozigosidades médias observada e esperada, porcentagem de *loci* polimórficos, distância genética (Reynolds *et al.*, 1983), verificação da presença de alelos exclusivos, e ainda foi realizada uma análise de agrupamento Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987).

Além destas análises, também foi realizada no programa GDA, a estatística F de Wright (1931), utilizando as categorias dos índices de diferenciação propostas por Wright (1978) como: baixa (0-0,05), moderada (0,05-0,15), alta (0,15-0,25) e muito alta (>0,25).

Para verificação da correlação das distâncias genéticas com as distâncias geográficas (distância em linha reta entre as populações), e com as distâncias ecológicas (distância entre as populações ao longo do curso dos rios) foi realizado o teste de Mantel no programa TFPGA. Nesta análise, as populações foram comparadas par a par e a distância genética utilizada nesta análise foi a de Reynolds *et al.* (1983), calculada no programa GDA.

- Análise Macrogeográfica

Para esta análise, foram utilizados os dados referentes a análises de DNA microssatélite realizadas com indivíduos adultos coletados nas áreas de ocorrência

do cacto *Cereus hildmaniannus* no curso médio da bacia dos rios Paraná-Uruguai (Análise Regional) e nos cursos alto e baixo desta bacia (Machado, 2003) (Tabela 2 e Figura 2).

As análises estatísticas populacionais foram realizadas nas 14 populações listadas na Tabela 2, da mesma maneira descrita para a Análise Regional, com exceção que aqui não foi realizado teste exato, e o *locus* Haelllanto-2 foi considerado.

RESULTADOS

Análise Regional

Foi realizada a amplificação dos sete *loci* de microssatélites, descritos por Machado *et al.* (2003), para os 75 indivíduos provenientes das três populações naturais de áreas de ocorrência da espécie *Drosophila antonietae* do curso médio da bacia dos rios Paraná-Uruguai (Figura 3). Para o *locus* Haelllanto-2 ocorreu a amplificação de apenas dois indivíduos da região de Cantagalo e dois do Rio do Poço (Figuras 3), portanto não foi utilizado nas análises populacionais. Para o *locus* AluIRSAIanto-1 e Haelllanto-3 foram amplificados 5 alelos, quatro alelos para Haelll400anto-4, três para Haelll400anto-5, quatro alelos para AluRSAIanto-6 e quatro alelos para o AluRSAIanto-7.

As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos para as frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, para cada região. Um *locus* foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95%.

A análise estatística dos dados de microssatélite demonstrou que todas as populações apresentaram 100% dos *loci* polimórficos. Alelos exclusivos foram encontrados para os *loci* AluIRSAIanto-1 (alelo 1 no Rio do Poço) e Haelllanto-3 (alelo 5 no Rio do Poço). As heterozigosidades médias esperadas (H_e) foram maiores que as observadas (H_o) para a todas as populações (Tabela 3).

Todos os *loci* se apresentaram desvios significativos do esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5) em pelo menos uma população. A população do Rio do Poço (PR) apresentou apenas um *locus* fora do equilíbrio. Já

as populações de Cantagalo e Segredo apresentaram quatro *loci* fora do equilíbrio.

Tabela 2. Localização das populações da espécie *Drosophila antonietae* utilizadas na Análise Macrogeográfica, e a bacia hidrográfica a qual a área de coleta pertence.

Localidade	Bacia hidrográfica	Coordenadas
Serrana/SP	Rio Grande	21° 15' S, 47° 34' W
Sertãozinho/ SP		21° 10' S, 46° 55' W
Santa Maria da Serra/SP		22° 34' S, 48° 12' W
Itirapina/SP	Rio Tietê	22° 16' S, 47° 48' W
Itatiba/SP		22° 56' S, 46° 55' W
Serra do Japi/SP		23° 15' S, 47° 4,8' W
Salto Santa Rosa/PR		24° 37' S, 50° 33' W
Guartelá/PR	Rio Paranapanema	24° 32' S, 50° 18' W
Sapopema/PR		23° 50' S, 51° 45' W
Cianorte/PR	Rio Ligeiro	23° 34' S, 52° 33' W
Rio do Poço/PR		25° 17' S, 51° 53' W
Cantagalo/PR	Rio Iguaçu	25° 22' S, 52° 10' W
Segredo/PR		25° 46' S, 52° 06' W
Santiago/RS	Rio Uruguai	29° 12' S, 54° 53' W



Figura 2. Localização geográfica das populações de *Drosophila antonietae* utilizadas na análise genética macrogeográfica. 1 – Serrana/SP; 2 – Sertãozinho/SP; 3 – Santa Maria da Serra/SP; 4 – Santiago/RS; 5 – Salto Santa Rosa; 6 – Itirapina/SP; 7 – Guartelá/PR; 8 – Sapopema/PR; 9 – Serra do Japi/SP; 10 – Itatiba/SP; 11 – Cianorte/PR; 12 – Rio do Poço; 13 – Cantagalo; 14 – Segredo.

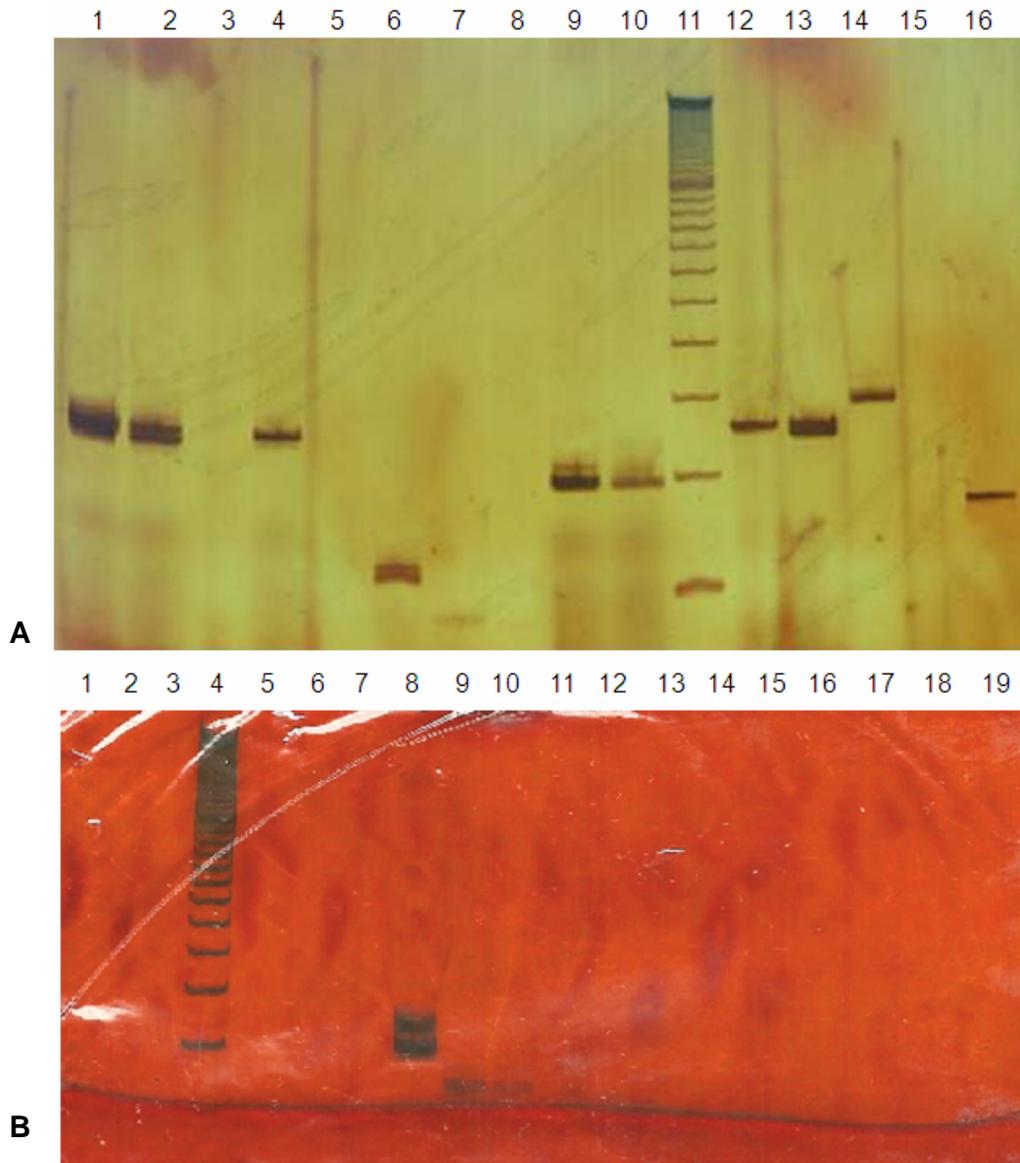


Figura 3. PAGE 6% corada com nitrato de prata para visualização dos *loci* de microsatélites amplificados em indivíduos da espécie *Drosophila antonietae*, **A:** Rio do Poço em Guarapuava/PR. 1 a 4 = *primer* AluRSAlanto-1 (1-2 = 1/2; 4 = 2/2); 5 e 6 = Haelllanto-3 (6 = 1/2); 7 e 8 = Haelllanto-2 (7 = 2/2; 8 = 1/1); 9 e 10 = Haelll400anto-4 (9 = 1/2; 10 = 2/2); 11A e 4B = Marcador 100 pares de bases (1 mg/mL - Pharmacia); 12 e 13 = Haelll400anto-5 (12 = 1/1; 13 = 1/2); 14 e 15 = *primer* AluRSAlanto-6 (14 = 1/1); 16 = *primer* AluRSAlanto-7 (1/1). **B:** alelos do *locus* Haelllanto-2. Indivíduos 1 à 3, 7, 9 e 10 = Cantagalo/PR; 5 e 6, 12 à 15 = Rio do Poço/PR; 16 à 19 = Segredo/PR; 8 = indivíduo amplificado para o *locus* Haelllanto-3; 9 e 10 = 1/2. Demais não amplificaram.

Tabela 3. Freqüências alélicas de cada *locus* de microsatélite, para cada população, na Análise Regional. H_o = heterozigiosidade média observada. H_e = heterozigiosidade média esperada.

Locil/Alelos	Rio do Poço	Cantagalo	Segredo
<i>AluRSAlanto-1</i>			
1	0,24	-	-
2	0,37	-	0,42
3	0,27	0,59	0,14
4	0,04	0,35	0,33
5	0,07	0,06	0,11
<i>HaeIIIanto-3</i>			
1	0,52	0,48	0,43
2	0,19	0,29	0,28
3	0,17	0,17	0,22
4	0,10	0,06	0,07
5	0,02	-	-
<i>HaeIII400anto-4</i>			
1	0,50	0,37	0,47
2	0,11	0,07	0,08
3	0,34	0,41	0,36
4	0,04	0,07	0,09
5	-	0,02	-
6	-	0,06	-
<i>HaeIII400anto-5</i>			
1	0,46	0,48	0,40
2	0,46	0,48	0,34
3	0,08	0,04	0,26
<i>AluRSAlanto-6</i>			
1	0,42	0,07	0,31
2	0,46	0,60	0,53
3	0,04	0,19	0,16
4	-	0,14	-
5	0,08	-	-
<i>AluRSAlanto-7</i>			
1	0,54	0,43	0,10
2	0,29	0,50	0,32
3	0,15	0,07	0,46
4	0,02	-	0,12
% Loci polimórficos	100	100	100
H_o	0,4926	0,5664	0,4132
H_e	0,6389	0,6112	0,6396

Tabela 4. Frequências genotípicas encontradas dentro de cada *locus* de microssatélite, para cada população, na Análise Regional.

Genótipo	Rio do Poço	Cantagalo	Segredo
<i>AluRSAIanto-1</i>			
11	0,18	-	-
12	0,09	-	-
22	0,14	-	0,39
23	0,27	-	-
24	-	-	0,06
33	0,18	0,39	0,11
34	0,05	0,39	-
35	-	-	0,06
44	-	0,09	0,22
45	0,05	0,13	0,17
55	0,05	-	-
<i>HaeIIIanto-3</i>			
11	0,33	0,42	0,35
12	0,08	-	-
13	0,25	0,13	0,17
15	0,04	-	-
22	0,08	0,25	0,22
24	0,13	0,08	0,13
33	0,04	0,08	0,13
34	-	0,04	-
44	0,04	-	-
<i>HaeIII400anto-4</i>			
11	0,14	-	0,11
12	0,05	-	-
13	0,68	0,74	0,72
22	0,05	0,04	-
24	0,09	-	0,17
25	-	0,04	-
33	-	0,04	-
46	-	0,13	-
<i>HaeIII400anto-5</i>			
11	0,25	0,36	0,32
12	0,42	0,24	0,12
13	-	-	0,04
22	0,25	0,36	0,28
33	0,08	0,04	0,24

Tabela 4. Continuação.

Genótipo	Rio do Poço	Cantagalo	Segredo
<i>AluRSAlanto-6</i>			
11	0,21	-	0,17
12	0,33	0,14	0,28
13	0,04	-	-
15	0,04	-	-
22	0,25	0,19	0,33
23	0,04	0,38	0,11
24	-	0,29	-
25	0,04	-	-
33	-	-	0,11
55	0,04	-	
<i>AluRSAlanto-7</i>			
11	0,38	0,33	0,04
12	0,13	0,19	0,08
13	0,21	-	-
14	-	-	0,04
22	0,21	0,33	0,28
23	0,04	0,14	-
33	-	-	0,40
34	0,04	-	0,12
44	-		0,04

Tabela 5. Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis *loci* de microsatélite nas 3 populações estudadas.

<i>Loci</i>	População		
	Rio Poço	Cantagalo	Segredo
<i>AluRSAlanto-1</i>	0.0196*	0.3993	0.0001***
<i>Haelllanto-3</i>	0.2371	0.0002***	0.0023**
<i>Haelll400anto-4</i>	0.0842	0.0289*	0.1510
<i>Haelll400anto-5</i>	0.4333	0.0140*	0.0009***
<i>AluRSAlanto-6</i>	0.4333	0.0044**	0.3698
<i>AluRSAlanto-7</i>	0.1145	0.1867	0.0001***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Em relação à diferenciação das populações, obtida através do teste exato, pode ser identificado que todos os *loci* em todas as populações foram significativamente diferentes (Tabela 6). O *locus* AluRSAlanto-1 apresentou $P < 0,001$ em todas as populações. Os *loci* Haelllanto-3 e Haelll400anto-4 foram os únicos que não apresentaram diferenciação em nível de significância $P < 0,05$. As populações com maior número de *loci* estatisticamente diferentes foram Cantagalo e Segredo.

As distâncias de Reynolds *et al.* (1983) podem ser observadas na Tabela 7. A maior distância encontrada foi entre as populações de Cantagalo e Segredo (0,0725) e a menor foi entre Cantagalo e Rio do Poço (0,0321).

A estatística F de Wright (Tabela 8) evidenciou uma baixa diferenciação genética entre as populações ($F_{st} = 0,0491$) e estatisticamente não diferente de zero. Foi encontrada, dentro das populações, uma alta deficiência de heterozigotos ($F_{is} = 0,2561$), porém também estatisticamente não diferente de zero. Quanto à totalidade, também não foi estatisticamente significativa a elevada deficiência de heterozigotos encontrada ($F_{it} = 0,2927$). Para os *loci* individualmente, a deficiência de heterozigotos foi muito alta, porém não significativa, para os *loci* AluRSAlanto-1, Haelllanto-3, AluRSAlanto-7 e Haelll400anto-5 e para o *locus* AluRSAlanto-6 a deficiência foi alta e estatisticamente não significativa.

A análise da similaridade entre as populações utilizando o agrupamento dos vizinhos mais próximos (*Neighbor-Joining*) não evidenciou correlação entre as distâncias ecológica e genética entre as populações (Figura 4). A população do Rio do Poço, situada na cabeceira do rio Cavernoso e, portanto, a primeira na sequência da transecção ao longo do rio, ficou intermediariamente localizada entre Cantagalo (a segunda ao longo do rio) e Segredo (a terceira) na árvore de agrupamento. O teste de Mantel, que correlacionou as matrizes de distâncias genéticas e físicas (geográfica e ecológica) entre as três populações, não resultou em correlação estatisticamente significativa (genética/ecológica: $r = 0,63$; $p = 0,33$ e genética/geográfica: $r = 0,82$ e $p = 0,32$). Portanto, como não houve correlação entre as distâncias, não foi possível assumir que as populações estão em equilíbrio regional, e assim calcular o valor de Nm entre estas populações.

Tabela 6. Teste exato para diferenciação de populações comparando todas as populações, duas a duas, dentro da Análise Regional.

Populações	Rio do Poço	Segredo
Cantagalo	<i>AluRSAlanto-1</i> : $P = 0^{***}$	<i>AluRSAlanto-1</i> : $P = 0^{***}$
	<i>AluRSAlanto-6</i> : $P = 0^{***}$	<i>HaeIII400anto-5</i> : $P =$
	Todos os loci : $P = 0^{***}$	0.0124**
		<i>AluRSAlanto-6</i> : $P = 0.0080$ ***
		<i>AluRSAlanto-7</i> : $P = 0^{***}$
		Todos os loci : $P = 0^{***}$
Segredo	<i>AluRSAlanto-1</i> : $P =$ 0.0001***	
	<i>AluRSAlanto-7</i> : $P = 0^{***}$	
	Todos os loci : $P = 0^{***}$	
Todos os loci em todas as populações	χ^2 : 62.8037 df = 12 $P = 0^{***}$	
Todos os loci	$P = 0^{***}$	
<i>AluRSAlanto-1</i>	$P = 0^{***}$	
<i>HaeIII400anto-5</i>	$P = 0,0334^{**}$	
<i>AluRSAlanto-6</i>	$P = 0,0005^{***}$	
<i>AluRSAlanto-7</i>	$P = 0^{***}$	

Tabela 7. Distâncias de Reynolds *et al.* (1983) entre todas as populações, dentro da Análise Regional.

Populações	Rio do Poço	Cantagalo
Cantagalo	0.0321	****
Segredo	0.0425	0.0725

Tabela 8. Estatística *F* de Wright para todos os *loci* analisados, em todas as populações, dentro da Análise Regional.

Locus	<i>F_{is}</i>	<i>F_{it}</i>	<i>F_{st}</i>
<i>AluRSAlanto-1</i>	0,4313	0,5303	0,1742
<i>Haelllanto-3</i>	0,4861	0,4749	-0,0217
<i>Haelll400anto-4</i>	-0,3963	-0,4144	-0,0130
<i>Haelll400anto-5</i>	0,3030	0,2991	-0,0056
<i>AluRSAlanto-6</i>	0,2379	0,2318	-0,0080
<i>AluRSAlanto-7</i>	0,4196	0,4889	0,1194
Todos os <i>loci</i>	0,2561	0,2927	0,0491
I.C. 95%			
- mínimo	-0,0301	-0,0295	-0,0142
- máximo	0,4296	0,4823	0,1135

I.C. = intervalo de confiança * valores significativos ao nível de 95%

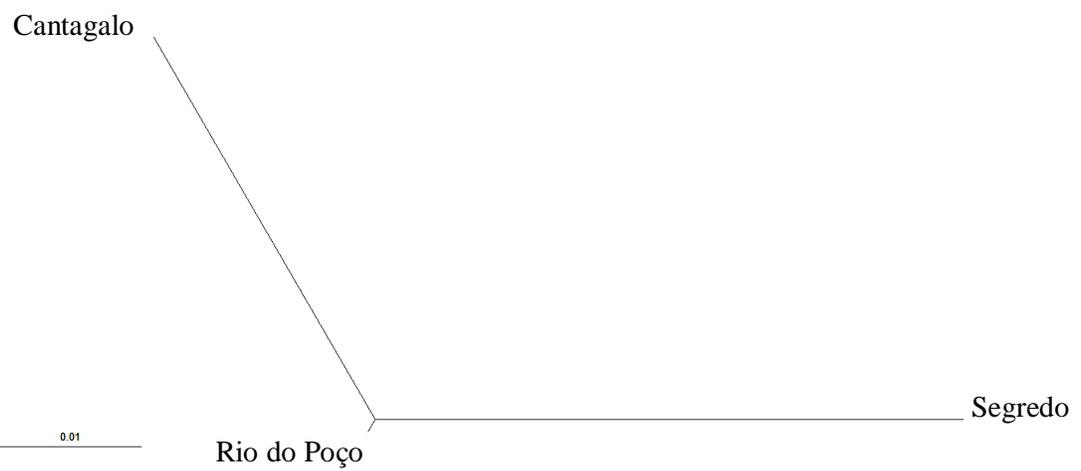


Figura 4. Agrupamento entre os vizinhos mais próximos (*Neighbor-Joining*) para as populações dentro da Análise Regional, utilizando as distâncias de Reynolds *et al.* (1983).

Análise Macrogeográfica

Foi analisado um total de 436 indivíduos provenientes de 14 populações naturais da espécie *Drosophila antonietae*, abrangendo as porções alta, média e baixa da bacia dos rios Paraná-Uruguaí. Para o *locus* AluRSAIanto-1, sete alelos foram encontrados. Foram amplificados três alelos para Haelllanto-2, seis alelos para Haelllanto-3, quatro alelos para Haelll400anto-4, quatro para Haelll400anto-5, cinco alelos para AluRSAIanto-6 e quatro alelos para o AluRSAIanto-7. As Tabelas 9 e 10 apresentam as frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, obtidas para cada *locus* em cada população. Um *locus* foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95%.

Com exceção da população da Serra do Japi-SP, que apresentou 85,71% de *loci* polimórficos, todas as outras 14 populações apresentaram 100% dos *loci* polimórficos. Nenhuma população apresentou alelo exclusivo. Em relação à heteroziguidade, apenas na Serra do Japi-SP, apresentaram heteroziguidades médias observadas maiores que a esperadas (Tabela 9).

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada *locus*. Pode ser observado que todos os *loci* se apresentaram fora do equilíbrio em pelo menos 3 das 14 populações avaliadas (Tabela 11). O *locus* que se apresentou fora do equilíbrio em um maior número de populações (9) foi o AluRSAIanto-6. Considerando as populações, ocorreu uma oscilação no número de *locus* fora do equilíbrio, desde a ausência de *locus* fora do equilíbrio em 2 populações (Sapopema-PR e Serra do Japi-SP), apenas um *locus* fora do equilíbrio (Rio do Poço –PR), e as que apresentaram 5 *loci*, sendo esse o máximo fora do equilíbrio.

A análise da estatística F de Wright (Tabela 12) evidenciou uma diferenciação genética moderada ($F_{st} = 0,1183$), e significativamente diferente de zero, entre as populações. Grande parte dos *loci* também apresentaram significativa diferenciação genética, variando entre 0,0805 para Haelllanto-3 e 0,1981 para AluRSAIanto-7. O valor de $F_{is} = 0,3949$ evidenciou uma deficiência de heterozigotos muito alta, e significativamente diferente de zero, dentro das populações. O mesmo pode ser observado com relação ao total ($F_{it} = 0,4624$), isto é, uma deficiência de heterozigotos muito alta e significativamente diferente de zero.

Tabela 9. Frequência alélica para cada *locus* de microssatélite, calculada para cada população na Análise Macrogeográfica. n = número de indivíduos analisados; % = porcentagem de loci polimórficos; Ho = heterozigidade média observada; He heterozigidade média esperada.

Locus/Alelos	Populações													
	SER	SRT	SMS	SAN	SSR	ITI	GUA	SAP	SJA	ITA	CIA	RP	CG	SG
AluRSAIanto-1	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 09)	(n = 06)	(n = 44)	(n = 22)	(n=23)	(n=23)	(n=18)
1	0,03	0,03	0,01	-	-	0,14	-	-	-	0,02	-	0,24	-	-
2	0,15	0,04	0,02	-	0,05	0,02	0,05	-	-	0,02	-	0,37	-	0,42
3	0,10	0,11	0,05	0,12	0,18	0,08	-	-	-	0,04	0,14	0,28	0,59	0,14
4	0,17	0,10	0,21	0,05	0,14	0,17	0,15	0,06	0,17	0,10	0,30	0,04	0,35	0,33
5	0,44	0,65	0,68	0,70	0,61	0,50	0,65	0,39	0,50	0,66	0,36	0,07	0,06	0,11
6	0,11	0,07	0,02	0,12	0,02	0,09	0,15	0,55	0,33	0,16	0,20	-	-	-
7	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haelllanto-2	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 48)	(n = 10)	(n = 09)	(n = 11)	(n = 47)	(n = 22)	(n=02)	(n=02)	(n=0)
1	0,06	0,12	0,09	0,08	0,16	0,03	0,20	0,11	-	0,23	0,04	0,5	0,5	-
2	0,94	0,83	0,81	0,92	0,66	0,54	0,60	0,56	0,95	0,62	0,57	0,5	0,5	-
3	-	0,05	0,10	-	0,18	0,43	0,20	0,33	0,05	0,15	0,39	-	-	-
Haelllanto-3	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 32)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 09)	(n = 49)	(n = 22)	(n=24)	(n=24)	(n=23)
1	0,01	0,04	-	0,02	-	0,12	0,10	0,05	0,11	0,19	0,14	0,52	0,48	0,43
2	0,11	0,15	0,05	0,06	-	0,17	0,20	0,15	0,05	0,25	0,21	0,19	0,29	0,28
3	0,19	0,35	0,27	0,14	0,05	0,19	0,20	0,15	0,17	0,25	0,11	0,17	0,17	0,22
4	0,37	0,38	0,41	0,36	0,32	0,34	0,35	0,45	0,50	0,25	0,34	0,10	0,06	0,07
5	0,30	0,08	0,22	0,39	0,52	0,17	0,15	0,20	0,17	0,06	0,18	0,02	-	-
6	0,02	-	0,05	0,03	0,11	0,01	-	-	-	-	0,02	-	-	-
Haelll400anto-4	(n = 45)	(n = 50)	(n = 48)	(n = 33)	(n = 21)	(n = 46)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 08)	(n = 48)	(n = 22)	(n=22)	(n=22)	(n=20)
1	0,03	0,06	-	-	0,02	0,04	-	0,20	0,06	0,12	-	0,50	0,47	0,47
2	0,21	0,33	0,11	-	0,10	0,23	0,05	0,25	-	0,09	0,11	0,11	0,10	0,08
3	0,38	0,21	0,26	0,24	0,21	0,39	0,60	0,35	0,50	0,39	0,50	0,35	0,41	0,36
4	0,38	0,40	0,63	0,76	0,67	0,34	0,35	0,20	0,44	0,40	0,39	0,04	0,02	0,09
Haelll400anto-5	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 47)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 07)	(n = 48)	(n = 22)	(n=24)	(n=24)	(n=24)
1	0,11	0,08	0,15	0,10	0,16	0,18	0,20	0,10	0,07	0,19	0,32	0,46	0,48	0,40
2	0,70	0,71	0,51	0,76	0,36	0,31	0,45	0,40	0,50	0,50	0,25	0,46	0,48	0,34
3	0,18	0,21	0,34	0,14	0,48	0,27	0,25	0,35	0,36	0,29	0,43	0,08	0,04	0,26
4	0,01	-	-	-	-	0,24	0,10	0,15	0,07	0,02	-	-	-	-

Tabela 9. Continuação.

Locus/Alelos	Populações													
	SER	SRT	SMS	SAN	SSR	ITI	GUA	SAP	SJA	ITA	CIA	RP	CG	SG
AluRSAlanto-6	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 49)	(n = 22)	(n=24)	(n=24)	(n=18)
1	0,08	0,26	0,18	0,09	0,23	0,19	0,30	0,10	0,14	0,19	0,14	0,42	0,07	0,31
2	0,28	0,24	0,40	0,09	0,45	0,11	0,10	0,20	0,31	0,38	0,23	0,46	0,60	0,53
3	0,20	0,16	0,12	0,09	0,14	0,15	0,20	0,50	0,41	0,34	0,11	0,04	0,19	0,16
4	0,44	0,34	0,26	0,73	0,18	0,25	0,10	0,20	0,14	0,09	0,23	-	0,14	-
5	-	-	0,04	-	-	0,30	0,30	-	-	-	0,29	0,08	-	-
AluRSAlanto-7	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 08)	(n = 49)	(n = 22)	(n=24)	(n=24)	(n=25)
1	0,02	-	-	-	0,02	0,19	-	-	-	0,03	0,30	0,54	0,43	0,10
2	0,81	0,94	0,81	0,88	0,82	0,42	0,25	0,40	0,06	0,59	0,52	0,29	0,50	0,32
3	0,07	0,06	-	0,04	0,02	0,23	0,30	0,30	0,19	0,17	0,11	0,15	0,07	0,46
4	0,10	-	0,19	0,08	0,14	0,16	0,45	0,30	0,75	0,21	0,07	0,02	-	0,12
%	100	100	100	100	100	100	100	100	85,71	100	100	100	100	100
H _o	0,2651	0,2600	0,2518	0,2186	0,2798	0,4333	0,4571	0,3794	0,5853	0,4419	0,5065	0,4223	0,5664	0,4132
H _e	0,5360	0,5079	0,5316	0,3983	0,5560	0,7062	0,6707	0,6859	0,5543	0,6379	0,6812	0,6429	0,6112	0,6396

Tabela 10. Frequências genótípicas encontradas para cada genótipo de cada *locus* de microssatélite, em cada população dentro da Análise Macrogeográfica. n = número de indivíduos analisados; SER = Serrana-SP; SRT = Sertãozinho-SP; SMS = Santa Maria da Serra-SP; SAN = Santiago-RS; SSR = Salto Santa Rosa-PR; ITI = Itirapina-SP; GUA = Guartelá-PR; SAP = Sapopema-PR; SJA = Serra do Japi-SP; ITA = Itatiba-SP; CIA = Cianorte-PR; RP = Rio do Poço; CG = Cantagalo; SG= Segredo.

Genótipos	Populações													
	SER	SRT	SMS	SAN	SSR	ITI	GUA	SAP	SJA	ITA	CIA	RP	CG	SG
<i>AluRSAIanto-1</i>	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 09)	(n = 06)	(n = 44)	(n = 22)	(n= 23)	(n=23)	(n=18)
1/1	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-
1/2	-	0,02	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	0,09	-	-
1/3	0,02	-	0,02	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
1/5	-	0,04	-	-	-	0,24	-	-	-	0,05	-	-	-	-
2/2	0,08	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	0,13	-	0,39
2/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	0,27	-	-
2/4	-	-	0,02	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-	-	0,06
2/5	0,14	0,06	-	-	-	0,04	-	-	-	0,02	-	-	-	-
2/6	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/3	0,02	0,04	-	-	0,13	0,04	-	-	-	-	-	0,18	0,39	0,10
3/4	0,02	0,02	0,06	-	-	0,04	-	-	-	0,02	0,04	0,05	0,39	-
3/5	0,12	0,10	0,04	0,21	0,09	0,02	-	-	-	0,02	0,18	-	-	0,06
3/6	0,02	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-
4/4	0,06	0,04	0,14	0,03	0,09	0,08	-	0,11	-	0,07	0,18	-	0,09	0,22
4/5	0,14	0,08	0,03	0,03	0,09	0,12	0,20	-	-	0,05	0,05	0,05	0,13	0,17
4/6	0,04	0,02	0,03	-	-	-	-	-	0,33	-	0,14	-	-	-
5/5	0,22	0,50	0,62	0,55	0,50	0,26	0,50	0,33	0,33	0,56	0,14	0,05	-	-
5/6	0,04	0,02	0,02	0,03	0,05	0,06	0,10	0,11	0,34	0,05	0,23	-	-	-
5/7	-	-	0,02	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6/6	0,06	0,04	-	0,09	-	0,06	0,10	0,45	-	0,14	-	-	-	-
7/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haelllanto-2</i>	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 48)	(n = 10)	(n = 09)	(n = 11)	(n = 47)	(n = 22)	(n=02)	(n=02)	(n=0)
1/1	-	-	0,02	-	-	-	0,10	-	-	0,11	-	0,5	-	-
1/2	0,12	0,20	0,11	0,15	0,14	0,02	0,20	0,11	-	0,17	0,05	-	1,00	-
1/3	-	0,04	-	-	0,18	0,04	-	0,11	-	0,08	0,05	-	-	-
2/2	0,88	0,72	0,75	0,85	0,59	0,46	0,40	0,45	0,91	0,47	0,54	0,5	-	-
2/3	-	0,02	0,04	-	-	0,15	0,20	0,11	0,09	0,13	-	-	-	-
3/3	-	0,02	0,08	-	0,09	0,33	0,10	0,22	-	0,04	0,36	-	-	-

Tabela 10. Continuação.

Genótipos	Populações													
	SER	SRT	SMS	SAN	SSR	ITI	GUA	SAP	SJA	ITA	CIA	RP	CG	SG
<i>Haelllanto-3</i>	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 32)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 09)	(n = 49)	(n = 22)	(n=24)	(n=24)	(n=23)
1/1	-	0,04	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	0,30	0,42	0,35
1/2	0,02	-	-	-	-	0,04	-	-	-	0,12	0,05	0,08	-	-
1/3	-	-	-	0,03	-	0,04	0,10	-	-	0,12	0,09	0,30	0,13	0,17
1/4	-	-	-	-	-	0,08	0,10	0,10	0,22	0,10	0,09	-	-	-
1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	0,04	-	-
1/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
2/2	0,06	0,04	-	-	-	0,02	-	-	-	0,06	0,05	0,08	0,25	0,26
2/3	0,04	0,20	0,06	0,03	-	0,04	-	-	0,11	0,08	0,05	-	-	-
2/4	0,04	0,02	0,04	0,06	-	0,18	0,30	0,10	-	0,14	0,13	0,12	0,08	0,09
2/5	-	-	-	0,03	-	0,04	0,10	0,20	-	0,02	0,09	-	-	-
3/3	0,08	0,12	0,14	0,03	-	0,08	0,10	0,10	-	0,06	-	0,04	0,08	0,13
3/4	0,14	0,26	0,18	0,10	-	0,10	-	0,10	0,11	0,16	0,09	-	0,04	-
3/5	0,04	-	-	0,03	0,09	0,04	0,10	-	0,11	-	-	-	-	-
3/6	-	-	0,02	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4/4	0,20	0,22	0,26	0,19	0,18	0,08	0,10	0,30	0,23	0,05	0,04	0,04	-	-
4/5	0,16	0,04	0,06	0,16	0,27	0,14	0,10	-	0,22	0,02	0,27	-	-	-
4/6	-	-	0,02	0,03	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
5/5	0,20	0,06	0,16	0,28	0,32	0,06	-	0,10	-	0,02	-	-	-	-
5/6	-	-	0,06	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6/6	0,02	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haelll400anto-4</i>	(n = 45)	(n = 50)	(n = 48)	(n = 33)	(n = 21)	(n = 46)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 08)	(n = 48)	(n = 22)	(n=22)	(n=22)	(n=20)
1/1	0,02	0,04	-	-	-	0,02	-	0,20	-	0,13	-	0,14	0,09	0,11
1/2	0,02	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,05	-
1/3	-	0,02	-	-	-	0,04	-	-	0,12	-	-	0,67	0,72	0,72
1/4	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2/2	0,16	0,26	0,10	-	0,09	0,09	-	0,10	-	0,06	0,04	0,05	0,05	-
2/3	0,09	0,06	0,02	-	-	0,15	-	0,20	-	0,04	0,14	-	-	-
2/4	-	0,06	-	-	-	0,13	0,10	0,10	-	0,02	-	0,09	0,04	0,17
3/3	0,31	0,12	0,23	0,21	0,19	0,22	0,30	0,20	0,13	0,29	0,23	-	0,05	-
3/4	0,04	0,10	0,04	0,06	0,05	0,15	0,60	0,10	0,63	0,15	0,41	-	-	-
4/4	0,36	0,32	0,61	0,73	0,62	0,20	-	0,10	0,12	0,31	0,18	-	-	-

Tabela 10. Continuação.

Genótipos	Populações													
	SER	SRT	SMS	SAN	SSR	ITI	GUA	SAP	SJA	ITA	CIA	RP	CG	SG
<i>Haell400anto-5</i>	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 47)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 07)	(n = 48)	(n=22)	(n=24)	(n=24)	(n=24)
1/1	0,08	0,04	0,08	0,06	0,04	0,10	0,10	-	-	0,06	0,27	0,25	0,36	0,32
1/2	0,04	0,06	0,10	0,03	0,09	0,02	-	-	-	0,13	-	0,42	0,24	0,12
1/3	0,02	0,02	0,04	0,06	0,14	0,04	0,10	0,20	0,14	0,10	0,09	-	-	0,04
1/4	-	-	-	-	-	0,09	0,10	-	-	0,02	-	-	-	-
2/2	0,52	0,54	0,24	0,67	0,14	0,19	0,40	0,20	0,14	0,33	0,18	0,25	0,36	0,28
2/3	0,30	0,28	0,44	0,15	0,36	0,15	0,10	0,30	0,58	0,19	0,14	-	-	-
2/4	0,02	-	-	-	-	0,06	-	0,10	0,14	0,02	0,32	-	-	-
3/3	0,02	0,06	0,10	0,03	0,23	0,13	0,10	0,10	-	0,15	-	0,08	0,04	0,24
3/4	-	-	-	-	-	0,09	0,10	-	-	-	-	-	-	-
4/4	-	-	-	-	-	0,13	-	0,10	-	-	-	-	-	-
<i>AluRSAlanto-6</i>	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 49)	(n = 22)	(n=24)	(n=24)	(n=18)
1/1	0,08	0,26	0,18	0,09	0,23	0,18	0,30	0,10	0,09	0,14	0,09	0,21	-	0,17
1/2	-	-	-	-	-	0,02	-	-	0,09	0,10	0,09	0,34	0,14	0,28
1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-
1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-
2/2	0,28	0,24	0,40	0,09	0,45	0,08	0,10	0,10	0,18	0,19	0,09	0,25	0,19	0,33
2/3	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,09	0,22	0,09	0,04	0,38	0,11
2/4	-	-	-	-	-	0,04	-	-	0,09	0,06	-	-	0,29	-
2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,04	-	-
3/3	0,20	0,16	0,12	0,09	0,14	0,12	0,20	0,40	0,28	0,19	0,05	-	-	0,11
3/4	-	-	-	-	-	0,04	-	-	0,18	0,08	0,05	-	-	-
3/5	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
4/4	0,44	0,34	0,26	0,73	0,18	0,18	-	0,20	-	0,02	0,18	-	-	-
4/5	-	-	-	-	-	0,06	0,20	-	-	-	0,04	-	-	-
5/5	-	-	0,04	-	-	0,26	0,20	-	-	-	0,23	0,04	-	-

Tabela 10. Continuação.

Genótipos	Populações													
	SER	SRT	SMS	SAN	SSR	ITI	GUA	SAP	SJA	ITA	CIA	RP	CG	SG
<i>AluRSAlanto-7</i>	(n = 50)	(n = 50)	(n = 50)	(n = 33)	(n = 22)	(n = 50)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 08)	(n = 49)	(n=22)	(n=24)	(n=24)	(n=25)
1/1	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	0,37	0,33	0,04
1/2	0,04	-	-	-	-	0,06	-	-	-	0,04	0,41	0,13	0,19	0,08
1/3	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	0,14	0,21	-	-
1/4	-	-	-	-	0,05	0,06	-	-	-	0,02	0,05	-	-	0,04
2/2	0,70	0,92	0,66	0,76	0,68	0,26	0,10	0,30	-	0,37	0,27	0,21	0,33	0,28
2/3	0,02	0,04	-	0,09	0,05	0,24	0,20	-	-	0,25	0,05	0,04	0,15	-
2/4	0,16	-	0,30	0,15	0,22	0,02	0,10	0,20	0,13	0,16	0,04	-	-	-
3/3	0,06	0,04	-	-	-	0,08	0,20	0,20	-	0,02	-	-	-	0,40
3/4	-	-	-	-	-	0,04	-	0,20	0,37	0,06	0,04	0,04	-	0,12
4/4	0,02	-	0,04	-	-	0,10	0,40	0,10	0,50	0,08	-	-	-	0,04

Tabela 11. Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os *loci* dentro da Análise Macrogeográfica.

Populações	<i>Loci</i>						
	AluRSAlanto-1	Haelllanto-2	Haelllanto-3	Haelll400anto-4	Haelll400anto-5	AluRSAlanto-6	AluRSAlanto-7
Serrana-SP	0,5646	1,0	0,0679	0***	0,3202	0***	0,0554
Sertãozinho-SP	0,0265*	0,1266	0,0333*	0***	0,2979	0***	0,0047***
S. M. Serra-SP	0***	0,0006***	0,0083**	0***	0,7770	0***	1,0
Santiago-RS	0,1103	1,0	0,0026**	0***	0,0071**	0***	1,0
S. S. Rosa-PR	0,0211*	0,0015**	0,4133	0,0004***	1,00	0***	0,5381
Itirapina-SP	0,7814	0***	0,3543	0,0692	0,0041**	0***	0,0193*
Guartelá-PR	0,4799	0,5732	1,00	1,00	0,0150*	0,0031**	0,0150*
Sapopema-PR	0,1707	0,1707	0,2455	0,4799	0,5732	0,0751	0,0817
S. Japi-SP	0,4805	1,00	1,00	0,4779	0,5105	0,2145	1,00
Itatiba-SP	0,0001***	0,0133*	0,7049	0***	0,0223*	0,2310	0,7667
Cianorte-PR	1,00	0***	0,3376	1,00	0,0129*	0,0028**	1,00
Rio do Poço –PR	0,0196*	-	0,2371	0,0842	0,4333	0,4333	0,1145
Cantagalo- PR	0,3993	1,00	0,0002***	0,0289*	0,0140*	0,0044**	0,1867
Segredo- PR	0,0001***	-	0,0023	0,1510	0,0009***	0,3698	0,0001***

Tabela 12. Estatística F de Wright para todos os *loci* dentro da Análise Macrogeográfica.

<i>Loci</i>	<i>F_{is}</i>	<i>F_{it}</i>	<i>F_{st}</i>
<i>AluRSAlanto-1</i>	0.3623*	0.4441*	0.1283 *
<i>Haelllanto-2</i>	0.3990*	0.4677*	0.1144 *
<i>Haelllanto-3</i>	0.2357	0.2972	0.0805
<i>Haelll400anto-4</i>	0.4296*	0.4892*	0.1045*
<i>Haelll400anto-5</i>	0.3062*	0.3618	0.0802
<i>AluRSAlanto-6</i>	0.7137	0.7411	0.0956*
<i>AluRSAlanto-7</i>	0.2664	0.4117*	0.1981
Todos os <i>loci</i>	0.3949*	0.4624*	0.1115*
I.C. 95%			
- mínimo	0.2875	0.3633	0.0903
- máximo	0.5330	0.5827	0.1440

As distâncias genéticas de Reynolds *et al.* (1983) estão apresentadas na Tabela 13. As populações que apresentaram a maior distância genética foram Cantagalo-PR e Santiago-RS (0,4461). As que apresentaram a menor distância genética foram Serra do Japi-SP e Guartela-PR (-0.0015). Estas distâncias foram utilizadas na análise de agrupamento entre os vizinhos mais próximos (*Neighbor-Joining*) (Figura 5). As populações pertencentes à bacia do Rio Iguaçu (utilizadas na Análise Regional descrita acima), formaram um único ramo mais próximo a população de Cianorte-PR, que está localizada na bacia do rio Ligeiro, a qual é a mais próxima tanto ecologicamente quanto geograficamente. As duas populações que estão dentro da bacia do rio Grande (divisa entre os estados de São Paulo e Minas Gerais), Serrana-SP e Sertãozinho-SP, também ficaram situadas em um ramo único. Para as demais populações não houve uma correlação entre localização geográfica e posicionamento na árvore de agrupamento.

Tabela 13. Distâncias de Reynolds *et al.* (1983) entre todas as populações dentro da Análise Macrogeográfica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1) Serrana-SP	*****													
2) Sertãozinho-SP	0,0222	*****												
3) S.M.Serra-SP	0,0321	0,0299	*****											
4) Santiago-RS	0,0492	0,0751	0,0650	*****										
5) S.S.Rosa-PR	0,0679	0,0792	0,0099	0,0955	*****									
6) Itirapina-SP	0,0965	0,0827	0,0671	0,1341	0,0794	*****								
7) Guartelá-PR	0,1049	0,1232	0,0801	0,1951	0,1066	0,0007	*****							
8) Sapopema-PR	0,0946	0,1112	0,1032	0,2041	0,1079	0,0285	0,0146	*****						
9) S.Japi-SP	0,1275	0,1983	0,1202	0,2656	0,1446	0,0609	-0,0015	0,0056	*****					
10) Itatiba-SP	0,0647	0,0505	0,0357	0,1279	0,0607	0,0379	0,0205	0,0274	0,0511	*****				
11) Cianorte-PR	0,0980	0,1077	0,0677	0,1634	0,0672	0,0091	0,0289	0,0476	0,0884	0,0448	*****			
12) R.Poço-PR	0,2615	0,2612	0,2696	0,4106	0,2579	0,1372	0,1708	0,1831	0,2489	0,1555	0,1358	*****		
13) Cantagalo-PR	0,2971	0,2916	0,2934	0,4461	0,2810	0,1557	0,1979	0,2157	0,2828	0,1782	0,1374	0,0268	*****	
14) Segredo-PR	0,2168	0,2596	0,2510	0,4158	0,2451	0,1355	0,1387	0,1481	0,2128	0,1265	0,1324	0,0339	0,0642	*****

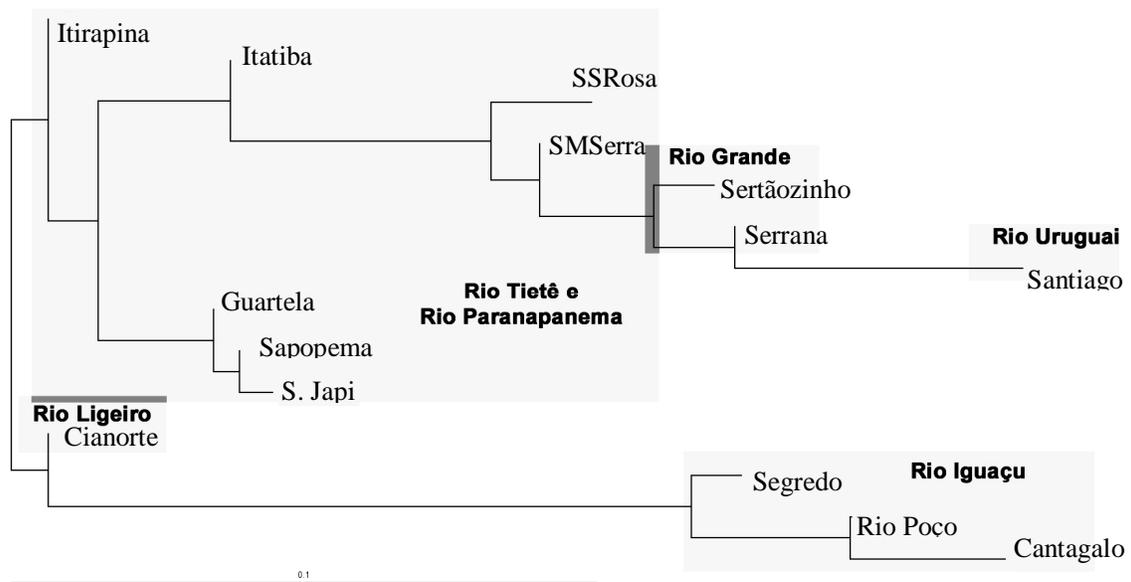


Figura 5. Análise de agrupamento dos vizinhos mais próximos (*Neighbour-Joining*) para todas as populações dentro da Análise Macrogeográfica, utilizando as distâncias de Reynolds *et al.* (1983).

DISCUSSÃO

Análise Regional

As áreas estudadas evidenciam vegetação xerofítica relictual pela presença do cacto *Cereus hildmaniannus*, remanescente da retração deste tipo de vegetação depois do último período frio e seco do quaternário (Bigarella *et al.*, 1975; Vanzolini, 1981; Ab'Saber, 2000). Estas áreas xerofíticas estão localizadas em remanescentes de Mata Atlântica do domínio de Floresta Ombrófila Mista, ou Mata de Araucária. Este bioma atualmente está sob intensa ação de degradação, principalmente pelo aumento das áreas urbanas e pela exploração da terra para atividades agropecuárias.

Nas viagens de coleta realizadas na região da Campina do Simão/PR e Santa Maria do Oeste/PR não foram localizadas áreas propícias para a coleta de *Drosophila antonietae*. Isto provavelmente deve-se ao fato de haver um grande processo exploratório nesta região, que consiste de áreas de pastagem e bovinocultura, sendo a presença dos cactos indesejada. As outras localidades amostradas (Cantagalo-PR, Rio do Poço-PR e Segredo-PR) também sofrem acentuada ação antrópica, porém com cultivo de grãos, ficando os cactos em aglomerados geralmente associados a regiões rochosas, sendo estes locais de difícil acesso pelas máquinas.

Atualmente as populações de *D. antonietae* estão geograficamente isoladas, formando verdadeiras ilhas continentais (Mateus e Sene, 2003) provavelmente em decorrência dos ciclos de glaciação dos períodos Terciário e Quaternário (Bigarella *et al.*, 1975; Vanzolini, 1981; Brown e Gibson, 1983; Ab'Saber, 2000). Em períodos quentes e úmidos as populações de cactos estariam restritas pelas florestas tropicais à região litorânea e ao longo dos vales dos rios (provavelmente o caso de *Cereus hildmaniannus*, cacto hospedeiro de *D. antonietae* – Monteiro, 1997; Mateus, 2001). Porém estes processos naturais resultaram em tamanhos populacionais suficientes para manutenção da sobrevivência de ambas as espécies (cactos e drosofilídeos). A formação de fragmentos de mata em áreas de cultivo nas últimas décadas não considera estes critérios ecológicos. Este fator, de ordem antrópica, também deve ser considerado para explicar a distribuição da variabilidade genética no presente trabalho.

Dentro do processo evolutivo, a variabilidade genética de uma população fornece a base para as modificações ao longo do tempo, permitindo que as populações se diferenciem dos seus ancestrais (Strickberger, 2000). Desta forma, estudos da variabilidade em populações naturais são altamente importantes para o entendimento da história evolutiva de uma espécie.

Nossos dados mostraram um polimorfismo genético de 100%, e frequências alélicas com desvios do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que estas possivelmente não são mantidas por mutações recorrentes. Como a variabilidade genética é base para o processo evolutivo, esse desvio do equilíbrio pode ser causado por um fator evolutivo, ou a soma deles: fluxo gênico, seleção natural, deriva genética e/ou endogamia.

A heterozigosidade média observada para cada população ficou abaixo da heterozigosidade média esperada. Porém a média geral, considerando as três populações dentro da Análise Regional, foi de 0,4614. Este valor ficou acima da média detectada para drosófilas cactofílicas ($H_o = 0,087$) e não cactofílicas ($H_o = 0,160$), como seria esperado para alozimas (revisão de Zouros, 1973; Johnson, 1974; Barker e Mulley, 1976; Moraes e Sene, 2002). Assim como a calculada para *D. antonietae*, também com alozimas ($H_o = 0,2242$ – Mateus e Sene, 2003). O valor obtido neste trabalho ficou acima também dos obtidos recentemente, pelo nosso grupo, na análise de uma espécie não cactófila, de ocorrência em matas, no estado do Paraná, *Drosophila mediopunctata*. A heterozigozidade média observada para esta espécie ficou entre 0,130 e 0,250 (Cavasini, 2009). Por outro lado, a heterozigozidade observada obtida neste trabalho está próxima, mas ainda acima da obtida por Machado (2003), utilizando o marcador microssatélite em *D. antonietae* ($H_o = 0,3835$).

O índice de fixação (F) quantifica o efeito do endocruzamento, causado pela estruturação de populações, e é medido pela redução na heterozigosidade esperada pela panmixia. O índice F_{is} , que representa o decréscimo intrapopulacional na heterozigosidade, demonstrou que há uma deficiência de heterozigotos muito alta dentro das populações analisadas (0,2561). Este resultado sugere a ação conjunta ou individual de alguns fatores, tais como, deriva genética, endogamia, efeito de Wahlund, cruzamentos preferenciais, alelos nulos e/ou seleção contra heterozigotos.

Kimura e Crow (1963) propuseram que em populações panmíticas os índices

Fis deveriam ser negativos. Nossos resultados evidenciaram um *locus* com *Fis* negativo (Haellanto-4), e para os outros *loci* ocorreu variação entre alta e muito alta deficiência de heterozigotos dentro das populações (Tabela 8). Estes resultados divergem do que seria esperado para populações endogâmicas, pois diferentes valores de *Fis* foram observados para cada *locus*. O esperado seria que a endogamia afetasse de forma semelhante todos os *loci*. Além disso, Mateus e Sene (2003) demonstraram a não ocorrência de cruzamentos endogâmicos para *D. antonietae*, utilizando dados obtidos de amostras provenientes de moscas adultas que eclodiram de um único cladódio.

O efeito Wahlund pode ser uma causa comum de deficiência de heterozigotos em estudos de genética de populações (Johnson e Black, 1984). Tal efeito pode ser observado em dois casos: 1) o padrão encontrando pode ser resultado do agrupamento de moscas de diferentes gerações numa única amostra, ou 2) se as subpopulações forem consideradas em conjunto como uma única população, ou seja, existe uma estruturação populacional em habitats que foram naturalmente fragmentados, ou as áreas favoráveis são intermediadas por regiões desfavoráveis, ou ainda, ocorreu fragmentação posterior das áreas favoráveis. Como as populações dentro da Análise Regional estão geograficamente isoladas, apenas o primeiro caso poderia explicar a deficiência de heterozigotos detectada, não podendo ela ser descartada.

Outra causa provável de deficiência de heterozigotos é a ocorrência de alelos nulos. A presença destes pode ser comum dentro das amostras (por exemplo, os trabalhos de Van Treuren, 1998; e McGoldrick *et al.*, 2000). A fixação de um alelo nulo é responsável pela maioria das falhas nos experimentos de amplificação (Callan *et al.*, 1993). Os alelos nulos são alelos que não amplificam quando segregantes com outro alelo, resultando em falso homozigoto. A amplificação de dois alelos para o *locus* Haellanto-2 em apenas quatro indivíduos (dois do Rio do Poço e dois de Cantagalo) é uma evidência da presença de alelos nulos para este *locus* em específico. Segundo Machado (2003), a presença de alelos nulos pode explicar a não amplificação dos *loci* de *Drosophila buzzatii* em *D. antonietae*. Machado *et al.* (2010), numa análise dos sete loci de microssátelites para *D. antonietae* utilizados neste trabalho, verificaram a presença de alelos nulos para o *locus* AluRSAlanto-6. Ainda segundo Machado *et al.* (2010), foi verificada a presença de homoplasia de tamanho, e ambos parecem não representar problemas

significativos para as análises de genética populacional em *D. antonietae*, devido à grande quantidade de variabilidade nos *loci* de microssatélites, pois esta pode compensar a baixa frequência dos mesmos nas populações investigadas. Porém, para as três populações analisadas aqui, a presença de alelos nulos foi um fator importante que evitou a inclusão do *locus* Haelllanto-2 nas análises populacionais dentro da Análise Regional.

Outro evento que pode estar levando a deficiência de heterozigotos nestas populações é a seleção natural contra os heterozigotos. Considerando que seleção natural é sobrevivência e reprodução diferencial de genótipos mais bem adaptados, seria necessário mensurar estatisticamente o valor adaptativo relativo do heterozigoto ao longo das gerações. Nossos dados não permitem esta avaliação, mas em estudos realizados por Mateus e Sene (2003) foi verificada a possível ação da seleção natural em *D. antonietae* através da análise da variação temporal e espacial aloenzimática. Posteriormente, Mateus e Sene (2007) apontaram a seleção natural como um possível fator de atuação na prevenção da divergência genética entre as populações. Machado (2003) testou a ocorrência de um possível efeito carona entre 7 *loci* de microssatélites e 10 isoenzimáticos em *D. antonietae*, e através da análise realizada desconsiderou a possibilidade de ocorrência de tal efeito entre estes dois marcadores. Porém, não foi descartada a hipótese de que *loci* de microssatélite estejam sofrendo um efeito carona de seleção natural estabilizadora em algum outro sistema genético ao qual os *loci* de microssatélite estejam ligados, mantendo o nível de variabilidade e impedindo a divergência entre as populações.

O desequilíbrio de ligação gamético é um fator que pode influenciar o padrão de variabilidade em populações naturais. Ele ocorre quando dois genes estão muito próximos em um cromossomo, sem dissociação gamética, sendo transmitido à progênie como um par. Mesmo que os *loci* não estejam ligados fisicamente em um cromossomo, eles podem ser funcionalmente relacionados ou ainda estar sobre o efeito de seleção e assim ser transmitidos como um par, assim o desequilíbrio gamético cria uma pseudo-replicata para análise de *loci*. Como já citado, os *loci* de microssatélite geralmente estão presentes em regiões intergênicas do genoma, porém podem estar associados a estas regiões (Bachtrog, 1999), que podem estar sob a ação da seleção natural. Machado (2003), na análise de 12 populações naturais, verificou a não ocorrência de desequilíbrio gamético nos *loci* de

microsatélite utilizados no presente trabalho em *D. antonietae*, portanto este não deve ser um fator atuante neste caso.

Populações naturais podem apresentar deficiência de heterozigotos também em decorrência de cruzamentos preferências. Para o cluster *D. buzzatii*, Machado *et al.* (2002) em análise de corte, observaram que os machos do grupo cortejam as fêmeas independentemente delas serem da mesma espécie. Kelly e Noor (1996) também observaram o mesmo padrão em estudos de especiação em *Drosophila*. Seria necessária a análise em relação ao comportamento das fêmeas que poderiam estar selecionando os machos. Mas as evidências dão indícios da não ocorrência de cruzamentos preferências não só para o cluster *D. buzzatii*, e sim para o gênero *Drosophila* em geral.

O F_{st} mede o efeito da estruturação das populações sobre a diversidade genética. O valor obtido para este índice na Análise Regional foi de 0,0491, indicando uma baixa diferenciação entre as populações analisadas. Esta diferenciação (F_{st}) é menor do que a observada em análise microgeográfica realizada em *D. mediopunctata* em regiões de fragmentos de Mata de Araucária no estado do Paraná ($F_{st} = 0,066$ no inverno - Cavasini, 2009), indicando um padrão menor de diferenciação para *D. antonietae*. Mas o índice é maior do que a diferenciação observada, por Mateus e Sene (2003), para *D. antonietae* em análise intrapopulacional em dimensão temporal e espacial através de isoenzimas ($F_{st} = 0,0355$ e $0,0023$ respectivamente), sugerindo que há estruturação das populações analisadas. Já em relação às análises macrogeográficas para *D. antonietae*, o índice de diferenciação observado no presente trabalho foi um pouco inferior aos obtidos para isoenzimas ($F_{st} = 0,0723$ - Mateus e Sene, 2007) e microsatélites ($F_{st} = 0,0730$ - Machado, 2003). Os índices de distância de Reynolds *et al.* (1983) (Tabela 7) demonstraram valores condizentes ao F_{st} , representando o nível de identidade entre as populações.

O fluxo gênico é um fator que pode levar a diminuição da diferenciação entre populações, e o compartilhamento de alelos aumenta a variabilidade genética dentro das populações, considerando que o tamanho das subpopulações não seja pequeno a ponto da deriva genética ser importante. Conforme observado, existe um alto polimorfismo e alta diversidade dentro das populações avaliadas, e baixa diferenciação entre as mesmas.

Fluxo gênico foi sugerido por Monteiro e Sene (1995) como o fator promotor

da baixa diferenciação observada na morfologia de edeago em populações isoladas geograficamente de *Drosophila antonietae*. Porém, a distância geográfica entre as populações leva ao questionamento da possibilidade de ocorrência de fluxo gênico atual entre elas. Mateus e Sene (2007), com estudo isoenzimático, indicaram certa diferenciação geográfica nas populações de *D. antonietae*, separando populações do alto da bacia dos rios Paraná-Uruguai da parte baixa. O mesmo foi observado por Manfrin *et al.* (2001) e de Brito *et al.* (2002), através de haplótipo de DNA mitocondrial, e Esguicero (2006), através de morfologia de asa.

Em decorrência da associação entre *D. antonietae* ao cacto *Cereus hildmaniannus*, distribuído principalmente ao longo do curso dos rios, o que se propõe é a possibilidade da existência de fluxo gênico histórico entre as populações através de corredores ao longo da distribuição das cactáceas, sendo assim dificultado um processo de diferenciação entre elas (Monteiro e Sene, 1995; Machado, 2003; Mateus e Sene, 2007). Manfrin e Sene (2006) discutem esta associação cactofílica do cluster *D. buzzattii* como um aspecto importante, indagando a questão adaptativa em relação a *D. antonietae* e *Cereus hildmaniannus*. Pela existência desta especificidade ecológica, populações de drosófilas cactófilas devem ter acompanhado as expansões e retrações das áreas xerofíticas causadas pelas mudanças paleoclimáticas cíclicas com atual distribuição conseqüente do último ciclo de glaciação e também decorrente de ciclos anteriores no Período Terciário. Essas mudanças cíclicas, agindo como agente vicariante, seriam fatores atuantes no quadro evolutivo observado (Sene *et al.*, 1988).

Apesar da alta identidade entre as populações, foi verificada a existência de alelos exclusivos para 2 dos 7 *loci* avaliados. Cantagalo e Segredo foram as populações que mais divergiram em relação aos alelos e também na distância de Reynolds *et al.* (1983). Rio do Poço e Cantagalo apresentaram a menor distância (Tabela 7). Na análise de agrupamento foi possível verificar a população do Rio do Poço, apesar de estar localizada na cabeceira do rio Cavernoso, ela ficou intermediária a Cantagalo e Segredo (Figura 4). Esta ausência de padrão entre o posicionamento geográfico e as distâncias genéticas foi comprovada pela não significância estatística da correlação entre as matrizes de distâncias genéticas e físicas através do teste de Mantel.

Assim, os resultados obtidos através dos *loci* de microssatélites da porção média da bacia do rio Iguaçu, afluente do rio Paraná, não deixam de ser

congruentes aos obtidos através de outros marcadores para populações naturais de *Drosophila antonietae*, isto é, alta diversidade intrapopulacional e baixa diferenciação interpopulacional.

Análise Macrogeográfica

Drosophila antonietae, espécie associada ao cacto *Cereus hildmaniannus*, tem uma distribuição geográfica principalmente ao longo do curso dos rios, fator que possibilitaria a existência de fluxo gênico entre as populações e dificultaria um processo de diferenciação entre elas (Monteiro e Sene, 1995; Tidon-Sklorz e Sene, 2001; Machado, 2003; Mateus e Sene, 2003). Esta hipótese foi sugerida através de informações de marcadores independentes (Monteiro e Sene, 1995; Machado, 2003; Mateus e Sene, 2007). Nossos dados incluem, entre essas informações, a região do curso médio da bacia dos rios Paraná-Uruguai, através de um marcador seletivamente neutro, os microsatélites.

Nossos dados indicam que as populações apresentaram *loci* fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 11) e, portanto, devem estar sob a ação dos processos evolutivos já discutidos acima. No caso do fluxo gênico, este tem sido proposto como fator gerador da homogeneidade genética observada para as populações naturais de *Drosophila antonietae*. Segundo Markow e Castrezana (2000), drosofilídeos não dispersam para muito longe das regiões xerofíticas, sendo este um limitante para o fluxo gênico. Mateus e Sene (2007) argüem que, pela existência da especificidade ecológica e em decorrência das mudanças paleoclimáticas cíclicas, isto é, ciclos climáticos frio/seco e do quente/úmido do Quaternário (Bigarella *et al.*, 1975; Ab'Saber, 2000), a vegetação xerofítica ficou restrita as florestas do litoral e vales dos rios com solos de baixa umidade, como é o caso de *Cereus hildmaniannus*. Manfrin e Sene (2006) discutem ainda que durante os períodos frio/seco, as populações de cactos podem ter expandido e o quadro atual é decorrente não somente do último ciclo de retração. Mateus e Sene (2007) sugerem então que a homogeneidade pode ser decorrente da manutenção do polimorfismo ancestral dos períodos de expansão xerofítica, onde deve ter ocorrido fluxo gênico entre as populações, com posterior ação de seleção natural estabilizadora, levando ao padrão de homogeneidade encontrado.

Encontramos, entre as 14 populações analisadas, uma diferenciação

genética moderada ($F_{st} = 0,1115$ – Tabela 12), e índices de distâncias genéticas (Reynolds *et al.*, 1983) representativo desta diferenciação moderada (menor distância = $-0,0015$; maior distância = $0,4461$ – Tabela 13). A distância de Reynolds *et al.* (1983) evidenciou ainda, como mais semelhantes, as populações do alto e baixo da bacia, ficando mais distantes as populações localizadas na porção média (Tabela 13). Estes dados estão de acordo com a similaridade genética das populações de *Drosophila antonietae*, porém novamente não corroboram que esta similaridade seja contínua ao longo da bacia dos Rios Paraná-Uruguai, pois a porção média apresentou maior distância assim como a maior variabilidade genética.

A análise de agrupamento, realizada por de Brito *et al.* (2002), separou as populações *Drosophila antonietae* do sul, das populações do norte, mas não pode discriminar entre fragmentação no passado e fluxo gênico restrito com isolamento pela distância, devido a não amostragem dos indivíduos de populações situadas entre essas duas regiões. A Análise Macrogeográfica realizada no presente trabalho contemplou todas as regiões, porém não evidenciou uma associação clara entre localização dentro da bacia dos rios Paraná-Uruguai (Figura 5) e as distâncias genéticas. Os dados de correlação entre as distâncias genéticas e físicas, através do teste de Mantel, também não foram significativos, indicando que não há correlação entre os mesmos. Estes dados estão em consonância com o proposto para homogeneidade genética até o presente momento para *D. antonietae*. Machado *et al.* (2010), através do marcador microssatélite, também não detectaram estruturação entre populações do alto e da porção baixa da bacia dos rios Paraná-Uruguai, como encontrado para DNA mitocondrial por de Brito *et al.* (2002).

Pode ser levantada a hipótese de que a homogeneidade e alto índice de polimorfismo nas populações naturais de *D. antonietae* sejam decorrentes de uma manutenção histórica de polimorfismos compartilhados, conforme proposto por Mateus e Sene (2007). Por outro lado, os nossos dados parecem indicar que está havendo uma diversificação incipiente, que pode ser em resposta adaptativa regional, ou simplesmente por eventos estocásticos.

Desta forma, os eventos que subdividiram as populações de *Drosophila antonietae* podem ser resultado de retrações das áreas xerofíticas que ocorreram durante os ciclos paleoclimáticos do Terciário e Quaternário (Bigarella *et al.*, 1975; Ab'Saber, 2000), associadas a fragmentação recente por ação humana. A cada

retração, as populações remanescentes podem ter mantido o polimorfismo da população ancestral através de vários fatores não excludentes: 1) por apresentarem tamanho efetivo populacional grande (Mateus e Sene, 2003), diminuindo a ação da deriva genética; 2) pelo tempo de divergência entre as populações não ter sido suficiente (Manfrin e Sene, 2006; Mateus e Sene, 2007), e; 3) os marcadores microssatélites estariam sofrendo um efeito “carona” de seleção natural em outros sistemas genéticos, com a provável exceção de isoenzimas (Machado, 2003). Fluxo gênico atual ou recente entre as populações parece não ser o caso, pois o teste de Mantel, realizado neste trabalho, não demonstrou correlação entre posicionamento geográfico e diferenciação genética. Porém, um fluxo gênico histórico poderia explicar os resultados obtidos, pois a distribuição das cactáceas ao longo dos vales dos rios da bacia Paraná-Uruguaí teria formado corredores por onde pode ter ocorrido fluxo gênico entre as populações de *Drosophila antonietae*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa de Mestrado. A CAPES, FINEP, CNPq e UNICENTRO pelo auxílio. Aos colegas de laboratório pela ajuda nos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados do capítulo sobre a estrutura da comunidade de drosofilídeos em um fragmento de Mata de Araucária (Capítulo I), foi possível ampliar o conhecimento sobre a composição de fauna de drosofilídeos em região de Mata Atlântica, analisar especialmente a diversidade de drosofilídeos em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista do sul do Brasil, investigar a riqueza e diversidade sazonal de espécies de drosofilídeos deste fragmento, e inferir aspectos ecológicos sobre a composição faunística de áreas fragmentadas. Assim, estes dados podem servir como base para futuros projetos de conservação do bioma Floresta Ombrófila Mista, uma vez que este se encontra em intenso processo de degradação.

Os dados obtidos através do marcador DNA microssatélite para populações naturais de *Drosophila antonietae*, analisados no Capítulo II deste trabalho, possibilitou: caracterizá-las dentro do contexto da história evolutiva desta espécie, ampliando o conhecimento da estrutura populacional e da variabilidade genética de suas populações naturais; inferir o efeito dos fatores evolutivos no padrão obtido, através da análise da estatística F de Wright, e; correlacionar os dados sobre *Drosophila antonietae* do alto, médio e baixo curso da bacia dos rios Paraná-Uruguai, com a finalidade de inferir eventos históricos e ecológicos que determinam o padrão evolutivo da espécie em estudo.

A análise relacionando as distâncias genéticas com distâncias geográficas e ecológicas mostrou que não há evidência de fluxo gênico atual através dos rios em menor escala, conforme proposto por estudos realizados previamente em grande escala de distribuição das populações analisadas. Porém, foi possível demonstrar que há uma similaridade entre as mesmas. As hipóteses para explicar esta homogeneidade ao longo da distribuição de *Drosophila antonietae* envolvem fluxo gênico histórico, provavelmente ao longo do curso dos rios, e a manutenção da identidade entre as populações seria resultado de seleção natural estabilizadora e manutenção de polimorfismo ancestral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfol.*, v. 52, p.1-23, 1977.
- AB'SABER, A. N. A Serra do Japi, sua origem geomorfológica e a teoria dos refúgios.. In: Morellato, L.P.C. (ed.). *História Natural da Serra do Japi*, Editora da Unicamp, Fapesp, Campinas, p. 12-23, 1992.
- AB'SABER, A. N., Spaces occupied by the expansion of dry climates in South America during the Quaternary ice ages. *Revista do Instituto Geológico*, São Paulo. 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. *Anim Genet.*, v. 35, p. 285-292, 2004.
- ALFORD, A. R., RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 3, p. 133-165, 1999.
- AMOS, W. A. A comparative approach to the study on microsatellite evolution. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK, p.66–79, 1999.
- ANGERS B., ESTOUP A., JARNE P. Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncates*. *Molecular Biology and Evolution*, v. 17, p. 1926-1932, 2000.
- ARMOUR, J. A. L, ALEGRE, S. A., MILES, S., WILLIAMS, L. J., BADGE, R. M. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Goldstein D. B., Schlötterer C, (eds). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 24–33. 1999.
- ASANO, H., KOBAYASHI, T., UCHIDA, K., HAYASHI, S., YOKOYAMA, I., INOKO, H., TAKAGI, H. Significance of tumor necrosis factor microsatellite polymorphism in renal transplantation. *Tissue Antigens*, v.50, p.484-488, 1997.
- BÄCHLI, G. 2010. TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Consulted on-line in march 2009. Available at: <http://taxodros.unizh.ch/>. [accessed on 27/04/2009]
- BÄCHLI, G. Family Drosophilidae. In: Papp, L., Darvas, B. (eds). *Contributions to a Manual of Palearctic Diptera*. 3. ed. Higher Brachycera. Science Herald, Budapest, 1998.

-
- BACHTROG, D., WEISS, S., ZANGERL, B., BREM, G., SCHLÖTTERER, C. Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p. 602-610, 1999.
- BAIMAI, V., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. P., Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus - breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v. 60, p. 81-92, 1983.
- BALLARD, D., PHILLIPS, C., WRIGHT, G., THACKER, C., ROBSON, C., REVOIR, A., COURT, D. A study of mutation rates and the characterization of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs. *Forensic Sci. Int.*, v. 155, p. 65-70, 2005.
- BARKER, J. S. F., MULLEY, J. C. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, v. 30, p. 213-233, 1976.
- BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L., HEINZELMANN, L. S., OLIVEIRA, R. P., CHEMALE, G. Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, v. 126, p. 599-605, 2003.
- BEGON, M. HARPER, J. L., TOWNSEND, C. R. Ecology: individuals, populations and communities. Third edition. *Blackwell Sciences Ltd*, Oxford, UK, 1996.
- BEPPU K. Ecological structure of drosophilid assemblage in a subalpine coniferous forest. *New Entomologist*. v. 34, p. 1-10, 1985.
- BEVEN, S., CONNOR, R. F., BEVEN, K. Avian biogeography in the Amazon basin and the biological model of diversification. *J. Biogeografic*, v. 11, p. 383-399, 1984.
- BIGARELLA, J. J., ANDRADE-LIMA, D., RIEHS, P. J. Considerações a respeito das mudanças paleoclimáticas na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v. 41, p. 411-464, 1975.
- BIZZO, N. M. V., SENE, F. M. Studies on the natural populations of *Drosophila* from Peruíbe (SP), Brazil (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 42, p. 539-544, 1982.
- BOWCOCK, A. M., RUIZ-LINARES, A., TOMFOHRDE J., MINCH, E., KIDD, J. R., CAVALLI-SFORZA, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, v. 368, p. 455-457, 1994.
- 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 Evolutionsforschung*, v. 23, p. 90-100. 1985.

-
- BROWN, J. H., GIBSON, A. C. *Biogeography*. St. Louis. C.V. Mosby Company, 643 p., 1983.
- BROWN, J. H., KODRIC-BROWN, A. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. *Ecology*, v. 58, p. 445-449, 1977.
- BUSCHINI, M. L. T. Life-history and sex allocation in *Trypoxylon* (syn. *Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 45, p. 206-213, 2007.
- BUSCHINI, M. L. T., WOISKI, T. D. Alpha-beta diversity in trap-nesting wasps (Hymenoptera: Aculeata) in Southern Brazil. *Acta Zoologica (Stockholm)*, v. 89, p. 351-358, 2008.
- BUSCHINI, M. L. T., WOLFF, L. L., NIESING, F. Nesting biology of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae) in trap-nests in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, p. 161-171, 2006.
- CALLAN, D. F., THOMPSON, A. D., SHEN, Y., PHILLIPS, H. A., RICHARDS, R. I., MULLEY, J. C., SUTHERLAND, G. R. Incidence and origin of null alleles of the (AC)_n microsatellite markers. *Ann. J. Hum. Genet.*, v. 52, p. 922-927, 1993.
- CASTELLA, P. R., BRITZ, R. M. A Floresta com Araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais. MMA, Brasília, 236p., 2004.
- CASWELL, H. Matrix population models: construction, analysis, and interpretation. Sinauer Associates, Sunderland, 722 p., 2001.
- CAVASINI, R. Aspectos ecológicos e genéticos no gênero *Drosophila* relacionados à fragmentação da Floresta de Araucária. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava/Paraná. 114p., 2009.
- CHAKRABORTY, R., KIMMEL, M. Statistics of microsatellite loci: Estimation of mutation rate and pattern of population expansion. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, Oxford University Press, Oxford, p.139-150, 1999.
- CHAMBERS, G. K., MACAVOY, E. S. Microsatellites: Consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 126, p. 455-476, 2000.
- CHAPIN III, F. S., ZABALETA, ES, EVINER, VT, NAYLOR, RL, VITOUSEK, PM, REYNOLDS, H. L., HOOPER, D. U., LAVOREL, S., SALA, O. E., HOBBIE, S. E., MACK, M. C., DÍAZ, S. Consequences of changing biodiversity. *Nature*, v. 405, p. 234-242, 2000.
- CHAVES, N. B., TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera,

- Drosophilidae) of the Brazilian savanna. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, p. 340-348, 2008.
- CONNEL, J. H. Diversity in tropical rain forest and coral reefs. *Science*, v. 199, p. 1302-1310, 1978.
- da MATA, R. A., MCGEOCH, M., TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. *Biodiversity and conservation*, v. 17, p. 2899-2916, 2008.
- de BRITO, R. O. A., MANFRIN, M. H., SENE, F. M. Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. *Mol. Phyl. Evol.*, v. 22, p.131-143, 2002.
- de TONI, D. C., GOTTSCHALK, M. S., CORDEIRO, J., HOFMANN, P. P. R., VALENTE, V. L. S. Study of the Drosophilidae (Diptera) Communities on Atlantic Forest Islands of Santa Catarina State, Brazil. *Neot. Ent.*, v. 36, p. 356-375, 2007.
- DETTMAN, J. R., TAYLOR, J. W. Mutation and evolution of microsatellite loci in *Neurospora*. *Genetics*, v. 168, p.1231–1248, 2004.
- DEVRIES, P. J., WALLA, T. R. Species diversity and community structure in neotropical fruit-feeding butterflies. *Biol. J. Linnean. Soc.*, v. 74, p. 1-15, 2001.
- DEVRIES, P. J., WALLA, T. R., GREENEY, H. F. Species diversity in spatial and temporal dimensions of fruit-feeding butterflies from two Ecuadorian rainforests. *Biol. J. Linn. Soc.*, v. 68, p. 333-353, 1999.
- DIDHAM, R. K., GHAZOUL, J., STORK, N. E., DAVIS, A. J.. Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, p. 255-260, 1996.
- DIERINGER, D., NOLTE, V., SCHLÖTTERER, C. Population structure in African *Drosophila melanogaster* revealed by microsatellite analysis. *Mol Ecol.*, v. 14, p. 563-573, 2005.
- DOBSON, A. Monitoring global rates of biodiversity change: challenges that arise in meeting the convention on Biological Diversity (CBD) 2010 goals. *Philos Trans R Soc B*, v. 360, p. 229–241, 2005.
- DOBZHANSKY, T, PAVAN C. Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *Journal of Animal Ecology*, v. 19, p. 1–14. 1950.
- 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.

- DOKHOLYAN, N. Y., BULDYREV, S. V., HAVLIN, S., STANLEY, H. E. Distributions of dimeric tandem repeats in noncoding and coding DNA sequences. *J. Theor. Biol.*, v. 202, p. 273-282, 2000.
- DUMONT, H., Biodiversity: a resource with a monetary value? *Hydrobiologia*, v. 542, p. 11-14, 2005.
- EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. (eds.). *Microsatellites: Evolution and applications*, Oxford University Press, Oxford, UK, p. 34-48, 1999.
- ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.*, v. 16, p. 551-558, 2000.
- ESGUÍCERO, A. L. H. Estudo taxonômico e evolutivo em populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCL USP, 48p., 2006.
- ESTOUP, A., CORNUET, J-M. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. (eds.). *Microsatellites: Evolution and applications*, Oxford University Press, UK, p. 49-65, 1999.
- FERREIRA, L. B., TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodiversity and Conservation*, v. 14, p. 1809–1821, 2005.
- FAGERBERG, A. J., FULTON, R. E., BLACK, W. C. Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, v. 10, p. 225–236, 2001.
- FONTDEVILA, A., PLA, C., HASSON, E., WASSERMAN, M., SANCHEZ, A., NAVEIRA, H., RUIZ, A. *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecie taxon. Fontdevila, A., Pla, C., Hasson, E., Wasserman, M., Sanchez, A., Naveira, H., Ruiz, A. (eds.). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 81, p. 380–385, 1988.
- 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. *Mol Ecol.*, v. 13, p. 2317-2331, 2004.
- FRANCISCO, F. O., BRITO, R. M., ARIAS, M. C. Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae,

-
- Meliponini. *Neotropical entomology*, v. 35, p. 638- 643, 2006.
- 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 Paranaensis*; v.10, p. 253-326, 1954.
- FRYDENBERG, J., PERTOLDI, C., DAHLGAARD, J., LOESCHCKE, V. Genetic variation in original and colonizing *Drosophila buzzatii* populations analysed by microsatellite loci isolated with a new PCR screening method. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 181-190, 2002.
- 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.
- GOLDSTEIN, D. B., CLARK, A. G. Microsatellite variation in North America populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p.3882-3886, 1995.
- GOLDSTEIN, D. B., POLLOCK, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.*, v. 88, p. 335-342, 1997.
- GOMEZ-UCHIDA, D., BANKS, M. A. Microsatellite analyses of spatial genetic structure in darkblotched rockfish (*Sebastes crameri*): is pooling samples safe? *Can. J. Fish. Aquat. Science*, v. 62, p. 1874-1886, 2005.
- GOTTSCHALK, M. S., de TONI, D. C., VALENTE, V. L. S., HOFMANN, P. R. P. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanization gradient. *Neotropical entomology*, v. 36, p. 848-862, 2007.
- GRUMBLING, G., STRELETS, V. FlyBase: anatomical data, images and queries. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. D484-D488, 2006.
- HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (eds.). *Microsatellites Evolution and Applications*, Oxford University Press, Oxford, UK, p. 1-9, 1999.
- HARRISON, S., BRUNA, E. Habitat fragmentation and large-scale conservation: What do we know for sure? *Ecography*, v. 22, p. 225-232, 1999.

- HEED, W. B. The origin of *Drosophila* in the Sonoran Desert. In: Barker, J. S. F., Starmer, W. T. (eds.). *Ecological genetics and evolution: The cactus-yeast-Drosophila model system*, Academic, Sydney, p. 65-80, 1982.
- HELTSHE, J. F., FORRESTER, N. E. Estimating diversity using quadrat sampling. *Biometrics*, v. 39, p. 1073-1076, 1983.
- HEYER, E., PUYMIRAT, J., DIELTJES, P., BAKKER, K., KNIJFF, P. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum Mol Gen.*, v. 6, p. 799-803, 1997.
- HUECK, K. As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica. *Polígono*, São Paulo, 466 p., 1972.
- 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.
- HUTTER, C. M., SCHUG, M. D., AQUADRO, C. F. Microsatellite variation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: a reciprocal test of the ascertainment bias hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, p. 1620-1636, 1998.
- IRVIN, S. D., WETTERSTRAN, K. A., HUTTER, C. M., AQUADRO, C. F. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: evidence for founder effects in new world populations. *Genetics*, v. 150, p. 777-790, 1998.
- JEFFREYS, A. J., TAMAKI, K., MACLEOD, A., MONCKTON, D. G., NEIL, D. L., ARMOUR, J. A. L. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*, v. 6, p. 136-145, 1994.
- JOHNSON, G. B. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science*, v. 184, p. 28-37, 1974.
- JONES, M. E., SHEPHERD, M., HENRY, R., DELVES, A. Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, v. 4, p.37-47, 2008.
- JONHSON, M. S., BLACK, R. The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria sp.* *Marine Biology*, v. 79, p. 295-302, 1984.
- KAPOS, V. Effects of isolation on the water status of forest patches in the Brazilian Amazon. *J. Trop. Ecol.*, v. 5, p. 173-185, 1989.

-
- KASHI, Y., KING, D., SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, v. 13, p. 74-78, 1997.
- KATTI, M. V., RANJEKAR, P. K., GUPTA, V. S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v. 18, p.1161–67, 2001.
- KELLER, I., LARGIADÈR, C. R. Recent habitat fragmentation due to major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. *Proceedings of the Royal Society London*, v. 270, p. 417-423. 2003.
- KELLY, J. K., NOOR, M. A. F. Speciation by reinforcement: a model derived from studies of *Drosophila*. *Genetics*, v.143, p.1485-1497, 1996.
- 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.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, v. 217, p. 624-626, 1968.
- KIMURA, M., CROW, J. F. The measurement of effective population number. *Evolution*, v.17, p. 279-288, 1963.
- KIMURA, M., OHTA, T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, v.229, p. 467-469, 1971.
- KING, L., JUKES, T. Non-darwinian evolution. *Science*, v. 164, p. 788-789, 1969.
- KIVINIEMI, K.. Effects of fragment size and isolation on the occurrence of four shortlived plants in semi-natural grasslands. *Acta Oecol.*, v. 33, p. 56-65, 2008.
- LABORDA, P. R., KLACZKO, L., SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. *Conservation Genetics Resources*, v. 1, p. 1-17, 2009.
- LEITE, P. E., KLEIN, R. M. Vegetação. In: IBGE (ed.). *Geografia do Brasil: Região Sul*, Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia, Rio de Janeiro, vol. 2, p. 112-150, 1990.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanisms for DNA sequence evolution. *Molec. Biology and Evolution*, v. 4, p. 203-221, 1987.
- LEWIS, P. O., ZAYKIN, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet and mutation. In: Fundamentals from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>

-
- LI, W-H., GRAUR, D. Gene structure of Molecular Evolution. 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.
- 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, n. 3, p. 398-401, 1989.
- LOVEJOY, T. E. Foreword. In: Soulé, M. E., Wilcox, B. A. (eds.). *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*, Sinauer Associates, Sunderland, p.5-9, 1980.
- LOYOLA, R. D., MARTINS, R. P. Trap-nest occupation by solitary wasps and bees (Hymenoptera: Aculeata) in a forest urban remanent. *Neot Entomology*, v. 35, p.41-48, 2006.
- LUCKY, A., ERWIN, T. L., WITMAN, J. D. Temporal and spatial diversity and distribution of arboreal *Carabidae* (Coleoptera) in a western Amazonian rain forest. *Biotropica*, v. 34, p. 376– 386, 2002.
- LUDWIG, J., REYNOLDS, J. F. *Statistical Ecology*. John Wiley and Sons, New York, 339 p., 1988.
- LUMME, J., LAKOVAARA, S., MUONA, O., JARVINEN, O. Structure of boreal community of drosophilids (Diptera). *Aquilo Ser. Zool.*, v. 20, p. 65-73, 1979.
- MACARTHUR, R. H. Patterns of species diversity. *Bio.Rev.*, v. 40, p. 510 -533, 1965.
- MACHADO, L. P. B. Descrição e análise de *loci* de microssatélites em populações naturais da espécie cactofílica *Drosophila antonietae* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE). Tese de Doutorado. FMRP. Universidade de São Paulo, 104p., 2003.
- MACHADO, L. P. B., CASTRO, J. P., RAVAZZI, L. M. Avaliation of the Courtship and of the Hybrid Male Sterility Among *Drosophila buzzatii* Cluster Species (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos - SP, v. 62, n. 4, p. 601-608, 2002.
- MACHADO, L. P. B., MANFRIN, M. H., SILVAJUNIOR, W. A., SENE, F. M. Microsatellite *loci* in the cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). *Mol. Ecol. 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, in press.
- MAGURRAN, A. E. Measuring Biological Diversity. Blackwell Science, Oxford, 256 p., 2004.
- MANFRIN, M. H., SENE, F. M. Cactophilic *Drosophila* in south America: a model for evolutionary studies. *Genetica*, v. 126, p. 57-75, 2006.
- MANFRIN, M. H., de BRITO, R. O. A., SENE, F. M., Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* cluster (Diptera: Drosophilidae) using mtDNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 94, p. 333-346, 2001.
- MARGULES, C. R., PRESSEY, R. L. Systematic conservation planning. *Nature*, v. 405, p. 243 – 253, 2000.
- MARINKOVIC, D., AYALA, F. J., ANDJELKOVIC, M. Genetic polymorphism and phylogeny of *Drosophila subobscura*. *Evolution*, v. 32, p. 164-173, 1978.
- MARKOW, T. A., CASTREZANA, S. Dispersal in cactophilic *Drosophila*. *Oikos*, v. 89, p. 378–386, 2000.
- MARTINS, M. Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). *Bol. Mus.*, v. 3, p. 195-218, 1987.
- MATEUS, R. P. *Variação isoenzimática em populações naturais de Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 127p., 2001.
- 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). *J. of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 45, p. 136-143, 2007.
- MATEUS, R. P., BUSCHINI, M. L. T., SENE, F. M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana–Paraguay River Basin. *Braz J Biol*, v. 66, p. 719–729, 2006a.
- MATEUS, R. P., CERON, C. R., MACHADO, L. P. B., SENE, F. M. Preliminary characterization of the rDNA ITS-1 internal transcribed spacer-1 in the *Drosophila*

- buzzatii* cluster species (Diptera: Drosophilidae). *Ambiência*, v. 2, p. 89-96, 2006b.
- MATOS, J. A., YAMANAKA, C. N., CASTELLANI, T. T., LOPES, B. C. Comparação da fauna de formigas de solo em áreas de plantio de *Pinus elliottii*, com diferentes graus de complexibilidade estrutural (Florianópolis, SC.). *Biotemas*, v. 7, p. 57-64, 1994.
- MAYR, E. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, 797 p., 1963.
- McGOLDRICK, D. J., HEDGECOCK, D., ENGLISH, L. J., BAOPRASERTKUL, P., WARS, R.D. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research*. v. 19, p. 779-788, 2000.
- MEDEIROS, H. F. *Assembléias de Espécies de Drosophila* (Diptera; Drosophilidae) e Efeitos de Cursos d'Água sobre suas Distribuições em duas Matas de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia IB/UNICAMP, Campinas/SP, 98 p., 2000.
- MEDEIROS, H. F., KLACZKO, L. B. How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forests of São Paulo, Brazil? Species lists of three forest remnants. *Biota Neotropical*, v. 4, p. 1-12, 2004.
- MEGLECZ, E., ANDERSON, S. J., BOURGUET, D., BUTCHER, R., CALDAS, A., CASSEL-LUNDHAGEN, A., D'ACIER, A. C., DAWSON, D. A., FAURE, N., FAUVELO, C., FRANCK, P., HARPER, G., KEYGHOBADI, N., KLUETSCH, C., MUTHULAKSHMI, M., NAGARAJU, J., PATT, A., NIAN, F., SILVAIN, J. F., WILCOCK, H. R. Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Mol. Biol.*, v. 16, p. 175-185, 2007.
- 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 author, 1997.
- MMA. *Biodiversidade Brasileira. Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias para Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de benefícios da Biodiversidade Brasileira*. MMA/SBF, Brasília, 404 p., 2002.
- MONTEIRO, S. G., *Morfometria multivariada de populações naturais de Drosophila serido*, Tese de Doutorado, Depto. de Genética, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, 1997.

- MONTEIRO, S. G., SENE, F. M. Estudo morfométrico de populações de *Drosophila serido* das regiões central e sul do Brasil. *Revista Brasileira de Genética*, v. 18 (suplemento), 283 p., 1995.
- MORAES, E. M., SENE, F. M. Breeding structure in an isolated cactophilic *Drosophila* population from sandstone table hill. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 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. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v. 45, p.336-344, 2007.
- MORAES, E. M., SPRESSOLA, V. L., PRADO, P. R. R., COSTA, L. F., SENE, F. M. Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* v. 42, p. 1-5, 2004.
- MORATO, E. F., CAMPOS, L. A. O. Efeitos da fragmentação florestal sobre vespas e abelhas solitárias em uma área da Amazônia Central. *Review of Brazilian Zoology*, v. 17, p. 429–444, 2000.
- MORITZ, C. HILLIS, D. M. Molecular systematics: Context and controversies. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (eds.). *Molecular systematics*, Sinauer Associates, Massachusetts, 2nd edition, p.1-13, 1996.
- MUELLER, L. D., BARR, L. G., AYALA, F. J. Natural selection vs. random drift evidence from temporal variation in allele frequencies in nature. *Genetics*, v. 11, p. 517-554, 1985.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 10, p. 58-62, 1995.
- MYERS, N., MITTERMAYER, R. A., MITTERMAYER, C. G., FONSECA, G.A.B., KENT, J. Biodiversity spots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858. 2000.
- NASCIMENTO, H. E. M., LAURANCE, W. F. Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de floresta de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. *Acta Amaz.*, v. 36, p. 183-192, 2006.
- NELSON, B. W., FERREIRA, C. A. C., da SILVA, M. F., KAWASAKI, M. L., Endemism centres, refugia and botanical. *Collect. Dens. Braz. Amaz. Nat.*, v. 345, p. 714-716., 1990.
- NOOR, M. A., SCHUG, M., AQUADRO, C. F. Microsatellite variation in populations

-
- of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Genetical Research Cambridge*, v. 75, p. 25-35, 2000.
- O'GRADY, J. J., BROOK, B. W., REED, D. H., BALLOU, J. D., TONKYN, D. W., FRANKHAM, R. Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biol. Conserv.*, v.133, p. 42-51, 2006.
- PALMA, S. Contribución al estudio de los sifonoforos encontrados frente a la costa de Valparaíso. Aspectos ecológicos. In: *II Simpósio Latinoamericano Sobre Oceanografía Biológica*, University D'orient, Venezuela, p. 119– 133, 1975.
- 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.
- PATTERSON, J. T., WHEELER, M. R. Description of new species of the sub-genus *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. *Univ. Texas Publs.*, v. 4213, p. 67-109, 1942.
- PAUN, O., HORANDL, E. Evolution of Hypervariable Microsatellites in Apomictic Polyploid Lineages of *Ranunculus carpaticola*: Directional Bias at Dinucleotide Loci. *Genetics*, v. 174, p. 387–398, 2006.
- PAVAN, C. Relações entre populações naturais de *Drosophila* e o meio ambiente. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências Universidade de São Paulo*, v. 221, p. 1-81, 1959.
- PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R., SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites on some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Ciênc. e Cult.*, v. 35, p. 1313-1319, 1983.
- PERONDINI, A. L. P., SENE, F. M., MORI, L. The pattern and polymorphism of some *Drosophila simulans* esterases in Brazil. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, v. 8, p. 263-268, 1979.
- POWELL, J. R. Progress and prospects in evolutionary biology: the *Drosophila* Model. *Oxford University Press*, New York, 493 p., 1997.
- PRADO, D. E., GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, v. 80, p. 902-927, 1993.
- PRANCE, G. T. Forest refuges: evidence from woody na giosperms. In: PRANCE, G. T. *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York, p.137-58, 1982.
- PRESTON, F. W. The canonical distribution of commonness and rarity. *Ecology*, v.

- 43, p. 185-215, 1962.
- RAFAEL, V., ARCOS, G. Subgrupo *inca*, um nuevo subgrupo del grupo *repleta*, com descripcion de *Drosophila huancavilcae* N.sp. (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica*, v. 3, p. 233-243, 1989.
- RAYMOND, M. L., ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, v. 49, p.1280-1283, 1995.
- 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.
- ROSE, O., FALUSH, D. A Threshold size for microatellite expansion. *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, p. 613-615, 1998.
- RUIZ, A., FONTDEVILA, A. Ecologia y evolution del subgrupo *mulleri* de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta Cient. Venezolana*, v. 32, p. 338-345, 1981.
- RUIZ, A., WASSERMAN, M. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, v.70, p.582-596, 1993.
- RUIZ, A., CANSIAN, A. M., KUHN, G. C. S., ALVES, M. A. R., SENE, F. M. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. *Genetica*, v.108, p.217-227, 2000.
- SAAVEDRA, C. C. R, CALLEGARI-JACQUES, S. M, NAPP, M., VALENTE, V. L. S. A descriptive and analytical study of 4 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 tree. *Mol. Biol. Evol.*, 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.
- SCHLÖTTERER, C., Microsatellites. In: Hoelzel, A.R. (ed.), *Molec. Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p. 237–261, 1998.
- SCHLÖTTERER, C., VOGL, C., TAUTZ, D. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics*, v. 146, p. 309-320, 1997.
- SCHLUTER, D., RICKLEFS, R. E. Community diversity: an introduction to the problem. In: Ricklefs, R. E., Schluter, D. (eds.). *Species Diversity: Historical and Geographical Perspectives*, University of Chicago Press, Chicago, p. 1–10, 1993.

-
- SCHUG, M. D., MACKAY, T. F. C., AQUADRO C. F. Low mutation rates of microsatellites in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.*, v. 15, p. 99–102, 1997.
- SELKOE, K. A., TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.*, v. 9, p. 615–629, 2006.
- SENE, F. M., VAL, F. C., VILELA, C. R., PEREIRA, M. A. Q. R. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. *Papeis Avulsos de Zoologia*; v. 33, p. 315-326, 1980.
- 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. *DIS*, v.56, p.118-121, 1981.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Science*, v. 42, p. 81-88, 1988.
- SEVENSTER, J. G., van ALPHEN, J. J. M. A life-history trade-off in *Drosophila* species and community structure in variable environments. *Journal of Animal Ecology*, Cambridge, v. 62, p. 720-736, 1993.
- SEVENSTER, J.G., van ALPHEN, J. J. M. Aggregation and coexistence. II. A neotropical *Drosophila* community. *J. of Animal Ecology*, v. 65, p. 308-324, 1996.
- SHMIDA, A., WILSON, M. Biological determinants of species diversity. *J. Biogeography*, v. 12, p. 1-20, 1985.
- SHORROCKS, B. Distribution and abundance of woodland species of British *Drosophila* (Diptera-Drosophilidae). *J. of Animal Ecol*, v. 44, p. 851-864, 1975.
- SILVA, A. F. G., SENE, F. M. Morphological geografic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 35, p. 455-468, 1991.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v. 139, p. 457-462, 1995.
- SLATKIN, M., BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, v. 43, p. 1349-1368, 1989.
- SMITH, A. P. Stratification of temperate and tropical forest. *Amer. Nat.*, v.107, p.671-683, 1973.
- SOULÉ, M. E. Conservation biology: The science of searcity and diversity. Sinauer Associates, *Sunderland*, 584p., 1986.

-
- STAFSTROM, J. P., INGRAM P. TCA microsatellite repeats in the 5'- UTR of the Sat S gene of wild and cultivated accessions of *Pisum* and of four closely related genera. *International Journal Plant of Science*, v.165, p.273-280, 2004.
- STRASSMANN, J. E., SOLÍS, C. R., PETERS, J. M., QUELLER., D. C. Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees, p.163-178, 528-549. In J.D. Ferraris & S.R. Palumbi (eds.), *Mol. Met. in Zoology and Evolution*. Wiley-Liss, New York, 1996.
- 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*. *Mol Ecol.*, v. 14, p. 3775-3786, 2005.
- STRICKBERGER, M. W. Evolution. Jones and Bartlett Publishers, *Sudbury*, 722 p., 2000.
- TANABE, S-I. Between-forest variation in vertical stratification of drosophilid populations. *Ecological Entomology*, v. 27, p. 720-731, 2002.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res*, v. 17, p. 6463-6471, 1989.
- 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.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Sobre Uma Nova Técnica Para Coletar Moscas do Genero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). In: *SBPC, Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 39, p. 729-729, 1987.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Biol.*, v .52, p. 311-317, 1992.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* group) in the Northeastern South America. *Evolución Biológica*, v.8/9, p.71-85, 1995.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. *Drosophila*. In: BRANDÃO, C. R. F, CANCELLO, E. M. *Invertebrados terrestres*. Vol. V. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XX, FAPESP, São Paulo, 1999.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Two new species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia Sér. Zool.*, v.90, p.141-146, 2001.
- TOCHER, M. D., GASCON, C., ZIMMERMAN, B. I. Fragmentation effects on a

-
- central Amazonian frog community: a ten-year study. In: Laurance, W. F., Bierregaard, R. O. (eds.). *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*, 592 p., 1997.
- TODA, M. J. Drosophilidae (Diptera) in Burma. I. The subgenus *Dorsilopha* Sturtevant of the genus *Drosophila* with descriptions of two new species. *Kontyû*, v.54, p.282-290, 1986.
- TORRES, F. R., MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp. (Diptera) in two woodlands in the State of São Paulo, Brazil. *Iheringia Série Zoologia*, v. 96, p. 437-444, 2006.
- TOSI, D., SENE, F. M. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Gen.*, v.12, p.729-745, 1989.
- TUNDISI, J. G., MATSUMURA-TUNDISI, T. Biodiversity in the neotropics: ecological, economic and social values. *Braz. J. Biol.*, v. 68, p. 913-915, 2008.
- TURNER, I. M. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology*, v. 33, p. 200-209, 1996.
- VALENTE, V. L., ARAÚJO, A. M. Ecological aspects of *Drosophila* species in two contrasting environments in southern Brazil (Diptera: Drosophilidae). *Rev. Brasil. Ent.*, v. 35, p. 237-253, 1991.
- VAN DER LINDE, K., SEVENSTER, J. G. *Drosophila* diversity over a disturbance gradient. *Proc. Exp. App. Entomol.*, v. 13, p. 51–56. 2002.
- VAN TREUREN, R. Estimating null allele frequencies at a microsatellite locus in the oystercatcher (*Haematopus ostralegus*). *Molec Ecology*, v. 7, p.1413–1417, 1998.
- VANZOLINI, P. E. A quasi-historical approach to the natural history of the differentiation of reptiles in tropical geographic isolates. *Pap. Avulsos Zool.*, v. 34, p.189-204, 1981.
- VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v.27, 114p., 1983.
- VILELA, C. R., SENE, F. M. Two new neotropical species of *D. repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Pap. Avulsos Zool.*, v.30, p.295-299, 1977.
- VILELA, C. R., PEREIRA, M. A. Q. R., SENE, F. M. Preliminary data on geographical distribution of *Drosophila* species within morpho-climatic domains of Brazil II: The *repleta* group. *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 66–70, 1983.

-
- VILELA, C. R., SILVA, A. F. G., SENE, F. M. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil.III. The *cardini* group. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 46, p. 139-148, 2002.
- WALLA, T. R., STEINAR, E., PHILIP, J., DEVRIES, P. J., RUSSELL, L. Modeling vertical beta-diversity in tropical butterfly communities. *Oikos*, v. 107, p. 610-618, 2004.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: Krimbas, C. B., Powell, J. R. (eds.), *Drosophila inversions polymorphism*, CRC, Boca Raton, p. 455-552, 1992.
- WEBER, J. L., WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, v. 2, p. 1123-1128, 1993.
- 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.
- WHITTAKER R. H. Dominance and diversity in land plant communities. *Science*, v. 147, p. 250–260, 1965
- WHITTAKER, R. H. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, v. 21, p. 213-251, 1972.
- WILDER, J., HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Mol Biol Evol.*, v. 1, p. 384–392, 2001.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v. 16, p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. *Evolution and the genetics of population*, vol. 4. Variability within and among natural populations. Univ. Chicago Press, Chicago, 1978.
- YOUNG, A., MITCHELL, N. Microclimate and vegetation edge effects in a fragmented podocarp-broadleaf forest in New Zealand. *Biological Conservation*, v. 67, p. 63-72, 1994.
- ZOUROS, E. Genic differentiation associated with the early stages of speciation in the *mulleri* subgroup of *Drosophila*. *Evolution*, v. 27, p. 601-621, 1973.
- ZHU, Y., STRASSMANN, J. E., QUELLER, D. C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetics Research*, v. 76, p. 227-236, 2000.
- ZUIDEMA, P., MAPES, B., LIN, J., FAIRALL, C., WICK, G. The Interaction of Clouds and Dry Air in the Eastern Tropical Pacific. *Journal of Climate*, v.19, p. 4531-4544, 2006.