

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

**FILOGEOGRAFIA DE DUAS ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* DOS GRUPOS
GUARAMUNU E *GUARANI***

EMANUELE CRISTINA GUSTANI

Guarapuava

2013

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

**FILOGEOGRAFIA DE DUAS ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* DOS GRUPOS
GUARAMUNU E *GUARANI***

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

2013

Orientadores

Profa. Dra. LUCIANA PAES DE BARROS MACHADO

Prof. Dr. ROGÉRIO PINCELA MATEUS

Dedicatória

Carlos Eduardo Buss, com amor

Agradecimentos

A Deus pela vida e por ter me ensinado a valorizá-la como ninguém.

Aos meus orientadores, Professora Dra. Luciana Paes de Barros Machado e Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus, pela oportunidade, confiança e pela orientação desde o início da minha carreira acadêmica na Iniciação Científica.

Ao Dr. Mateus Henrique Santos pelo apoio técnico, auxílio na análise, sugestões, foi realmente um verdadeiro guia nas análises filogeográficas.

À Tais Lavagnini pela sua disponibilidade e apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Marco Gottschalk (FURG) pelo auxílio na identificação e por ter cedido espécimes de suas linhagens.

À professora Dra. Lizandra Robe (FURG) pela parceria estabelecida e pela troca de material.

Ao professor Dr. Mauricio Camargo Filho (Departamento de Geografia UNICENTRO) pela disponibilidade na discussão biogeográfica.

Ao Carlos Eduardo Buss, meu esposo, por me incentivar e apoiar continuamente na minha caminhada, pelas discussões sobre este trabalho, bem como pelo apoio técnico nas coletas. A todos meus familiares apoiadores das minhas escolhas, principalmente minha mãe Lúcia, minha irmã Flávia e meu pai mesmo de longe.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Evolução, Gabriela, Norbert, em especial a Dra. Ana Paula Ferreira de Oliveira, que durante estes dois anos desenvolvemos este projeto em comum.

Aos amigos de longa data, Kati, Priscila e Bruna pelas conversas sempre intermináveis e que sempre sinto falta. Aqueles que não nomeei sintam-se lembrados, pois de alguma forma me auxiliaram.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo fomento a este projeto (projeto PRODOC/CAPES).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva UNICENTRO/UEPG.

RESUMO

O estudo filogeográfico é uma ferramenta que pode evidenciar padrões geográficos e genéticos capazes de refletir eventos históricos sofridos por uma espécie ou população ao longo de sua história evolutiva. O objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura populacional, história evolutiva, e distribuição das espécies neotropicais *Drosophila maculifrons* (grupo *guaramunu*) e *D. ornatifrons* (grupo *guarani*), coletadas no bioma Mata Atlântica da região sul do Brasil. Foram analisadas as sequências dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de três populações de *D. maculifrons* e nove de *D. ornatifrons*. A diversidade nucleotídica média (π) encontrada para as populações de *D. maculifrons* para o gene COI foi de 0,000476, e para COII foi de 0,000651. A AMOVA, Análise de Variância Molecular, revelou variação considerável para COI (63,51%; $\Phi_{ct} = 0,63328 - p < 0,05$) entre os grupos G1 e G2 (categorizados de acordo com a fitofisionomia da Mata Atlântica onde as populações foram coletadas), e para COII entre populações dentro dos grupos (101,12%; $\Phi_{sc} = -0,01481 - p < 0,05$). Os gráficos de *Mismatch Distribution* (MD) para os dois genes apresentaram curvas multimodais, o que sugere tanto equilíbrio demográfico, quanto subdivisão de populações. O padrão de distribuição da variação haplotípica de *D. maculifrons* também pode ser explicado pela ação de seleção balanceadora, com redução da diversidade genética e manutenção de polimorfismo ancestral; a diferença na variação observada entre as populações pode ser tanto devido à composição vegetal distinta encontrada nas áreas de Mata Atlântica amostradas, Floresta Estacional Semidecidual (FES) e Floresta Ombrófila Mista (FOM), como também esta relação pode ser consequência da maior proximidade geográfica das populações da área de FOM em relação a população coletada na área de FES, sendo resultado de fluxo gênico restrito pela distância. Para *D. ornatifrons*, os testes de neutralidade, o gráfico de MD e a Análise Bayesiana (BSP) para o gene COII indicam que esta espécie sofreu possivelmente um evento de expansão populacional. Este evento teria ocorrido provavelmente a partir das populações litorâneas ou próximas ao litoral do estado do Rio Grande do Sul, mais úmidas, como indicado pela posição da população de Ilha dos Marinheiros-RS na rede de haplótipos e a maior variação encontrada neste local. A datação pela BSP sugere que esta expansão teria ocorrido entre 20.000 e 25.000 anos atrás, período em que as temperaturas no hemisfério sul estavam em torno de

cinco ou seis graus mais baixas que as atuais. Portanto, a análise da distribuição da diversidade de haplótipos dos genes COI e COII de *D. maculifrons* revelou uma possível relação com o tipo de habitat (FES e FOM), contudo, uma amostragem com maior amplitude geográfica poderia contribuir com melhor precisão para a elucidação da história evolutiva desta espécie. A análise filogeografia de *D. ornatifrons* sugeriu que a região litorânea do Rio Grande do Sul seria a área ancestral de dispersão e origem das demais populações analisadas. A restrição da distribuição da diversidade observada na população costeira ancestral analisada, Ilha dos Marinheiros-RS, para as áreas colonizadas seria resultado da capacidade limitada de dispersão destes insetos, associada a dificuldade de transpor barreiras climáticas, especialmente de umidade, tão frequentes em ambientes florestais como a Mata Atlântica.

ABSTRACT

Phylogeography is a research field that can evidence geographic and genetic patterns resulted from historic events that a species or population has suffered along its evolutionary history. The main goal of this work was to study the populational structure, evolutionary history and distribution of the Neotropical *Drosophila* species, *Drosophila maculifrons* (*guaramunu* group) and *D. ornatifrons* (*guarani* group), collected in the Atlantic Forest biome from southern Brazil. Sequences of the mitochondrial genes Cytochrome Oxidase I (COI) and II (COII), from three populations of *D. maculifrons* and nine populations of *D. ornatifrons*, were analyzed. The mean nucleotide diversity (π) found for *D. maculifrons* in the COI gene was 0.000476, and in COII was 0.000651. The AMOVA, Analysis of Molecular Variance, revealed considerable variation for COI (63.51%; $\Phi_{ct} = 0.63328 - p < 0.05$) among G1 and G2 groups (categorized according to the Atlantic Forest phytophysiology where the population was located), and for COII among populations within the groups (101.12%; $\Phi_{sc} = -0.01481 - p < 0.05$). The *Mismatch Distribution* (MD) graphics for both genes presented multimodal curves, which suggest the occurrence of demographic equilibrium or population subdivision. The pattern of haplotypic variation distribution for *D. maculifrons* can be also explained by balancing selection, with genetic diversity reduction and maintenance of ancestral polymorphism; the difference in the variation found among populations could be due to the distinct flora composition of the sampled Atlantic Forest areas, Semideciduous Seasonal Forest (FES) and Mixed Ombrophylous Forest (FOM), or as a consequence of the higher geographic proximity among the FOM populations than among the FES populations, resulting in restrict by distance gene flow. For *D. ornatifrons*, the COII neutrality tests, MD graphics and Bayesian analysis indicated that this species may have suffered a population expansion event. This event is possible to have initiated from coastal or near to the coast populations of the Rio Grande do Sul state, more humid ones, as indicated by the higher variation and the position of Ilha dos Marinheiros-RS population in the haplotype net. The BSP dating suggested that this expansion would have occurred between 20,000 and 25,000 years ago, period that the temperatures were five to six degrees lower than the current mean temperature. Therefore, the haplotype diversity distribution analysis of the COI and COII genes of *D. maculifrons* revealed a possible relation with the type of habitat (FES or FOM), however, a wider

geographic sampling could contribute more precisely to elucidate this species evolutionary history. The phylogeographic study of *D. ornatifrons* suggested that the coastal region of the Rio Grande do Sul state is possibly the ancestral area that originated the other populations analysed. The restriction of the diversity distribution observed in the coastal ancestral population analyzed, Ilha dos Marinheiros-RS, toward to the colonized areas could be due to the limited capacity of dispersion of these insects, associated with the difficulty of overcoming clinal barriers, specially humidity, which are considerably frequent in forest environments, such as the Atlantic Forest.

Lista de Figuras

Material e Métodos

- Figura 1.** Distribuição dos biomas Mata Atlântica e Pampa da região sul do Brasil, e posição das populações de *Drosophila maculifrons* (●), e das localidades de *D. ornatifrons* (▲) amostradas para a análise das sequências dos genes Citocromo Oxidase I e II. A e 1 – Parque Municipal das Araucárias/Guarapuava-PR; B – Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR); C - Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR); 2 – Chapecó-SC; 3 – Horizontina-RS; 4 - Jacutinga-RS; 5 - São Nicolau-RS; 6 - Porto Alegre-RS; 7- Canguçu-RS; 8 - Ilha dos Marinheiros-RS; 9 – Taim-RS..... 9

Capítulo I

- Figura 2.** Redes de haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (A) e II (B) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. Os números (1 a 5 para COI, e 1 a 6 para COII) representam os haplótipos observados para cada população. Linhas inteiras e tracejadas correspondem aos aninhamentos para análise NCPA (Templeton, 1998). SF = Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR); MG = Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR); PA = Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR)..... 21
- Figura 3.** *Mismatch Distribution* para o gene Citocromo Oxidase I (A), $p = 0,87$ e II (B), $p = 0,24$ para populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. Linha cinza representa a frequência esperada; linha preta representa a frequência observada..... 23

Capítulo II

- Figura 2.** Redes de haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (A) e II (B) de localidades de *Drosophila ornatifrons* da região sul do Brasil. Os números (1 a 6 para COI, e 1 a 11 para COII) representam os haplótipos observados em cada localidade. Linhas inteiras e tracejadas em COII correspondem aos aninhamentos realizados para análise NCPA (Templeton, 1998)..... 55
- Figura 3.** *Mismatch Distribution* para o gene Citocromo Oxidase I (A), $p = 0,23$ e II (B), $p = 0,15$ para *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil. Linha cinza representa a frequência esperada; linha preta representa a frequência observada..... 56

Figura 4. Resultados da *Bayesian Skyline Analyses* (BSP) para o gene Citocromo Oxidase II de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil. A média de variação do tamanho efetivo populacional (N_e) está compreendida dentro da área de probabilidade entre a linha cinza e a linha preta, com valor de $\tau = 1,03$. O eixo das ordenadas corresponde a média do tamanho populacional, medido pelo produto do tamanho efetivo populacional (N_e) e o tempo de geração em anos. Os retângulos em cinza representam os períodos glaciais.....

Lista de Tabelas

Material e Métodos

- Tabela 1.** Coordenadas e fitofisionomias do bioma Mata Atlântica dos locais de coleta das populações de *Drosophila maculifrons* (●) e das localidades de *D. ornatifrons* (▲) da região sul do Brasil, utilizadas para análise das sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII). n = número de indivíduos amostrados para cada um dos genes. FED = Floresta Estacional Decidual; FES = Floresta Estacional Semidecidual; FOM = Floresta Ombrófila Mista; MP = Mata Paludosa..... 8

Capítulo I

- Tabela 2.** Haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) encontrados para populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. As populações foram categorizadas nos grupos G1 e G2 de acordo com o tipo de fitofisionomia da Mata Atlântica em que foram coletadas (ver Material e Métodos). n = número de indivíduos amostrados..... 18
- Tabela 3.** Índices de diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (h) para sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) obtidos para populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. As populações foram categorizadas nos grupos G1 e G2 de acordo com o tipo de fitofisionomia da Mata Atlântica em que foram coletadas (ver Material e Métodos). n = número de indivíduos amostrados..... 18
- Tabela 4.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. Φ_{st} = covariância dentro das localidades; Φ_{sc} = covariância entre localidades dentro dos grupos; Φ_{ct} = covariância entre grupos..... 19
- Tabela 5.** Fst par a par para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. Valores para COI na linha superior, valores para COII na linha inferior..... 19
- Tabela 6.** Resultados dos testes de neutralidade e *Mismatch Distribution* realizados para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. PA = Parque Municipal das

Araucárias (Guarapuava-PR); SF = Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR); MG = Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR). n = número de indivíduos amostrados.....	22
--	----

Capítulo II

Tabela 2. Haplótipos do gene Citocromo Oxidase I encontrados para <i>Drosophila ornatifrons</i> coletada na região sul do Brasil. As localidades foram categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.....	48
Tabela 3. Haplótipos do gene Citocromo Oxidase II encontrados para <i>Drosophila ornatifrons</i> coletada na região sul do Brasil. As localidades foram categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.....	49
Tabela 4. Índices de diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (h) para sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) obtidos para <i>Drosophila ornatifrons</i> de localidades da região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.....	50
Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de <i>Drosophila ornatifrons</i> de localidades da região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. Φ_{st} = covariância dentro das localidades; Φ_{sc} = covariância entre localidades dentro dos grupos; Φ_{ct} = covariância entre grupos.....	51
Tabela 6. Fst par a par para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de <i>Drosophila ornatifrons</i> de localidades da região sul do Brasil. Valores para COI na linha superior, valores para COII na linha inferior. xxx = localidades não amostradas para COII.....	52
Tabela 7. Resultados da Análise de Clados Não Enraizados (NCPA) para haplótipos do gene COII de <i>Drosophila ornatifrons</i> de localidades da região sul do Brasil.....	53
Tabela 8. Resultados dos testes de neutralidade e <i>Mismatch Distribution</i> realizados para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de <i>Drosophila ornatifrons</i> de localidades da região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.	54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	1
2.	OBJETIVOS	6
2.1.	Objetivo geral	6
2.2.	Objetivos específicos	6
3.	MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1.	Amostras	7
3.2.	Sequenciamento dos genes COI e COII	10
3.3.	Análise e edição das sequências	11
3.4.	Análises estatísticas	11
3.5.	Estrutura populacional	12
3.6.	Análises filogeográficas	13
4.	RESULTADOS	14
4.1.	Capítulo I	
	FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE <i>Drosophila maculifrons</i> (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)	15
4.1.1.	Resumo	15
4.1.2.	Introdução	16
4.1.3.	Material e Métodos	17
4.1.4.	Resultados	17
4.1.4.1.	Sequenciamento dos genes COI e COII	17
4.1.4.2.	Estrutura populacional e Fst	18
4.1.4.3.	Rede de haplótipos	19
4.1.4.4.	História demográfica	19
4.1.5.	Discussão	24
4.1.6.	Conclusão	26
4.1.7.	Referências bibliográficas	26
4.2.	Capítulo II	
	FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA EVOLUTIVA DA ESPÉCIE <i>Drosophila ornatifrons</i> (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)	29
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

Para conhecer a história evolutiva de uma espécie e compreender sua distribuição atual é necessário distinguir forças evolutivas recorrentes, tais como fluxo gênico, deriva genética e mutação, de eventos históricos, como expansão e colonização (Templeton, 2011). A filogeografia é a área capaz de fazer a distinção entre os fatores evolutivos recorrentes e históricos responsáveis pela distribuição demográfica das espécies. O contexto geográfico da análise filogeográfica é examinado pelos processos históricos que podem ter influenciado a demografia populacional, diferenciação e especiação (Kingman, 1982; Fu e Li, 1999; Avise, 2000, 2004, 2009; Beheregaray, 2008). O poder de resolução desta área se deve a investigação tanto dos componentes espaciais quanto temporais envolvidos no processo de coalescência. A teoria da coalescência, por sua vez, é baseada em um complexo conjunto de modelos matemáticos que acomodam fenômenos biológicos que refletem dados genômicos e identificam uma genealogia ancestral por meio de uma amostra contemporânea (Kingman, 1982).

A filogeografia pode ser separada em duas partes. Uma parte seria referente as demonstrações gráficas, árvores explicativas da hipótese da história biogeográfica dos organismos, sustentada por métodos de reconstrução filogenética, rede de haplótipos e métodos de coalescência. A segunda parte está fundamentada na estatística e na matemática para elucidar a demografia e estrutura populacional, baseada na teoria da coalescência, em fenômenos estocásticos e estatística computacional, em que os modelos de análises utilizam métodos fundamentados na verossimilhança, particularmente por inferência Bayesiana (Knowles e Maddison, 2002; Nielsen e Beaumont, 2009).

O DNA mitocondrial tem mostrado ser um marcador importante para as análises filogeográficas pela capacidade de caracterizar a variabilidade inter e intraespecífica; poder identificar espécies e populações; inferir relações filogenéticas (o que pode esclarecer possíveis eventos históricos); e principalmente pela possibilidade de simular cenários geológicos, padrões de fluxo gênico histórico, isolamento histórico da diversidade genética, eventos de expansão demográfica e contração populacional. Todos estes aspectos, que podem ser abordados utilizando este marcador, devem-se ao fato de que a sua análise é realizada pela reconstrução

da linhagem materna, e também pela taxa de evolução mais rápida que sequências nucleares, devido, entre outros fatores, ao tempo de coalescência mais rápido (Birky et al., 1983; Avise et al., 1984; Tajima, 1989; Avise e Ball, 1990; Avise, 2000; Hoffman et al., 2009).

O estudo da distribuição das espécies demanda a compreensão da história geológica e biogeográfica da Terra, pois os períodos glaciais ocorridos há milhares de anos influenciaram fortemente a constituição atual. Na era Paleozóica há registros de dois eventos de glaciação, um no início do Cambriano (570 milhões de anos atrás) e outro no final do Permiano (250 milhões de anos atrás). No final do período Terciário, no Plioceno superior (Gelasiano: 2,6 a 1,8 milhões de anos atrás), e no Quaternário (1,8 milhões de anos atrás até o presente), houve um crescimento expressivo na frequência das glaciações. No Pleistoceno do período Quaternário foram registradas pelo menos 16 glaciações, com duração média de 100 milhões de anos, intercaladas por períodos de climas mais quentes, ou interglaciais (Salgado-Labouriau, 1994; Santana-Neto et al., 2005; Suguio et al., 2005). Dentre essas glaciações pleistocênicas, cinco grandes ciclos glaciais tiveram impacto profundo no padrão da distribuição geográfica das espécies atuais, e as mudanças climáticas que ocorreram neste período levaram a alteração de muitos biomas durante cada ciclo (Hewitt, 2000; Colbeck et al., 2008).

No hemisfério sul as mudanças climáticas também foram impactantes, porém em menor grau que no hemisfério norte, pois não houve formação de geleiras. Há aproximadamente 40.000 anos atrás, no período glacial do hemisfério sul, a variação climática foi considerável, contudo, entre cinco e seis graus a menos que no hemisfério norte; a cobertura vegetal predominante era de campos (estepes de gramíneas e de arbustos constituíram a cobertura primária mais antiga); e o clima nesta época era semi-árido (seco). Este clima seco perdurou até o Pleistoceno, assim, a expansão da mata só teria ocorrido em um período mais recente, de clima mais ameno e úmido, a partir de um aumento gradual de temperatura (Rambo, 1953; Maack, 1968; Hueck, 1972; Klein, 1975).

Trabalhos palinológicos e datações radiométricas estabeleceram a relação de sucessão entre mata com Araucária e campos nos últimos milênios no planalto do sul do Brasil. A análise do perfil sedimentar do Parque Nacional dos Aparados da Serra, em Cambará do Sul, leste do planalto, evidenciou uma fase de semi-aridez

muito anterior há 10.000 anos, sendo que a expansão da mata com Araucária sobre o campo foi gradativa e culminou com o recente aumento da umidade (Roth e Lorscheitter; 1993). Outro estudo de perfil sedimentar, nos Alpes de São Francisco, no município de São Francisco de Paula, o mais meridional da região da Serra Geral no estado do Rio Grande do Sul, mostrou que esta região tinha clima semi-árido há cerca de 11.000 anos, no início do Holoceno. A partir de 6.500 anos atrás, houve crescimento da mata com o aumento da temperatura, umidade, e intenso aumento da pluviosidade (Leonhardt e Lorscheitter, 2007; Scherer e Lorscheitter, 2008).

O surgimento da biodiversidade no sul e sudeste do Brasil, no bioma que compreende a bacia Paraná-Paraguai, teve origem principalmente em eventos vicariantes ocorridos em clima mais ameno. Existem várias hipóteses para explicar como este processo pode ter ocorrido, e estas são comparadas com as hipóteses que tentam explicar como aconteceram os eventos responsáveis pela origem da Amazônia.

A primeira delas, a Hipótese de Refúgios, foi proposta por Haffer (1969) para explicar a distribuição de aves na Amazônia, e foi aplicada por Vanzolini e Williams (1970) para a distribuição de lagartos na Mata Atlântica. Esta hipótese está fundamentada em mudanças climáticas cíclicas ocorridas entre o Pleistoceno e Terciário, com a ocorrência de períodos glaciais e interglaciais que se intercalaram. Estas alterações de umidade e temperatura podem ter sido o fator determinante para contrações e expansões da floresta, fazendo com que espécies se diferenciasssem após os eventos de vicariância (Haffer, 1993; Marroig e Cerqueira, 1997). Porém, a escassez de dados sobre as retrações na Mata Atlântica não permite um consenso entre os autores. Há apenas concordância na retração das florestas no sul, como nos recentes estudos de Tchaika e colaboradores (2006) e Carnaval e colaboradores (2009), que aumentaram a confiabilidade da hipótese por terem observado uma alta diversidade em refúgios para o lobo-guará e espécies de anfíbios, respectivamente.

A Hipótese de Gradientes Ecológicos de Endler (1977) sugere que seleção diversificadora sobre fortes gradientes ambientais teria capacidade de proporcionar diferenciação e especiação, apesar de manter o fluxo gênico entre as populações. As bases para esta teoria são as diferenças ecológicas entre habitats, principalmente devido a variações de gradientes latitudinais e tipos de vegetação (Lara e Patton, 2000; Leite, 2003). Lara e Patton (2000), por exemplo, evidenciaram uma

associação diferencial de táxons aos habitats (gradientes ecológicos) das Florestas Ombrófila Densa e Semidecidual, tipos de Mata Atlântica.

A Hipótese de Vicariância Geotectônica, proposta por Platnick e Nelson (1978) e utilizada também por Cracraft e Prum (1988), supõe a separação de populações por mudanças paleogeográficas e diferenciação alopátrica ao longo do tempo. Esta hipótese foi utilizada como explicação para o padrão de distribuição de roedores equimídeos na Mata Atlântica por Leite (2003).

A outra hipótese, denominada Hipótese de Rios (Pellegrino et al., 2005), é baseada na diferenciação das populações naturais devido a restrição do fluxo gênico pelo surgimento de barreiras aquáticas, como o aumento do nível dos rios. Porém, os rios dentro do bioma Mata Atlântica não são tão pronunciados quanto os amazônicos, e os dados sobre variações ao longo dos períodos geológicos nos níveis dos rios da Mata Atlântica são escassos. Esta hipótese foi utilizada como explicação para a distribuição de lagartos no sudeste e sul da Mata Atlântica (Pellegrino et al., 2005).

Para reconhecer os possíveis sinais de ocorrência de qualquer um dos quatro eventos sugeridos pelas hipóteses acima é necessário aplicar a análise filogeográfica. Os insetos tem sido frequentemente utilizados como modelos em trabalhos que investigam padrões filogeográficos previamente descritos para espécies de vertebrados, utilizando as hipóteses biogeográficas como base da investigação (Santos, 2011; Franco e Manfrin, 2012). Entre os insetos, um modelo biológico que tem sido aplicado em trabalhos filogeográficos é o gênero *Drosophila*, principalmente por apresentar algumas espécies com ampla distribuição, sendo encontradas em ambientes variados (como matas, campos ou ambientes xéricos), enquanto que outras apresentam distribuição mais restrita (Sene et al., 1982).

As Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTSS) da América do Sul são caracterizadas por espécies vegetais semi-decíduas (que perdem as folhas durante períodos de seca), e que apresentaram maior distribuição nos períodos frios e secos do Pleistoceno (Prado e Gibbs, 1993; Pennington et al., 2000; Prado, 2000). No Brasil existem dois grandes núcleos de FTSS: o domínio da Caatinga e as regiões da bacia do Paraná-Paraguai, conhecido como Núcleo Missiones (Prado e Gibbs, 1993; Prado, 2000; Morrone, 2006). Prado e Gibbs (1993) propõem a conexão desses núcleos por dois caminhos principais, a rota norte e a rota sul, durante os

períodos frios/secos do Pleistoceno, baseado na existência do arco Pleistocênico, que seriam relíquias formadas por vicariância de uma formação florestal de grandes dimensões que cobria a América do Sul durante este período.

Na rota sul de conexão dos núcleos de FTSS, na bacia Paraná-Paraguai, está presente o bioma Floresta Atlântica, caracterizado por apresentar, além das formações FTSS, também a Floresta Subtropical, que inclui a Floresta de Araucária. Originalmente este bioma ocupava aproximadamente 1,5 milhões de quilômetros quadrados do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul ao longo da costa brasileira, com largura da mata muito variável, podendo se estender do sudeste do Brasil até o leste do Paraguai e na província de Misiones na Argentina (Cabrera e Willink, 1973; Galindo-Leal e Câmara, 2003; Oliveira-Filho et al., 2006). Atualmente, devido principalmente ao desmatamento, é composta de cerca de 7% a 16% de remanescentes da cobertura inicial (SOS Mata Atlântica/INPE, 1993, 2000; Dinerstein et al., 1995; Galindo-Leal e Câmara, 2003; Ribeiro et al., 2009).

As espécies *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* tem ampla distribuição em áreas de matas do Brasil e ocorrem com maior frequência nos domínios da Mata Atlântica das regiões sul e sudeste. Recentemente os subgrupos do grupo *guarani*, aos quais estas espécies pertenciam, foram elevados a categoria de grupos: grupo *guaramunu* de *D. maculifrons* e grupo *guarani* de *D. ornatifrons* (Robe et al., 2010a). Esta alteração taxonômica foi proposta com base em dados citogenéticos e moleculares, os quais indicam que espécies membros do subgrupo *guaramunu* apresentam maior similaridade com espécies do grupo *tripunctata* do que com espécies do subgrupo *guarani* (Kastritsis, 1969, Kastritsis et al., 1970; Yotoko et al., 2003; Robe et al., 2005; 2010a,b). A escassez de dados sobre a história evolutiva de ambas espécies, assim como a recente alteração taxonômica dos grupos aos quais *D. maculifrons* e *D. ornatifrons* pertencem, as tornam objeto relevante para a comparação dos padrões biogeográficos que influenciaram na distribuição atual destas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar a estrutura populacional e história evolutiva das espécies *Drosophila maculifrons* do grupo *guaramunu* e *D. ornatifrons* do grupo *guarani*, no bioma Mata Atlântica da região sul do Brasil, utilizando sequências dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase I e II.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar a variabilidade genética intra e interpopulacional das espécies *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons*;
- Inferir se existe estruturação populacional para ambas as espécies;
- Analisar a possível ocorrência de eventos históricos e/ou ecológicos que possam ter contribuído para o atual padrão de distribuição das populações das espécies analisadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram analisados 33 indivíduos de *Drosophila maculifrons* provenientes de três populações do bioma Mata Atlântica do estado do Paraná, na região sul do Brasil, sendo uma população com fitofisionomia da Floresta Estacional Semidecidual (FES) e duas áreas de Floresta Ombrófila Mista (FOM). Para *D. ornatifrons* foram analisados 64 indivíduos provenientes de nove localidades de fragmentos do bioma Mata Atlântica da região sul do Brasil. Vinte e cinco indivíduos de *D. maculifrons* foram avaliados quanto a variação nas sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI, no restante do trabalho), e 51 de *D. ornatifrons*. Para o gene Citocromo Oxidase II (COII, no restante do trabalho) foram analisados 33 e 64 indivíduos de *D. maculifrons* e *D. ornatifrons*, respectivamente (Tabela 1 e Figura 1).

Os indivíduos das populações da espécie *Drosophila maculifrons* do Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR, PA no restante do trabalho), Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR, SF no restante do trabalho), e Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR, MG no restante do trabalho) foram coletados utilizando armadilhas abertas constituídas de pratos no solo contendo iscas de banana, laranja e fermento biológico fresco (levedura *Sacharomices cerevisiae*). Após 24, 48 e 72 horas, as moscas foram capturadas com o auxílio de rede entomológica (dos Santos et al., 2010), e, então, levados ao laboratório para identificação.

Os indivíduos dos grupos *guarani* e *guaramunu* foram identificados por meio da chave de identificação de Freire-Maia e Pavan (1949). Posteriormente, os espécimes machos de *Drosophila maculifrons* (grupo *guaramunu*) e *D. ornatifrons* (grupo *guarani*) foram identificados por meio de preparação de lâminas para a análise da morfologia do edeago (Kaneshiro, 1969, com modificações), de acordo com o descrito por Vilela e Bächli (1990), e foram, então, armazenados a 20° C negativos.

Os indivíduos de todas as localidades da espécie *Drosophila ornatifrons*, com exceção de Guarapuava-PR (localidade referente a população PA de *D. maculifrons*), foram cedidos por LJ Robe da Universidade Federal do Rio Grande, em Rio Grande-RS.

Tabela 1. Coordenadas e fitofisionomias do bioma Mata Atlântica dos locais de coleta das populações de *Drosophila maculifrons* (●) e das localidades de *D. ornatifrons* (▲) da região sul do Brasil, utilizadas para análise das sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII). n = número de indivíduos amostrados para cada um dos genes. FED = Floresta Estacional Decidual; FES = Floresta Estacional Semidecidual; FOM = Floresta Ombrófila Mista; MP = Mata Paludosa.

Populações/Localidades	n - COI	n - COII	Fitofisionomia	Coordenadas
Parque Municipal das Araucárias - Guarapuava-PR (●/▲)	24 (▲) 13 (●)	23 (▲) 7 (●)	FOM	51°27'19" O, 25°23'36" S
Parque Municipal São Francisco da Esperança - Guarapuava-PR (●)	9 (●)	12 (●)	FOM	50°00'35" O, 29°44'44" S
Parque Estadual da Mata dos Godoy - Londrina-PR (●)	3 (●)	14 (●)	FES	50°11'15" O, 29°56'15" S
Chapécó-SC (▲)	3 (▲)	-	FED	52°34'47" O, 27°05'37" S
Horizontina-RS (▲)	1 (▲)	1 (▲)	FED	54°18'19" O, 27°30'29" S
Jacutinga-RS (▲)	2 (▲)	3 (▲)	FOM	52°32'11" O, 27°42'06" S
São Nicolau-RS (▲)	1 (▲)	-	FED	55°16'19" O, 27°57'54" S
Porto Alegre-RS (▲)	1 (▲)	1 (▲)	FES	50°17'43" O, 30°00'25" S
Canguçu-RS (▲)	15 (▲)	21 (▲)	FES	52°40'14" O, 31°23'54" S
Ilha dos Marinheiros-RS (▲)	2 (▲)	15 (▲)	MP	52°09'33" O, 31°59'44" S
Taim-RS (▲)	2 (▲)	-	MP	52°34'47" O, 32°29'45" S

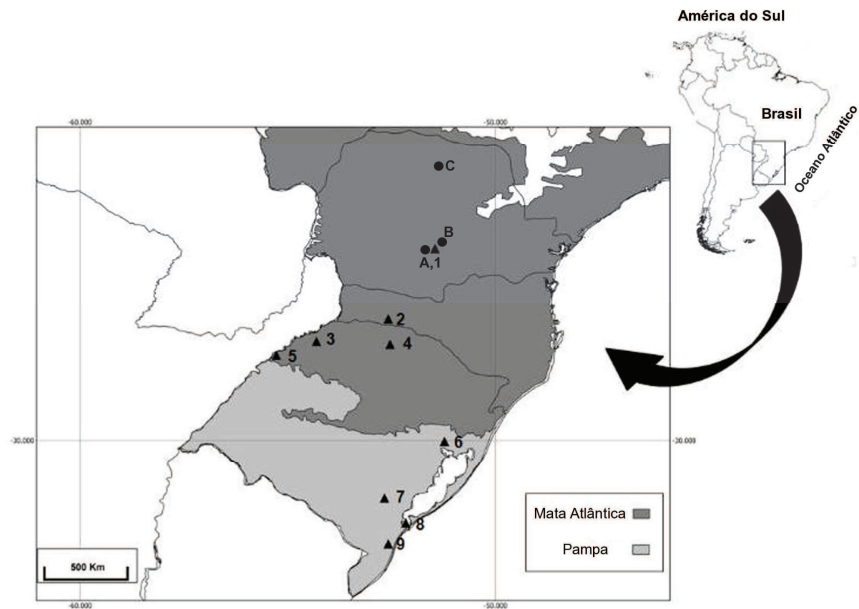


Figura 1. Distribuição dos biomas Mata Atlântica e Pampa da região sul do Brasil, e posição das populações de *Drosophila maculifrons* (●), e das localidades de *D. ornatifrons* (▲) amostradas para a análise das sequências dos genes Citocromo Oxidase I e II. A e 1 – Parque Municipal das Araucárias/Guarapuava-PR; B – Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR); C - Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR); 2 – Chapecó-SC; 3 – Horizontina-RS; 4 - Jacutinga-RS; 5 - São Nicolau-RS; 6 - Porto Alegre-RS; 7- Canguçu-RS; 8 - Ilha dos Marinheiros-RS; 9 – Taim-RS.

3.2. Sequenciamento dos genes COI e COII

O DNA genômico de machos das espécies *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* foi extraído macerando individualmente as amostras em soluções de Lise de Núcleo (Promega) e EDTA (0,5 M, pH = 8,0). Após incubação da reação com Proteínase K (20 mg/mL) em banho-maria a 65° C, foi acrescentada Solução de Precipitação de Proteína (Promega) e, então, as amostras permaneceram a 0° C por 10 minutos. Posteriormente a centrifugação e precipitação das proteínas, o sobrenadante foi transferido para microtubo contendo isopropanol. Após outra centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o DNA purificado em mais um ciclo de centrifugação com etanol 70%. O etanol foi descartado e após secagem dos microtubos a 40° C, o DNA foi ressuscitado em 60 µL de água ultrapura autoclavada, permaneceu a 4° C por 12 horas, e então foi armazenado a 20° C negativos.

O isolamento e a amplificação de fragmentos da primeira metade da subunidade I do gene Citocromo Oxidase (COI) foram realizados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores *forward* TY-J-1460 (Simon et al., 1994) e *reverse* C-1-N-2191 (de Brito et al., 2002). Já nas reações de PCR para amplificação de fragmentos da subunidade II do gene Citocromo Oxidase (COII) foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *forward* TL2-J-3037 e *reverse* TK-N-3785 (Simon et al., 1994).

A amplificação via PCR de COI foi realizada em 25 µL de reação contendo: 6,4 ng de DNA; 0,01 pmol de cada dNTP; 0,08 pmol de cada um dos oligonucleotídeos; 2,5 µL de tampão 10X; e 0,06 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A mesma reação descrita para a amplificação de COI foi utilizada para amplificação de COII, com alteração apenas da concentração dos oligonucleotídeos (0,256 pmol) e de Taq DNA polimerase (0,1 U). As reações de PCR foram realizadas no termociclador Bio Rad, sob as seguintes condições para o gene COI: 94° C por 1 min 30 s; 30 ciclos de 94° C por 40 s, 52° C por 40 s e 72° C por 2 min; finalizando a 72° C por 2 min. Para o gene COII, a PCR foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo a 94° C por 7 min; 35 ciclos a 94° C por 1 min, 55° C por 1 min e 72° C por 1 min; finalizando a 72° C por 5 min.

A visualização dos produtos de PCR de ambos os genes foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado em tampão 1X TBE (0,089 M Tris-

Base; 0,089 M Ácido Bórico; 2 mM EDTA) contendo brometo de etídeo (10mg/mL), com concentração final de 0,5 µg/mL. Para a purificação do DNA, foi utilizado o conjunto de reagentes GFX Purification (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados de cada PCR foram enviados para serviço terceirizado de sequenciamento da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do *Campus* de Jaboticabal (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

3.3. Análise e edição das sequências

As sequências dos genes COI e COII de indivíduos de *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* foram comparadas, corrigidas e editadas ao nível de significância de 25% com o auxílio do software Staden (1996), contudo, quando necessário, a correção das sequências também foi realizada manualmente. Para o alinhamento múltiplo das sequências foi utilizado o pacote de programas Bioedit 7.3.1.0, o qual inclui o programa Clustal W 1.8 (Thompson et al., 1994). A busca por identidade das sequências semelhantes às obtidas neste trabalho foi realizada no banco de dados do NCBI GenBank (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). As sequências dos haplótipos geradas foram disponibilizadas no *GenBank*.

3.4. Análises estatísticas

Nem todos os indivíduos apresentaram amplificação positiva e de qualidade para os dois genes, deste modo, foram realizadas duas análises, uma considerando somente os indivíduos que foram sequenciados para ambos os genes; e a outra considerando todos os indivíduos sequenciados. Não houve diferença nos resultados obtidos, assim, as análises a seguir foram baseadas no total de indivíduos sequenciados.

A partir do sequenciamento dos genes COI e COII de *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* foram estimados o índice de diversidade nucleotídica (π), o número de haplótipos (h), a diversidade haplotípica (H_d), e as diferenças par-a-par, utilizando o software Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2005), também os cálculos dos parâmetros de *Mismatch Distribution* foram realizados com o auxílio deste programa. Foi utilizado o software Mega 5.0.5 (Tamura et al., 2011) para verificar qual modelo de substituição

nucleotídica melhor explica a evolução das sequências, utilizando o critério Akaike (AIC), seguindo o modelo Tamura e Nei (1993).

Foram realizados os seguintes testes de neutralidade, baseados nos polimorfismos das sequências, para verificar os fatores atuantes na evolução das sequências dos genes COI e COII de *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons*: D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997), utilizando o programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2005); Teste R2 (Ramos-Onsins e Rozas, 2002) e F*/D* (Fu e Li, 1993), por meio do programa DNAsp 4.20 (Rozas et al., 2003).

A análise Bayesian Skyline Plot (BSP) foi realizada com os dados gerados das sequências de COII de *Drosophila ornatifrons* para datação dos eventos atuantes na distribuição dos indivíduos, com o auxílio do software BEAST 1.5.4 (Drummond et al., 2005), utilizando o modelo de substituição nucleotídica HKY, previamente determinado, conforme mencionado acima. A análise BSP é baseada na estatística bayesiana, que estima a variação do tamanho efetivo da população ao longo do tempo, a partir de um modelo de substituição nucleotídica e taxa de mutação (Drummond et al., 2005). Foram utilizadas 100 milhões de interações de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) amostradas a cada 5.000 interações, das quais 10 a 15% foram descartadas como *burn-in*. Uma taxa de substituição de 1,4% por milhão de anos foi empregada baseada nos cálculos para as sequências de COI das espécies *D. melanogaster* e *D. yakuba* (Russo et al., 1995; Nagaraja et al. 2004). Os gráficos Skyline do software BEAST foram construídos com o auxílio do programa TRACER 1.5 (Drummond et al., 2005).

3.5. Estrutura populacional

Para verificar se as localidades amostradas das espécies *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* apresentavam estruturação, foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2005). Para aplicar esta análise, as amostras devem ser categorizadas, deste modo, as populações de *Drosophila maculifrons* foram agrupadas de acordo com a proximidade geográfica e fitofisionomia da Mata Atlântica do estado do Paraná em que foram coletadas em: Grupo 1 (G1), populações em áreas de FOM (PA e SF); e Grupo 2 (G2), população em área de FES (MG) (Tabela 1).

Para *Drosophila ornatifrons* as localidades foram agrupadas em interior e litoral, gerando dois grupos, Sul 1 e Sul 2. O grupo Sul 1 compreende as localidades a pelo menos 300 km do litoral e mais ao norte da distribuição dos indivíduos amostrados: Guarapuava-PR, Chapecó-SC, Horizontina-RS, Jacutinga-RS e São Nicolau-RS (localidades 1 a 5 da Figura 1). O grupo Sul 1 foi subdividido em Sul 1a e Sul 1b, sendo que Sul 1a compreende a localidade de Guarapuava-PR (mais ao norte da distribuição e representada pela fitofisionomia Floresta de Araucária de altitude do bioma Mata Atlântica), e Sul 1b, as demais localidades do grupo Sul 1. As localidades de Chapecó-SC e São Nicolau-RS do grupo Sul 1 não foram amostradas para o gene COII.

O grupo Sul 2 compreende as localidades distantes, no máximo, 100 km do litoral, com distribuição mais ao sul da área amostrada, e representada por fragmentos do bioma Mata Atlântica inseridos no bioma Pampa: Porto Alegre-RS, Canguçu-RS, Ilha dos Marinheiros-RS e Taim-RS (localidades 6 a 9 da Figura 1). Neste agrupamento, apenas a localidade de Taim-RS não foi amostrada para COII.

A AMOVA realiza estimativas de componentes de variância dentro e entre os grupos categorizados, e fornece valores de Φ que refletem a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis hierárquicos (Excoffier et al., 2005): Φ_{st} corresponde a covariância dentro das localidades; Φ_{sc} é a covariância entre as localidades dentro dos grupos; e Φ_{ct} corresponde a covariância entre grupos.

3.6. Análises filogeográficas

A Nested Clade Phylogeographic Analysis (NCPA) (Templeton et al., 1995; Templeton, 1998) foi realizada para inferir os eventos evolutivos que podem ter influenciado na variação das sequências do gene COII de *Drosophila ornatifrons*. Não foi possível empregar esta análise para o gene COI de *D. ornatifrons* e para *D. maculifrons*, devido a baixa variação revelada para este gene, e o pequeno número de populações (no caso de *D. maculifrons*), contudo, as redes de haplótipos geradas demonstram que ambos os genes refletem a mesma história evolutiva.

A análise NCPA é baseada na chave de inferência que considera a influência de eventos histórico/ecológicos sobre a distribuição das amostras (Templeton et al., 1995; Templeton, 2004; Panchall e Beaumont, 2007). A NCPA é aplicada seguindo quatro etapas: 1ª - Geração da rede de haplótipos não enraizada pelo programa

TCS 1.21 (Clement et al., 2000) (realizada para os dois genes, nas duas espécies); 2^a - Aninhamento dos clados por hierarquização, segundo Templeton et al. (1987, 1995); 3^a - Teste da significância por meio do programa Geodis 2.0 (Posada et al., 2000) com 5.000 permutações; 4^a - Interpretação da significância dos clados pela chave de inferência de Templeton (2004).

Para corroborar os resultados de isolamento por distância gerados pela NCPA para COII de *Drosophila ornatifrons*, foi realizado o Teste de Mantel (Mantel, 1967) com auxílio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2005).

4. RESULTADOS

Esta dissertação está organizada em dois capítulos, apresentados como parte de artigo científico que foi submetido a revista especializada (Capítulo I), e na forma de artigo científico (Capítulo II).

4.1. Capítulo I

FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE *Drosophila maculifrons* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

Este capítulo apresenta parte dos resultados que foram submetidos como artigo científico para a revista *Molecular Ecology* (Qualis A1 na área de Biodiversidade da CAPES) em co-autoria com pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande/RS.

4.2. Capítulo II

FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA EVOLUTIVA DA ESPÉCIE *Drosophila ornatifrons* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

Trabalho nas normas de submissão para publicação na revista *Genetics and Molecular Biology*, que apresenta Qualis B1 na Área de Biodiversidade da CAPES.

4.1. Capítulo I

FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE *Drosophila maculifrons* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

4.1.1. Resumo

A espécie *Drosophila maculifrons* pertence ao grupo *guaramunu*, o qual apresenta ampla ocorrência no bioma Mata Atlântica brasileiro. O objetivo deste trabalho foi contribuir com o entendimento da estrutura populacional, história evolutiva e distribuição da espécie *D. maculifrons* em áreas de Mata Atlântica do estado do Paraná, na região sul do Brasil, utilizando sequências dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII). Foram sequenciados 744 pares de bases (pb) para o gene COI de 26 indivíduos, provenientes de três populações, revelando seis haplótipos; para o gene COII, foram seqüenciadas 746 pb de 33 indivíduos provenientes de três populações, sendo também encontrados seis haplótipos. A diversidade nucleotídica média de *D. maculifrons* para COI foi 0,000476 e COII 0,000651; a AMOVA mostrou que houve variação considerável entre e dentro dos grupos para COI. Os gráficos de *Mismatch Distribution* para os dois genes demonstraram que os fatores evolutivos que podem ter ocorrido não foram suficientes para causar desequilíbrio demográfico nas populações de *D. maculifrons*, apesar da separação dos haplótipos nas redes apresentarem indícios de um possível evento de expansão das populações desta espécie. O padrão de distribuição da variação haplotípica observado em *D. maculifrons* também pode ser explicado pela ação de seleção balanceadora com redução da diversidade genética e manutenção de polimorfismo ancestral. A diferença na variação observada entre as populações pode ser devido à composição vegetal distinta encontrada nas áreas de Mata Atlântica amostradas, Floresta Estacional Semidecidual (FES) e Floresta Ombrófila Mista (FOM), contudo, esta relação pode ser devido a maior proximidade das populações coletadas em áreas de FOM, em relação a área de FES, sendo resultado de fluxo gênico restrito pela distância. Assim, uma maior amplitude geográfica de amostragem poderia contribuir com melhor precisão para a elucidação da história evolutiva desta espécie.

4.1.2. Introdução

A Mata Atlântica é uma formação vegetal possivelmente originada entre o Cretáceo e o Terciário. Este bioma brasileiro foi fortemente influenciado pelas mudanças climáticas ocorridas no Quaternário, que alteraram sua distribuição e a diversidade biológica. Este tipo florestal se estende dos estados do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, seguindo a costa brasileira e ocupando seus interiores. A Floresta Atlântica tem ampla variação altitudinal, latitudinal, e apresenta reflexo dos eventos ecológicos e evolutivos que a influenciaram no passado. Como consequência destes eventos, diferentes tipos fitofisionômicos foram gerados, formações abertas, mistas e densas, semi-decíduas e decíduas (Dinerstein et al., 1995; Ribeiro et al., 2009).

A Floresta Ombrófila Mista (FOM) é uma fitofisionomia da Mata Atlântica, que teve seu crescimento intensificado há pelo menos 3000 mil anos atrás, composta por elementos arbóreos (perenifólios ou decíduos), arbustivos (lianas e epífitas), mas a cobertura característica é a de *Araucaria angustifolia* que varia em abundância e porte. O clima é úmido, com temperaturas em estações mais quentes inferiores a 25° C (Maack, 1981).

A Floresta Estacional Semidecidual (FES) é um tipo vegetacional da Mata Atlântica que possui acentuada variação térmica relacionada a latitudes maiores que 24° S, que determina sua forte sazonalidade foliar de elementos arbóreos dominantes pelo longo tempo de deficiência hídrica, bem como por alguns períodos de frio intenso. Esta floresta é principalmente composta por elementos arbóreos (perenifólios ou decíduos), lianas e epífitas (Veloso et al., 1991).

Algumas espécies do gênero *Drosophila* são encontradas em ambientes variados da América do Sul em matas fechadas (como o bioma Mata Atlântica), campos ou ambientes xéricos, sendo que outras espécies podem apresentar distribuição restrita a uma determinada formação vegetal (Pereira et al., 1983).

Drosophila maculifrons, encontrada com frequência em áreas de Mata Atlântica, pertencida ao subgrupo *guaramunu* do grupo guarani, contudo este subgrupo foi elevado recentemente a categoria de grupo (Robe et al., 2010a). A necessidade deste reposicionamento taxonômico foi primeiramente inferida por Kastritsis (1969) e Kastritsis e colaboradores (1970) por meio de análises citogenéticas, e mais recentemente por evidências moleculares (Yotoko et al., 2003;

Robe et al., 2005, 2010a,b; Hatadani et al., 2009). Tanto as análises citogenéticas, quanto as moleculares, revelaram que as espécies analisadas do subgrupo *guaramunu* do grupo *guarani* estavam mais relacionadas a espécies do grupo *trinpunctata*, do que a outras do subgrupo *guarani*.

Até o momento, poucos são os trabalhos que tiveram como enfoque principal a variação em populações de *Drosophila maculifrons* (Saavedra et al., 1995; De Ré, 2012). Assim, baseado na escassez de dados sobre a história evolutiva para esta espécie este trabalho teve como objetivo entender o padrão de distribuição da variação de genes mitocondriais de populações de *D. maculifrons* do bioma Mata Atlântica por meio da análise da variabilidade genética intra e interpopulacional, da estruturação populacional e aplicação de testes de neutralidade, que permitiram inferir quais fatores evolutivos foram atuantes na distribuição da variação observada.

4.1.3. Material e Métodos

Esta seção está descrita no item 3 desta dissertação

4.1.4. Resultados

4.1.4.1. Sequenciamento dos genes COI e COII

O sequenciamento da primeira metade do gene COI, com 744 pares de bases (pb), de 25 indivíduos de *Drosophila maculifrons* resultou em seis haplótipos; enquanto o sequenciamento do fragmento do gene COII, com 746 pb, de 33 indivíduos revelou cinco haplótipos (Tabela 2).

O melhor modelo de substituição nucleotídica, que explica a evolução das sequências ao longo do tempo, selecionado para ambos os genes para serem aplicados nestes dados, foram HKY, seguido pelo Tamura Nei 93 (Tamura e Nei, 1993). A maior diversidade nucleotídica encontrada para ambos os genes foi apresentada pela população MG (Tabela 3).

Tabela 2. Haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) encontrados para populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. As populações foram categorizadas nos grupos G1 e G2 de acordo com o tipo de fitofisionomia da Mata Atlântica em que foram coletadas (ver Material e Métodos). n = número de indivíduos amostrados.

Grupo	Populações	n	Haplótipos (Frequência)
COI			
G1	Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR)	13	H01 (12) e H02 (1)
	Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR)	9	H01 (7), H04 (1) e H05 (1)
G2	Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR)	3	H01 (1) H03 (2)
COII			
G1	Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR)	7	H01 (5), H05 (1) e H06 (1)
	Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR)	12	H01 (11) e H03 (1)
G2	Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR)	14	H01 (11) H02 (1), H03 (1) e H04 (1)

Tabela 3. Índices de diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (h) para sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) obtidos para populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. As populações foram categorizadas nos grupos G1 e G2 de acordo com o tipo de fitofisionomia da Mata Atlântica em que foram coletadas (ver Material e Métodos). n = número de indivíduos amostrados.

Grupo	Populações	n	h	π
COI				
G1	Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR)	13	0,1429	0,000000
	Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR)	9	0,4167	0,000526
G2	Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR)	3	0,6667	0,000902
Total		25	0,4087	0,000476
COII				
G1	Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR)	7	0,5238	0,000769
	Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR)	12	0,1667	0,000224
G2	Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR)	14	0,3956	0,000962
Total		33	0,3602	0,000651

4.1.4.2. Estrutura populacional e Fst

Os resultados da AMOVA (Tabela 4) para as populações categorizadas em dois grupos (G1 - PA e SF, G2 - MG) mostraram que a maior porcentagem da variação foi encontrada entre os grupos (63,51%) para o gene COI, e entre as populações dentro dos grupos (101,12%) para COII. Os valores de Fst revelaram que as populações estão estruturadas (Tabela 5).

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. Φ_{st} = covariância dentro das localidades; Φ_{sc} = covariância entre localidades dentro dos grupos; Φ_{ct} = covariância entre grupos.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
COI			
$\Phi_{ct} = 0,63328$ $p < 0,05$	1,208	0,19704	63,51
$\Phi_{st} = 0,66764$ $p < 0,05$	0,272	0,01598	5,15
$\Phi_{sc} = 0,09370$ $p < 0,05$	2,237	0,09724	31,34
Total	3,717	0,731026	
COII			
$\Phi_{ct} = 0,00358$ $p > 0,05$	0,213	0,00086	0,36
$\Phi_{st} = -0,01118$ $p > 0,05$	0,212	-0,00355	-1,48
$\Phi_{sc} = -0,01481$ $p < 0,05$	7,301	0,23388	101,12
Total	7,726	0,24068	

Tabela 5. F_{st} par a par para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. Valores para COI na linha superior, valores para COII na linha inferior. * $p < 0,05$

Populações	1	2	3
1 – Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR)	-	-	-
2 – Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR)	0,14414*	-	-
3 – Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR)	0,00000*	0,00901*	-
	0,45946*	0,90990*	-

4.1.4.3. Rede de haplótipos

As redes de haplótipos não enraizadas mais parcimoniosas geradas para os genes COI e COII de *Drosophila maculifrons* da região sul do Brasil apresentaram forma de estrela, ou *Star Shape*, segundo Avise (2000) (Figura 2). Esta configuração pode se dar provavelmente pela alta frequência de alguns haplótipos, enquanto outros apresentam pouca variação, sendo posicionados nas extremidades.

4.1.4.4. História demográfica

Teste de Neutralidade e *Mismatch Distribution*

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de F_u apresentaram valores negativos e não significativos para as sequências do gene COI de *Drosophila maculifrons* da região sul do Brasil, enquanto o teste F_s de F_u foi significativo para o gene COII (Tabela 6). Considerando a categorização nos grupos G1 e G2 (Tabela 2), o teste F_s de F_u , para o gene COI, e D de Tajima, para o gene COII, apresentaram valores negativos e significativos para G2. Os testes F^* e D^*

apresentaram índices negativos e não significativos para o gene COI de G1, enquanto para o gene COII nenhum destes índices indicaram a ocorrência de evento de expansão das populações. Já o teste R2 foi significativo para ambos os genes. Os dados de *Mismatch Distribution* não foram significativos e a curva do gráfico foi multimodal para ambos os genes, sugerindo equilíbrio demográfico ou subdivisão de populações (Figura 3).

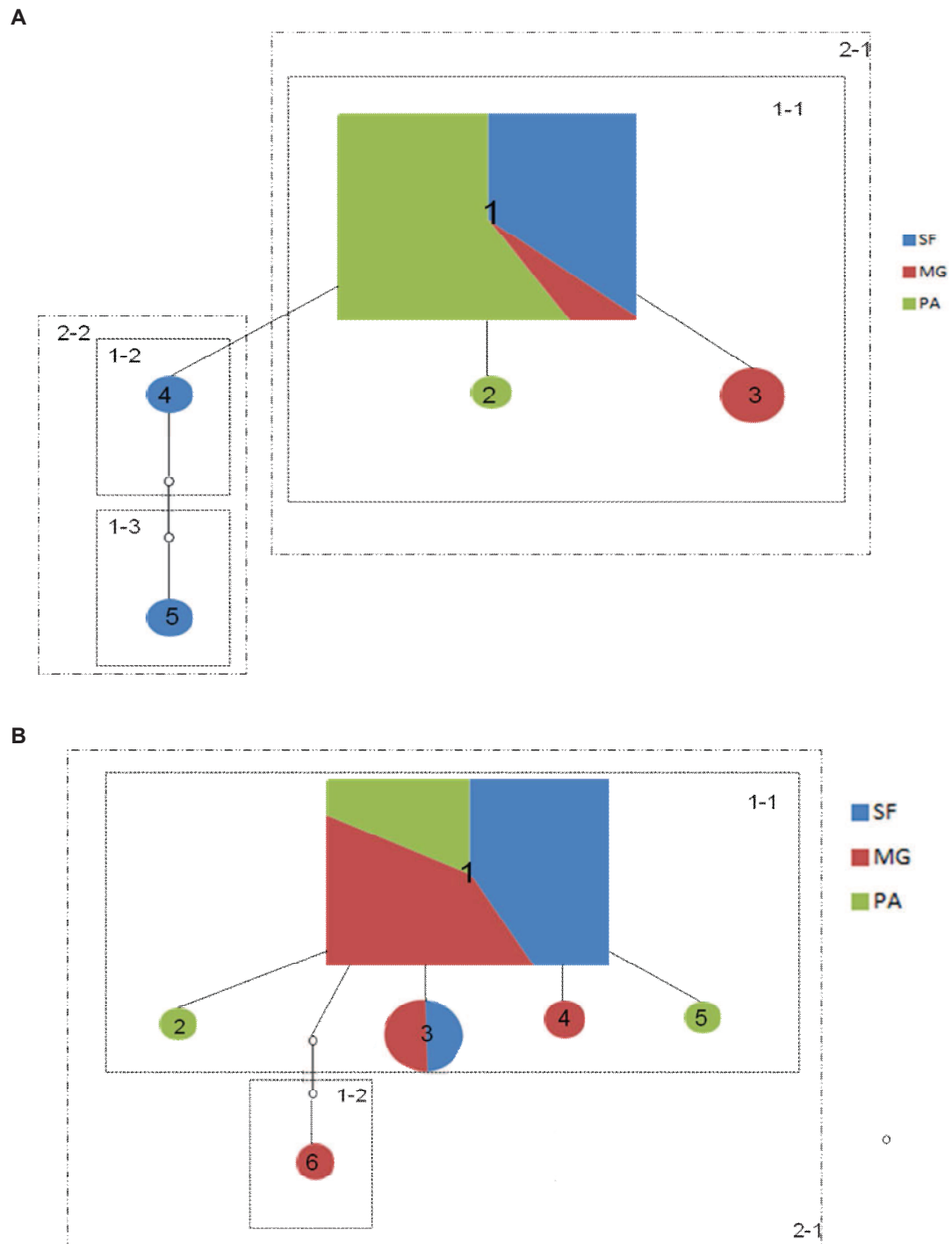


Figura 2. Redes de haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (A) e II (B) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. Os números (1 a 5 para COI, e 1 a 6 para COII) representam os haplótipos observados para cada população. Linhas inteiras e tracejadas correspondem aos aninhamentos para análise NCPA (Templeton, 1998). SF = Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR); MG = Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR); PA = Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR).

Tabela 6. Resultados dos testes de neutralidade e *Mismatch Distribution* realizados para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. PA = Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava-PR); SF = Parque Municipal São Francisco da Esperança (Guarapuava-PR); MG = Parque Estadual da Mata dos Godoy (Londrina-PR). n = número de indivíduos amostrados.

Populações		n	D de Tajima	Fs de Fu	D*	F*	R2	<i>Mismatch Distribution</i>
COI								Tau: 0,41
	PA	13	0,000	0,00000	-	-	-	$\theta_0 = 0,0000$
	SF	9	-1,006	-0,09474	0,84	0,74	-	$\theta_1 = 66666,14$
	MG	3	-1,140	-2,1352 ¹	-	-	-	SSD = 0,11
Total		25	-0,483	-0,74334	0,83	0,48	0,24 ²	p = 0,87
COII								Tau: 1,23
	PA	23	-1,23	-0,920	-1,29	-1,37	-	$\theta_0 = 0,0000$
	SF	4	-1,14	0,4700	-1,32	-1,44	-	$\theta_1 = 66666,15$
	MG	37	-1,88 ²	-1,15	-2,40 ²	2,59 ²	-	SSD = 0,09
Total		64	-1,42	-0,84 ¹	-3,00 ²	-3,18 ²	0,27 ²	p = 0,24

¹ $p \leq 0,02$ - valor significativo para o Fs de Fu; ² $p \leq 0,05$ – valor significativo para os demais testes de neutralidade (Fu, 1997; Excoffier et al., 2005).

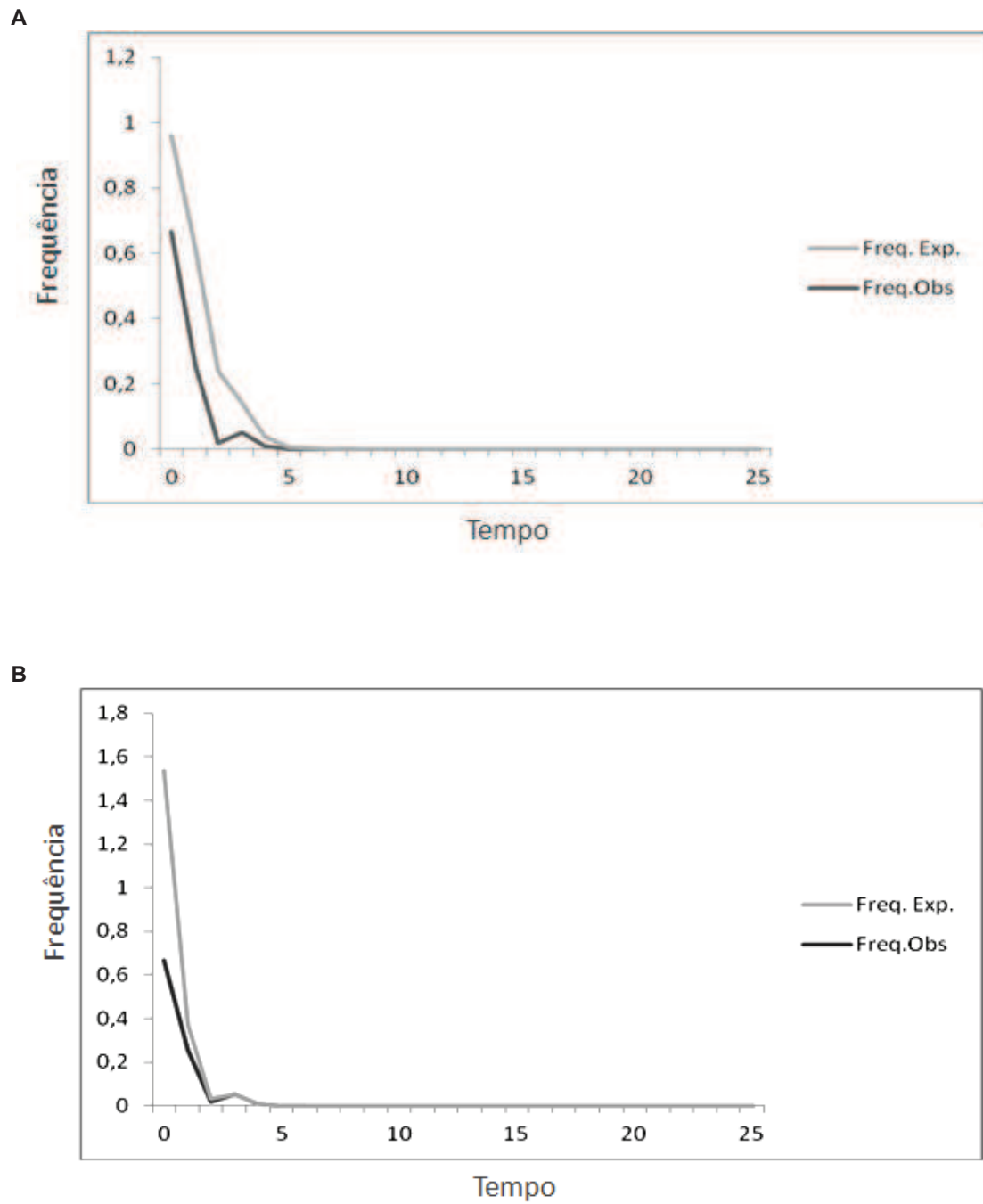


Figura 3. *Mismatch Distribution* para o gene Citocromo Oxidase I (A), $p = 0,87$ e II (B), $p = 0,24$ para populações de *Drosophila maculifrons* do estado do Paraná, na região sul do Brasil. Linha cinza representa a frequência esperada; linha preta representa a frequência observada.

4.1.5. Discussão

A variabilidade genética encontrada neste trabalho para os genes COI e COII de populações de *Drosophila maculifrons* resultou em diversidade haplotípica semelhante para ambos os genes ($h = 0,4087$ - COI; $h = 0,3602$ - COII), e em valores médios baixos de diversidade nucleotídica ($\pi = 0,000476$ - COI; $\pi = 0,000651$ - COII) (Tabela 3) quando comparados aos índices encontrados para outras populações desta mesma espécie por De Ré (2012), e com espécies cactofílicas, tais como: *D. borborema*, *D. serido* e *D. buzzati* (de Brito et al., 2002; Santos, 2011; Franco e Manfrin, 2012). Segundo Lohman e colaboradores (2008), a baixa diversidade genética pode ser influenciada por eventos históricos, como gargalo de garrafa, uma rápida expansão e/ou a ação da seleção sobre o genoma mitocondrial.

Os testes de neutralidade, principalmente o F_s de F_u , apresentaram desvios, podendo indicar um evento de expansão que pode ser responsável pela baixa variação dos genes COI e COII encontrada para as populações de *Drosophila maculifrons*. Outra possibilidade para explicar a baixa diversidade, também envolvendo evento de expansão populacional, é que os indivíduos podem ser descendentes de uma expansão, a partir da qual o polimorfismo ancestral foi mantido após contração populacional (Lohman et al., 2008).

Em geral, os testes de neutralidade apresentam desvios devido ao tamanho pequeno amostral, demografia e a presença de estruturação populacional. Contudo, quando o foco são genes e não o genoma, um panorama sobre os eventos que podem ter ocorrido pode ser mais amplo do que o demonstrado por estes índices. Por exemplo, seleção balanceadora pode ser a explicação para a diminuição da variabilidade quando não há heterogeneidade nas taxas de mutação, visto que a purificadora tem sido relacionada com a redução na variação inclusive em regiões de recombinação. Portanto, a aplicação de uma análise mais refinada poderia comprovar o isolamento ou restrição ao fluxo gênico entre as populações devido à distância, e, assim, seria possível supor que a seleção balanceadora estaria mantendo um polimorfismo ancestral que justificaria a não diferenciação genética encontrada para os genes (Hartl e Clark, 1997; Kim e Stephan, 2002; Stephan, 2010). Apesar dos problemas encontrados na aplicação dos testes de neutralidade, a disposição dos haplótipos na rede pode indicar evento de expansão populacional

(Figura 2). Segundo Templeton (2011), os representantes mais jovens, raros ou pouco frequentes, estão dispersos geograficamente de seu ancestral, sendo localizados nas extremidades das redes, o que pode revelar um “sinal de expansão”.

Além disso, as principais diferenças encontradas nos testes podem ser em grande parte pela fitofisionomia das áreas de Mata Atlântica em que as populações são encontradas. As populações PA e SF pertencem a Floresta Ombrófila Mista (FOM) da região de Guarapuava, localizada no centro-sul do estado do Paraná, enquanto que a população MG pertence a Floresta Estacional Semidecidual (FES), no norte do estado do Paraná. A primeira, FOM, tem presença considerável do Pinheiro-do-Paraná, *Araucaria angustifolia*, e a região de Guarapuava-PR apresenta clima mesotérmico, úmido e superúmido, sem estação seca, com verões frescos e com médias dos meses mais quentes inferiores a 22° C, conforme classificação de Köeper. As geadas desta região são severas e frequentes, e a temperatura média do mês mais frio é 12,9° C. Já a FES é composta por florestas fisionomicamente variáveis, de elementos arbóreos (perenifólios ou decíduos), arbustivos, liana e epífitas, com clima sub-tropical úmido mesotérmico, com verões quentes e geadas pouco frequentes, e a temperatura média no inverno é de 18° C (Maack 1981; Buschini, 2006). Dados florísticos no ecótone da FOM e da FES revelam que as duas áreas são consideravelmente diferentes em sua complexidade estrutural, o que pode ter reflexo na composição faunística da região (Mikich e Silva, 2001).

A variação entre os grupos categorizados para aplicação da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene COI foi de aproximadamente 63,51%, indicando estruturação populacional entre os grupos. Contudo, para o gene COII, a maior variação observada foi entre as populações dentro dos grupos (101,12%), o que sugere estruturação populacional (Tabela 4). Este dado é corroborado também pelos valores de F_{st} (Tabela 5) que indicam estruturação devido a taxas reduzidas ou quase nulas de fluxo gênico.

Desse modo, a partir desta amostragem é possível estimar que eventos recorrentes e históricos possam ter influenciado a distribuição das três populações de *Drosophila maculifrons* da região sul do Brasil analisadas. A fitofisionomia da Mata Atlântica e/ou a distância entre as áreas amostradas podem ser responsáveis pelo fluxo gênico restrito, o qual conseqüentemente determinou a estruturação das populações.

4.1.6. Conclusão

A diversidade nucleotídica observada para as populações de *Drosophila maculifrons* analisadas foi baixa quando comparada com a encontrada na literatura. Essa baixa diversidade pode ser explicada por diferentes fatores históricos, como eventos de gargalo de garrafa, expansão populacional, e/ou seleção balanceadora com manutenção de polimorfismo ancestral.

As populações de *Drosophila maculifrons* estão estruturadas geneticamente devido, provavelmente, ao fato de as áreas amostradas apresentarem uma distância relativamente grande e pertencerem a fitofisionomia muito distintas (FOM e FES) da Mata Atlântica do sul do Brasil.

4.1.7. Referências bibliográficas

AVISE, J.C. **Phylogeography: history and formation of species**. 1 ed. Harvard: Harvard University Press, 2000.

BUSCHINI, M.L.T. Species diversity and community structure in trap-nesting bees in Southern Brazil. **Apidologie**, v. 37, p. 58-66, 2006.

de BRITO, A.R.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology** v. 25p.161-171, 2002.

DE RÉ, F.C. **Filogeografia de *Drosophila maculifrons* e *Drosophila grisolineata* na região sul do Brasil**. 2012. 70f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal). Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

DINERSTEIN, E.; OLSON, D.M.; GRAHAM, D.J.; WEBSTER, A.L.; PRIMM, S.A.; BOOKBINDER, M.P.; LEDEC, G. **A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean**. Washington D.C.: The World Bank in association with The World Wildlife Fund, 1995.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005.

FRANCO, F.F.; MANFRIN, M. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. **Journal of Biogeography**, Published on line, 2012.

FU, Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147, p.915-925, 1997.

- HARTL, D.; CLARK, A. G. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Sunderland MA, 3 rd ed., 542 p, 1997.
- HATADANI, L.M.; MCINERNEY, J.O.; MEDEIROS, H.F.; JUNQUEIRA, A.C.M.; AZEREDO-ESPIN, A.M.; KLACZKO, L.B. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related groups (Diptera: Drosophilidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** v.51, p. 595–600, 2009.
- KASTRITSIS, C. D. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. **J. Heredity**, v.60, p.51-57, 1969.
- KASTRITSIS, C.D., PASTEUR, G., QUICK, J.. Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediotriata* and *Drosophila griseolineata*. **Canad. J. Genet. Cytol.** v.12, p.952–959, 1970.
- KIM, Y.; STEPHAN, W. Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome. **Genetics**, v. 160, p. 765–777, 2002.
- LOHMAN, D. J.; PEGGIE, D.; PIERCE, N. E.; MEIER, R. Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae). **BMC Evolutionary Biology**, v.8, p.301, 2008.
- MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 2 ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1981.
- MIKICH, S. B.; SILVA, S. M. Composição Florística e Fenologia das espécies zoocóricas de remanescentes de floresta estacional semidecidual no centro-oeste do Paraná, brasil. **Acta bot. bras.**, v.15, p. 89-113, 2001.
- PEREIRA, M.A.Q.R.; VILELA, C.R.; SENE, F.M. Notes on breeding and feeding sites of some species of the repleta group of the genus *Drosophila*(Diptera, Drosophilidae). **Cienc. Cult.**, v. 35, p. 1313-1319, 1983.
- RIBEIRO, M.C; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distribution? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.
- ROBE, L. J.; VALENTE, V.L.S.; BUDNIK, M.; LORETO, E.L.S. Molecular Phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 36, p. 623–640, 2005.
- ROBE, L. J.; VALENTE, V. L. S.; LORETO, E. L. S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v. 138, p.725–735, 2010a.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the "Drosophila" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* v.48, p. 310–321, 2010b.

SAAVEDRA, C.C.R.; VALENTE, V.L.S.; NAPP, M. An ecological/genetic approach to the study of enzymatic polymorphisms in *Drosophila maculifrons*. **Braz. J. Genet.**, v. 18, p. 147-164, 1995.

SANTOS, M. H. **As rotas de dispersão de *Drosophila buzzatii* na América do Sul**. 2011. 128f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2011.

STEPHAN, W. Genetic hitchhiking versus background selection: the controversy and its implications. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v.365, p. 1245–1253, 2010.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** v.10, p.512, 1993.

TEMPLETON, A.R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 381-397, 1998.

TEMPLETON, A.R. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva**. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1991.

YOTOKO, K.S.C.; MEDEIROS, H.F.; SOLFERINI, V.N.; KLACZKO, L.B. A molecular study of the Systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 28, p. 614-619, 2003.

4.2. Capítulo II

**FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA EVOLUTIVA DA ESPÉCIE *Drosophila ornatifrons*
(DIPTERA, DROSOPHILIDAE)**

Emanuele Cristina Gustani¹, Ana Paula Ferreira Oliveira¹, Mateus Henrique Santos², Luciana Paes de Barros Machado¹, e Rogério Pincela Mateus¹

¹Laboratório de Genética e Evolução, Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Guarapuava/PR, Brasil.

²Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG - Ponta Grossa/PR, Brasil.

Running Title: *Drosophila ornatifrons* phylogeography

Key-words: genetic variability, citocromo oxidase, DNA mitocondrial, Atlantic Forest, expansão demográfica.

Corresponding Author: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus – Laboratório de Genética e Evolução do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, *Campus* CEDETEG – Guarapuava/PR.

Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Bairro Vila Carli – CEP. 85040-080 – Guarapuava/PR, Brasil.

Fones: (42) 3629-8179 – Laboratório de Genética e Evolução

(42) 3629-8125 – Departamento de Ciências Biológicas

FAX: (42) 3629-8145

E-mail: rogeriopmateus@gmail.com

Resumo

A espécie *Drosophila ornatifrons* do grupo *guarani* é encontrada principalmente em ambientes úmidos do bioma Mata Atlântica, em especial na região sul do Brasil. Eventos de fragmentação históricos e contemporâneos influenciaram a diversidade e distribuição das espécies neste bioma. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura populacional e demográfica de *D. ornatifrons* de localidades de coletas de remanescentes de Mata Atlântica do sul do Brasil, com o propósito de contribuir para o entendimento dos eventos que podem ser responsáveis pelo padrão de distribuição das espécies neste local. Os resultados obtidos indicam que *D. ornatifrons* possivelmente sofreu um evento de expansão demográfica a partir das localidades mais ao sul e próximas ao litoral, de remanescentes de Mata Atlântica inseridos no bioma Pampa (agrupamento Sul 2), em direção ao interior (agrupamento Sul 1). Este evento teria ocorrido entre 20.000 e 25.000 anos atrás, no período Wisconsiniano, após o último máximo glacial, quando houve aumento da temperatura. Neste trabalho é discutido como os haplótipos encontraram barreiras ao fluxo gênico e à dispersão, influenciadas pelo padrão biogeográfico da Mata Atlântica.

Introdução

A Mata Atlântica é uma das maiores florestas tropicais do mundo, tem formação antiga, provavelmente durante o Cretáceo e Terciário, apresentando distribuição restrita nos períodos mais frios e secos do Pleistoceno (Redford e Eisenberg, 1992; Ribeiro et al., 2009). Este bioma tem uma história geológica complexa e pouco conhecida e, por esta razão, existem diferentes hipóteses para explicar como a diversidade biológica pode ter se originado neste local. Estas hipóteses baseiam-se na diversificação das espécies por alopatria e simpatria: em refúgios, formados na intercalação de períodos glaciais e interglaciais (Haffer, 1969); e/ou devido a ação da seleção diversificadora sobre gradientes ambientais/ecológicos e tipos vegetacionais distintos (Endler, 1977); e/ou em decorrência de eventos paleogeográficos, tais como a separação de continentes ou soerguimento de montanhas (Platnick e Nelson, 1978); e/ou o agente limitador do fluxo gênico entre as populações naturais, e consequente diferenciação e especiação, seriam as grandes extensões aquáticas e com fluxo substancial de água (Pellegrino et al., 2005).

A ocupação original da Mata Atlântica era de cerca de 150 milhões de hectares do território brasileiro, porém atualmente, devido principalmente ao desmatamento, é composta de cerca de 7% a 16% de remanescentes da cobertura inicial (SOS Mata Atlântica/INPE, 1993, 2000; Dinerstein et al., 1995; Galindo-Leal e Câmara, 2003; Ribeiro et al., 2009). A área de ocorrência desta floresta compreende a costa brasileira desde os estados do Rio Grande do Norte até o Rio do Grande do Sul, com largura muito variável, podendo se estender do sudeste do Brasil até o leste do Paraguai e na província de Misiones na Argentina (Cabrera e Willink, 1973; Galindo-Leal e Câmara, 2003; Oliveira-Filho et al., 2006).

Devido aos eventos contemporâneos e históricos de fragmentação desta floresta, se torna relevante conhecer como esses fatores atuaram sobre o bioma da Mata Atlântica e, consequentemente, influenciaram a constituição e distribuição de sua diversidade. Os insetos

tem sido frequentemente utilizados como modelos em trabalhos que investigam padrões filogeográficos previamente descritos para espécies de vertebrados, utilizando as hipóteses biogeográficas como base para o estudo.

O gênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) é indicado para estudos filogeográficos, pois apresenta tanto espécies com ampla distribuição, podendo ser encontradas em ambientes variados como matas, campos ou ambientes xéricos; enquanto que outras apresentam distribuição mais restrita (Sene et al., 1982). Espécies de *Drosophila* cactófilas vem sendo utilizadas em trabalhos filogeográficos de ambientes xéricos da América do Sul (Manfrin et al., 2001; de Brito et al., 2002a; Franco e Manfrin, 2012), contudo espécies deste gênero ainda não foram empregadas para o entendimento dos eventos que podem ter contribuído com o padrão de distribuição na Mata Atlântica.

O grupo de *Drosophila guarani* é endêmico do Neotrópico e era dividido em dois subgrupos: *guarani* e *guaramunu* (King, 1947). Contudo, recentemente estes subgrupos foram elevados à categoria de grupo, corroborado por um conjunto de análises citogenéticas e moleculares que suportam esta alteração taxonômica (Kastritsis, 1969; Kastritsis et al. 1970; Yotoko et al., 2003; Robe et al., 2005, 2010a, 2010b; Hatadani et al., 2009).

Drosophila ornatifrons pertence ao grupo *guarani* e populações desta espécie são encontradas principalmente em ambientes úmidos de Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil (Medeiros e Klaczko, 2004; Gottschalk et al., 2007; Döge et al., 2008; Hochmüller et al., 2010; Cavasini et al., 2013), contudo indivíduos desta espécie também foram coletados em florestas de galerias do cerrado, e mais raramente nas savanas (Tidon, 2006). Poucos são os estudos que abordam a variabilidade das populações de *D. ornatifrons*, apenas recentemente a estrutura de populações do sul e sudeste do Brasil foi averiguada por meio da análise de *loci* isoenzimáticos (Machado et al., 2012).

A relação da frequência de *Drosophila ornatifrons* com ambientes úmidos de mata faz com que esta espécie seja importante para o entendimento de como e quais eventos ecológicos e/ou históricos influenciaram o padrão de distribuição das espécies no bioma brasileiro da Mata Atlântica. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo inédito da estrutura populacional de *D. ornatifrons*, utilizando haplótipos dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase I e II, contribuindo para a elucidação de sua história evolutiva, além de, por meio de análises filogeográficas, inferir quais os fatores que atuaram na variação e distribuição desta espécie no bioma Mata Atlântica do sul do Brasil.

Material e Métodos

Esta seção está descrita no item 3 desta dissertação

Resultados

Sequenciamento dos genes COI and COII

Foram sequenciados 717 pares de bases (pb) do gene COI de 51 indivíduos de *Drosophila ornatifrons*, de nove localidades do sul do Brasil, resultando em seis haplótipos. Para o gene COII, foram sequenciados 714 pb de 64 indivíduos coletados em seis localidades, resultando em 11 haplótipos. Foi encontrado um único haplótipo do gene COI na localidade Guarapuava-PR, e este foi exclusivo desta área. Também foram observados dois haplótipos exclusivos de COI em Canguçu-RS, e um em Chapecó-SC (Tabela 2). Para o gene COII foram encontrados haplótipos exclusivos em Guarapuava-PR (1), Canguçu-RS (2) e Ilha dos Marinheiros (5) (Tabela 3). O melhor modelo de substituição nucleotídica escolhido, que pode explicar a evolução das sequências ao longo do tempo, para ser aplicado nestes dados para ambos os genes, foi T92 seguido por HKY e TN93.

O agrupamento Sul 2 (Porto Alegre-RS, Canguçu-RS, Ilha dos Marinheiros-RS, Taim-RS) apresentou os maiores índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h), para ambos os genes (Tabela 4).

Estrutura populacional e Fst

Para o gene COI, a maior porcentagem da variação foi encontrada dentro das localidades, já para COII a maior variação foi entre localidades dentro dos grupos (Tabela 5). Os valores de Fst para COI indicam que Guarapuava-PR está estruturada em relação a maioria das localidades, com exceção de Horizontina-RS, São Nicolau-RS e Porto Alegre-RS. Dentre as localidades amostradas para COII, Guarapuava-PR também apresentou estruturação em relação a maioria, com exceção de Horizontina-RS e Porto Alegre-RS (Tabela 6).

Rede de haplótipos

As redes de haplótipos não enraizadas mais parcimoniosas geradas para os genes COI e COII (Figura 2) de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil apresentaram forma de estrela (*star shape*, segundo Avise, 2000). Esta configuração pode ser provavelmente resultado da distribuição mais ampla de alguns haplótipos, enquanto outros são mais restritos, sendo encontrados nas extremidades. A rede gerada para o gene COI demonstra que a maior variação foi observada no agrupamento Sul 2, evidenciada pelo maior número de haplótipos; o haplótipo 1, representado pelo retângulo (Figura 2), é sugerido ser a possível ligação entre os haplótipos encontrados para COI. Para o gene COII, a maioria da variação também foi observada no agrupamento Sul 2; e o haplótipo 1, representado pelo retângulo (Figura 2), apresenta a maior frequência e demonstra a relação entre o restante dos haplótipos.

A análise de NCPA realizada para COII (Tabela 7) foi corroborada pelo teste de Mantel ($r = 0,6979$; $p = 0,005$) e indica que fluxo gênico restrito pela distância seria o evento evolutivo responsável pelo padrão de distribuição demográfica dos haplótipos.

História demográfica

Os índices totais dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu foram negativos e não significativos para as sequências do gene COI de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil (Tabela 8). Estes resultados indicam que os fatores evolutivos atuantes não geraram desequilíbrio populacional. Já para o gene COII, os valores totais de D de Tajima e Fs de Fu foram negativos e significativos, indicando que algum evento ou fator evolutivo possa ter perturbado o equilíbrio. Considerando a categorização realizada para a análise de AMOVA, o agrupamento Sul 2 de COI apresentou Fs de Fu negativo e significativo, já para o gene COII, os dois índices de neutralidade foram negativos e significativos para este agrupamento. Os índices D* e F* foram negativos e não significativos para COI, e negativos e significativos para COII no total e também para o agrupamento Sul 2; enquanto que o índice R2 foi significativo para ambos os genes.

O gráfico de Mismatch Distribution resultou na presença de uma curva multimodal para o gene COI, o que sugere tanto equilíbrio demográfico, quanto subdivisão de populações. Para o gene COII, o gráfico produziu uma curva unimodal, indicando um evento de expansão populacional (Figura 3).

Datação temporal

A análise Bayesiana indica que pode ter ocorrido uma intensificação da expansão populacional entre 20.000 e 25.000 anos atrás que corresponde ao término do período Wisconsiniano do Pleistoceno, ao final da última glaciação (Figura 4).

Discussão

A análise de variabilidade genética dos genes COI e COII da espécie *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul Brasil revelou valores médios de diversidade haplotípica (0,2163 – COI; 0,6038 – COII, Tabela 4) maiores que os observados para populações de *D. maculifrons*, e inferiores que os detectados para *D. grisolineata*, provenientes da mesma região do Brasil (De Ré, 2012). Estas duas espécies tem relação filogenética estreita com *D. ornatifrons*, pertencendo ao grupo *guaramunu* da “radiação” *tripunctata*, a qual inclui o grupo *guarani* de *D. ornatifrons* (Hatadani et al., 2009; Robe et al., 2010a, 2010b).

Os valores observados de diversidade nucleotídica de *Drosophila ornatifrons* (0,000269 – COI; 0,000948 – COII) são considerados baixos quando comparados aos índices encontrados para outras espécies de *Drosophila* (de Brito et al., 2002a, 2002b; Santos, 2011; De Ré, 2012; Franco e Manfrin, 2012). Vários fatores são responsáveis pela alteração/diminuição da diversidade genética, tais como: populações que historicamente experimentaram pouco ou nenhum fluxo gênico por longos períodos de tempo (Carvalho e Almeida, 2010); quando são amostradas populações do centro de dispersão de uma espécie; a ocorrência de evento de expansão de população, pois a partir do ponto de origem os haplótipos são mais difundidos e com menor diversidade; gargalo de garrafa; ou ainda, a ação de seleção natural (Cann et al., 1987; Templeton, 1998; de Brito et al., 2002b; Lohman et al., 2008).

O conjunto de dados obtidos para COII sugere que um evento de expansão populacional poderia ser responsável pela baixa diversidade nucleotídica observada para *Drosophila ornatifrons*, quando comparado com outras espécies deste gênero. A expansão populacional foi revelada pelos índices de F_s de F_u , que é o mais sensível entre os testes de neutralidade, e R_2 , que representa o índice mais adequado para ser aplicado em amostras

pequenas como as deste trabalho, além do teste D de Tajima (Tabela 8) e da Análise Bayesiana (Figura 4). Deste modo, o conjunto de dados obtidos para COII sugere que um evento de expansão populacional poderia ser responsável pela baixa diversidade nucleotídica observada para *Drosophila ornatifrons*, quando comparado com outras espécies deste gênero.

De acordo com a datação realizada pela Análise Bayesiana, este evento de expansão pode ter ocorrido entre 25.000 e 20.000 anos atrás, e se intensificado até o presente (Figura 4). Este intervalo corresponde aproximadamente ao final da última glaciação no hemisfério norte, no período Winscosiano do Pleistoceno, nesta época os níveis dos oceanos estavam retraídos entre 80 e 130 metros em relação aos níveis atuais, e a plataforma continental estava emersa em grande parte, devido ao resfriamento e congelamento completo deste hemisfério (Sugiuo, 2008). No hemisfério sul, contudo, durante o Pleistoceno ocorreu apenas uma pequena variação térmica em relação aos níveis atuais, com temperaturas em torno de cinco ou seis graus inferiores as observadas atualmente e não houve formação de geleiras (McFadden e McAulife, 1977; Vester e Van Rooyen, 1999).

Estudos em área preservada de Mata Atlântica no planalto do Itatiaia, no estado de Minas Gerais, revelaram que a principal modificação ambiental durante o último máximo glacial do Pleistoceno foi a queda de temperatura, porém processos geocriogênicos ocorreram apenas acima de 2.000 metros de altura, com nevadas abundantes cobrindo os picos mais altos, como, por exemplo, da Serra da Mantiqueira. Durante o Holoceno, houve diminuição das atividades morfodinâmicas e dos processos geomórficos, as condições ambientais tornaram-se mais constantes, com predominância de clima mais úmido, o qual permaneceu, sem grandes interrupções, nos últimos 8.500 anos (Modonesi, 1992; Modonesi-Gauttieri e Nunes, 1998).

Dados de levantamento de fauna sugerem que um dos fatores determinantes para a ocorrência de *Drosophila ornatifrons* seja umidade alta e temperatura amena, visto que a

maior frequência de indivíduos desta espécie é observada em áreas de matas mais úmidas da Mata Atlântica do sul e sudeste do Brasil (Medeiros e Klaczko, 2004; Gottschalk et al., 2007; Döge et al., 2008; Hochmüller et al., 2010; Cavasini et al., 2013), e floresta de galeria do Cerrado (Tidon, 2006), sendo raramente coletada ou ausente na Floresta Amazônica (Martins, 1987; Acurio e Rafael, 2009), na fitofisionomia Floresta Semidecídua e Decídua da Mata Atlântica (Medeiros e Klaczko, 2004; dados de coleta deste trabalho), na savana (Tidon, 2006), em Floresta de Mangue (Schmitz et al., 2007), áreas de restinga (Bizzo et al., 2010) e Floresta Ombrófila Densa e Mata Paludosa do litoral (Medeiros e Klaczko, 2004; dados de coleta deste trabalho), e no Pampa gaúcho (Poppe et al., 2012).

A baixa frequência de indivíduos de *Drosophila ornatifrons* na fitofisionomia Floresta Semidecídua da Mata Atlântica também foi evidenciada nas coletas para este trabalho, realizadas em novembro de 2012 em três áreas distintas desta fisionomia no sudeste do Brasil. Mesmo utilizando metodologia de coleta mais adequada para captura de espécimes da “radiação” *tripunctata* (Medeiros e Klaczko, 2004; dos Santos et al., 2010), e em períodos mais úmidos, nenhum indivíduo de *D. ornatifrons* foi coletado (dados não mostrados). Ainda, regiões de mata mais propícias para a captura desta espécie muitas vezes apresentam baixa frequência de indivíduos (confirmado pelo pequeno número amostral deste trabalho, Tabela 1), sugerindo que além dos fatores abióticos (temperatura e umidade), fatores ecológicos ainda não identificados também parecem ser importantes para a ocorrência de *D. ornatifrons*. Por exemplo, Gottschalk e colaboradores (2009) observaram que a maioria das espécies de *Drosophila* coletadas em fungos da Mata Atlântica e em ambientes antropizados do sul e sudeste do Brasil pertence a radiação *imigrans-tripunctata*, a qual o grupo *guarani* pertence, contudo nenhum indivíduo de *D. ornatifrons* foi encontrado, indicando que estas espécies são mais versáteis no uso dos recursos que *D. ornatifrons*. A limitação de *D. ornatifrons* em explorar o meio, quando comparada a outras espécies de grupos relacionados, também pode

ser uma das causas da baixa frequência de indivíduos desta espécie na maioria das áreas de coleta.

Deste modo, a distribuição atual das populações de *Drosophila ornatifrons* em fragmentos de Mata Atlântica do sul do Brasil, assim como da sua variabilidade genética, seria resultado da combinação de fatores climáticos recentes e históricos, com fatores ecológicos, paleogeográficos, e da ocorrência de possíveis refúgios. A maior diversidade haplotípica dos genes COI e COII foi observada nas localidades do grupo Sul 2, de fragmentos de Mata Atlântica inseridos no Pampa. O estabelecimento de populações nesta área deve ser muito anterior há 10.000 anos, visto que estudos no Parque Nacional dos Aparados da Serra no Rio Grande do Sul evidenciaram que, com aumento da umidade neste período, houve expansão gradativa da mata sobre o campo, o que permitiria que as populações de *D. ornatifrons* acompanhassem a expansão da mata em direção aos domínios do bioma Pampa (Roth e Lorscheitter, 1993).

O padrão de distribuição da variabilidade haplotípica de *Drosophila ornatifrons* pode ser decorrência da dispersão da variação a partir de uma população ancestral do grupo Sul 2 (com maior diversidade haplotípica), possivelmente do litoral, pois a proximidade com o mar nesta região seria propícia para a conservação da umidade, determinante para a ocorrência da espécie, fornecendo condições para expansão e estabelecimento de novas populações nos períodos menos frios ao final do último máximo glacial, entre 25.000 e 20.000 anos atrás, de acordo com a datação da análise Bayesiana (Figura 4). A migração de *D. ornatifrons* pode ter se intensificado quando as temperaturas ficaram mais constantes, a partir do Holoceno (aproximadamente há 10.000 anos).

A ocupação mais recente das áreas do grupo Sul 1 pode ser inferida pela diminuição da variação conforme se aumenta a distância do provável centro de dispersão, como pode ser visualizado na rede de haplótipos de COII (Figura 2), e também pelo menor número de

haplótipos exclusivos do gene COII encontrados no grupo Sul 1 (1) em relação ao grupo Sul 2 (sete, sendo cinco da localidade de Ilha dos Marinheiros-RS). Na rede para o gene COII (Figura 2), os haplótipos mais recentes (na extremidade) são encontrados nas localidades do grupo Sul 2, sugerido como a área ancestral do grupo Sul 1, pois um haplótipo recente (novo) tem maior probabilidade de ser encontrado e mantido em uma linhagem em seu local de origem. Este fato se deve a capacidade de dispersão limitada destes insetos em áreas naturais, resultando em um longo período de tempo para que uma nova mutação possa atingir uma maior amplitude geográfica, a menos que a espécie ocupe áreas contíguas, o que aumentaria a probabilidade de fixação desta mutação. Já a localidade de Guarapuava-PR (com o maior número de indivíduos amostrados) pode ter sofrido efeito do fundador ou de gargalo que tenha reduzido a variação ancestral e fixado por deriva genética um único e raro (exclusivo) haplótipo para COI.

Os resultados da NCPA para COII (Tabela 7), confirmados pelo teste de Mantel, sugerem um padrão de isolamento restrito pela distância, gerando a associação entre a variação genética e geográfica observada para *Drosophila ornatifrons*. Ao longo da migração de *D. ornatifrons* para novas áreas, os indivíduos podem ter encontrado barreiras a sua dispersão devido a alterações latitudinais de clima e zonação ecológica da Mata Atlântica que podem ter sido originadas na formação deste bioma. Segundo Carnaval e colaboradores (2009), estes gradientes de variação podem ser esperados em florestas, com as espécies apresentando variados níveis de tolerância e nichos, e quando, e se, transpostos, esses gradientes seriam capazes de gerar diferenciação e especiação por meio da ação de seleção diversificadora (Endler, 1977; Almeida-Neto et al., 2006).

Além dos processos históricos apresentados que limitaram e/ou influenciaram na distribuição da diversidade genética das populações (capacidade de dispersão e barreiras clinais ao fluxo gênico), o contínuo, crescente e mais recente desmatamento das áreas de

floresta pelo homem funcionaria como barreira ao fluxo gênico, limitando a dispersão e reduzindo a diversidade devido a fragmentação dos habitats. Ainda, mesmo que a destruição de habitats não seja unicamente responsável pela diminuição da diversidade, esta poderia apagar assinaturas ou sinais de processos históricos que facilitariam a melhor compreensão da história evolutiva de uma espécie (Carnaval et al., 2009).

Em conclusão, o estudo da filogeografia de *Drosophila ornatifrons* do bioma Mata Atlântica do sul do Brasil sugere que o extremo sul do Rio Grande do Sul, mais próximo ao litoral (grupo Sul 2), possivelmente representa a área de partida da dispersão/expansão que originou os demais haplótipos dos genes COI e COII. O processo de expansão da população para novas áreas pode ter ocorrido por volta de 20.000 a 25.000 anos atrás, se intensificando até o período recente, após o fim do Pleistoceno quando as temperaturas se tornaram menos variáveis, e o clima mais úmido. A restrição à distribuição da diversidade a partir do litoral mais ao sul do Brasil para as demais áreas é resultado da capacidade limitada de dispersão destes insetos, associada a dificuldade de transpor barreiras clinais frequentes em ambientes de floresta, como a Mata Atlântica. Estes eventos históricos e outros mais recentes, como o desmatamento por ação antrópica, resultariam na descontinuidade do habitat de *D. ornatifrons*, e na conseqüente diminuição da diversidade haplotípica conforme o aumento da distância a partir da população ancestral.

Agradecimentos

Os autores agradecem L J Robe da Universidade Federal do Rio Grande (FURG-RS) e M Gottschalk da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL-RS) por ceder espécimes e auxílio na identificação, Tais Lavagnini pelo suporte na realização da análise BSP, a CAPES pela bolsa a E C Gustani e A P F Oliveira, e pelo auxílio financeiro fornecido (Proc. 23038.006780/2010-50).

Referências

- Acurio AE and Rafael VL (2009) Inventario taxonómico de Drosophilidae (Diptera) en el Parque Nacional Yasuni, Amazonia Ecuatoriana. *Acta Amazonica* 39:713-718.
- Almeida-Neto M, Machado G, Pinto-da-Rocha R and Giaretta AA (2006) Harvestman (Arachnida: Opiliones) species distribution along three Neotropical elevational gradients: na alternative rescue effect to explain Rapoport's rule? *J Biogeogr* 33:361-375.
- Bizzo L, Gottschalk MS, De Toni D and Hofmann PRP (2010) Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potencial as bioindicator in open environments. *Iheringia Ser Zool* 100:185-191.
- Cabrera A and Willink A (1973) *Biogeografía de América Latina*. Washington, DC: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
- Cann RL, Stoneking M and Wilson AC (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36.
- Carnaval A C, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT and Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* 323:785-789.
- Carvalho CJB and Almeida EAB (2010) *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. 1st edition. Roca, Ribeirão Preto, 306 pp.
- Cavasini R, Buschini MLT, Machado LPB and Mateus RP (2013) Comparison of Drosophilidae (Diptera) Assemblages from two Highland Araucaria Forest Fragments, with and without Environmental Conservation Policies. *Braz J Biol in press*.
- de Brito ROA, Manfrin MH and Sene FM (2002a) Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet Mol Biol* 25:161-171.
- de Brito ROA, Manfrin MH and Sene FM (2002b) Nested cladistic analysis of brasilian populations of *Drosophila serido*. *Mol Phylogenet Evol* 22:131-143.

De Ré F C (2012) Filogeografia de *Drosophila maculifrons* e *Drosophila grisolineata* na região sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Dinerstein E, Olson DM, Graham DJ, Webster AL, Primm SA, Bookbinder, MP and Ledec G (1995) A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean. The World Bank in association with The World Wildlife Fund, Washington D.C.

Döge JS, Valente VLS and Hofmann PRP (2008) Drosophilids (Diptera) from an Atlantic Forest Area in Santa Catarina, Southern Brazil. Rev Bras Entomol 52:615-624.

dos Santos K, Machado LPB and Mateus RP (2010) Sampling two species of the *Drosophila guarani* group in a fragment of Araucaria Forest: testing different types of baits, fermentation time, and period of the day. Drosoph Inf Serv 93:185-188.

Endler JA (1977) Geographic variation, speciation and clines. Princeton University Press, Princeton, 246 pp.

Excoffier LG, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 1:47-50.

Franco FF and Manfrin MH (2012) Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. J Biogeogr Published 40:142-154.

Fu Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147:915-925.

Galindo-Leal C and Câmara I (2003) Atlantic forest hotspots status: an overview. In: Galindo-Leal C and Câmara I (eds) The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. CABS and Island Press, Washington, pp 3-11.

- Gottschalk MS, De Toni DC, Valente VLS and Hofmann PRP (2007) Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. *Neotrop Entomol* 36:848–862.
- Gottschalk MS, Bizzo L, Döge JS, Profes MS, Hofmann PRP and Valente VLS (2009) Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. *Iheringia Ser. Zool.* 99:442-448.
- Haffer J (1969) Amazonian forest birds. *Science* 165:131–137.
- Hatadani LM, McInerney JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM and Hochmüller CJ, Lopes-da-Silva M., Valente VLS and Schmitz HJ (2010) The drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. *Pap Avulsos Zool* 50:285-295.
- Kastritsis CD (1969) The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. *J Hered* 60:51-57.
- Kastritsis CD, Pasteur G and Quick J (1970) Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediotriata* and *Drosophila griseolineata*. *Can J Genet Cytol* 12:952–959.
- King J C (1947) Interspecific relationships within the *guarani* group of *Drosophila*. *Evolution* 1:143-153.
- Lohman DJ, Peggie D, Pierce NE and Meier R (2008) Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *BMC Evol Biol* 8:301-314.
- Machado LPB, Silva DC, Simão DP and Mateus RP (2012) Spatial variation of genetic diversity in *Drosophila* species from two different South America environments. In: Caliskan M (ed) *Genetic Variation in Animals*. Intech, Rijeka, pp 45-62.

Manfrin MH, de Brito ROA and Sene FM (2001) Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. *Ann Entomol Soc Am* 94:333-346.

Martins M (1987) 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 Par Emilio Goeldi, sér Zool* 3:195-218.

McFadden LD and McAuliffe JR (1997) Lithologically influenced geomorphic responses to Holocene climatic changes in the Southern Colorado Plateau, Arizona: A soil-geomorphic and ecologic perspective. *Geomorphology* 19:303-332.

Medeiros HF and KLACZKO LB (2004) 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 Neotropica* 4:1-12.

Modonesi MC (1992) Depósitos de vertente e evolução quaternária do Planalto do Itatiaia. *Revista do Instituto Geológico* 13:31-46.

Modonesi-Gauttieri MC and Nunes LH (1998) Processos geocriogênicos Quaternários nas cimeiras da Mantiqueira com considerações climáticas. *Revista IG São Paulo* 19:19-30.

Oliveira-Filho AT, Jarenkow JA and Rodal MJN (2006) Floristic relationships of seasonally dry forests of eastern South America based on tree species distribution patterns. In: Pennington RT, Lewis GP and Ratte JA (eds) *Neotropical savannas and dry forests: Plant diversity, biogeography and conservation*. 1 ed, CRC Press, Boca Raton, pp. 159-192.

Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY and Sites JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc Lond* 85: 13–26.

- Platnick N and Nelson G (1978) A method of analysis for historical biogeography. *Syst Zool* 27:1-16.
- Poppe JL, Valente VLS and Schmitz HJ (2012) Structure of Drosophilidae assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa Biome (São Luiz Gonzaga, RS). *Pap Avulsos Zool* 52:185-195.
- Redford KH and Eisenberg, JF (1992) *Mammals of the Neotropics: the Southern cone*. The University of Chicago Press, Chicago, 440 pp.
- Ribeiro MC, Metzger J P, Martensen A C, Ponzoni F J, Hirota M M (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distribution? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142:1141-1153.
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M and Loreto ELS (2005) Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. *Mol Phylogenet Evol* 36: 623–640.
- Robe LJ, Valente VLS and Loreto ELS (2010a) Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 138:725–735.
- Robe LJ, Loreto ELS and Valente VLS (2010b) Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *J Zoolog Syst Evol Res* 48: 310–321.
- Roth L and Lorscheitter ML (1993) Palynology of a bog in Parque Nacional de Aparados da Serra, East Plateau of Rio Grande do Sul, Brazil. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* 8:39-69.
- Santos MH (2011) As rotas de dispersão de *Drosophila buzzatii* na América do Sul. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Schmitz HJ, Valente VLS and Hofmann PRP (2007) Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from Mangrove Forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. *Neotrop Entomol* 36:53-64.

Sene FM, Pereira MAQR and Vilela CR (1982) Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* in South America. In: Barker JSF and Starmer WT (eds) *Ecological Genetics and Evolution: The Cactus–Yeast–Drosophila Model System*. Academic Press, Sydney, pp 97-106.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (1993) *Atlas da evolução dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1990-1995*, São Paulo.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2000) *Atlas dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica*, São Paulo.

Sugio K (2008) *Mudanças Ambientais da Terra*. 1st edition. Instituto Geológico, São Paulo, 336 pp.

Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol Ecol* 7:381-397.

Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol Ecol* 13:789-809.

Tidon R (2006) Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linn Soc Lond* 87:233–247.

Vester E and Van Rooyen TH (1999) Paleosols on a fluvial terrace at Driekop, Northern Province, South Africa as indicators of climatic changes during the Late Quaternary. *Quat Int* 57/58:229-235.

Yotoko KSC, Medeiros HF, Solferini VN and Klaczko LB (2003) A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. *Mol Phylogenet Evol* 28:614–619.

Recursos da Internet

National Center for Biotechnology Information (NCBI GenBank)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (July 11, 2013)

Tabela 2. Haplótipos do gene Citocromo Oxidase I encontrados para *Drosophila ornatifrons* coletada na região sul do Brasil. As localidades foram categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.

Localidades	N	Haplótipos (Frequência)	Haplótipos Exclusivos
Sul 1			
Sul 1a			
Guarapuava-PR	24	H02 (24)	H02
Sul 1b			
Chapecó-SC	03	H03 (2), H04 (1)	H04
Horizontina-RS	01	H03 (1)	
Jacutinga-RS	02	H03 (2)	
São Nicolau-RS	01	H03 (1)	
Sul 2			
Porto Alegre-RS	01	H03 (1)	
Canguçu-RS	15	H01 (1), H03 (11), H05 (1), H06 (2)	H05, H06
Ilha dos Marinheiros-RS	02	H03 (2)	
Taim-RS	02	H03 (2)	

Nota: Número de acesso do *GenBank* – H01: KF358214; H02: KF358215; H03: KF358216; H04: KF358217; H05: KF358218; H06: KF358219.

Tabela 3. Haplótipos do gene Citocromo Oxidase II encontrados para *Drosophila ornatifrons* coletada na região sul do Brasil. As localidades foram categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.

Localidades	N	Haplótipos (Frequência)	Haplótipos Exclusivos
Sul 1			
Sul 1a			
Guarapuava-PR	23	H01 (17), H05 (6)	H05
Sul 1b			
Horizontina-RS	01	H02 (1)	
Jacutinga-RS	03	H01 (2), H02 (1)	
Sul 2			
Porto Alegre-RS	01	H02 (1)	
Canguçu-RS	21	H01 (4), H02 (10), H04 (5), H08 (1), H09 (1)	H08, H09
Ilha dos Marinheiros-RS	15	H01 (3), H02 (6), H03 (1), H04 (1), H06 (1), H07 (1), H10 (1), H11 (1)	H03, H06, H07, H10, H11

Nota: Número de acesso do *GenBank* – H01: KF360843; H02: KF360844; H03: KF360845; H04: KF360846; H05: KF360847; H06: KF360848; H07: KF360849; H08: KF360850; H09: KF360851; H10: KF360852; H11: KF360853.

Tabela 4. Índices de diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (h) para sequências dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) obtidos para *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.

Agrupamentos	COI			COII		
	n	h	π	n	h	π
Sul 1						
Sul 1a	24	0,0000	0,000000	23	0,4032	0,000000
Sul 1b	7	0,2857	0,000402	04	0,66667	0,000937
Sul 2	20	0,3632	0,000406	37	0,7417	0,001907
Total	51	0,2163	0,000269	64	0,6038	0,000948

Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. Φ_{st} = covariância dentro das localidades; Φ_{sc} = covariância entre localidades dentro dos grupos; Φ_{ct} = covariância entre grupos.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes - Variação	Porcentagem - Variação
COI			
$\Phi_{ct} = -0,3243$ $p > 0,05$	13,914	-0,26621	-32,42
$\Phi_{st} = 0,90796$ $p < 0,05$	11,041	1,01172	123,22
$\Phi_{sc} = 0,93050$ $p < 0,05$	3,627	0,07557	9,20
Total	29,333	0,83479	
COII			
$\Phi_{ct} = 0,17008$ $p > 0,05$	5,255	0,09887	17,01
$\Phi_{st} = 0,28043$ $p < 0,05$	0,855	0,06415	11,03
$\Phi_{sc} = 0,13296$ $p < 0,05$	25,517	0,41831	71,96
Total	31,627	0,58133	

Tabela 6. Fst par a par para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil. Valores para COI na linha superior, valores para COII na linha inferior. xxx = localidades não amostradas para COII.

Localities	1	2	3	4	5	6	7	8
1 – Guarapuava-PR	-							
	-							
2 – Chapecó	0,000*	-						
	Xxx	-						
3 – Horizontina	0,991	0,991	-					
	0,991	xxx	-					
4 – Jacutinga	0,027*	0,991	0,991	-				
	0,018*	xxx	0,991	-				
5 - São Nicolau	0,991	0,991	0,991	0,991	-			
	Xxx	xxx	xxx	xxx	-			
6 - Porto Alegre	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	-		
	0,991	xxx	0,991	0,991	xxx	-		
7 – Canguçu	0,000*	0,270	0,991	0,991	0,991	0,991	-	
	0,000*	xxx	0,991	0,441	xxx	0,991	-	
8 - Ilha dos Marinheiros-RS	0,009*	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	-
	0,000*	xxx	0,991	0,676	xxx	0,991	0,279	-
9-Taim	0,000*	0,216	0,991	0,991	0,991	0,991	0,523	0,991
	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx

*p < 0,05

Tabela 7. Resultados da Análise de Clados Não Enraizados (NCPA) para haplótipos do gene COII de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil.

Amostra	Passos da chave de inferência de Templeton (2004)	Evento evolutivo inferido
H04	1-2-3-4-Não	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância

Tabela 8. Resultados dos testes de neutralidade e *Mismatch Distribution* realizados para haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil, categorizadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. n = número de indivíduos amostrados.

Localidades	n	D de Tajima	Fs de Fu	D*	F*	R2	<i>Mismatch Distribution</i>
							Tau: 2,4277
COI							
Sul 1							
Sul 1a	24	0,000	0,00000	-	-	-	$\theta_0 = 0,0000$
Sul 1b	7	-1,006	-0,09474	-1,04	-1,10	-	$\theta_1 = 99999$
Sul 2	20	-1,140	-2,1352 ¹	-0,59	-0,85	-	SSD = 0,08
Total	51	-0,483	-0,74334	-0,10	-0,14	0,17 ²	p = 0,23
							Tau: 1,22
COII							
Sul 1							
Sul 1a	23	0,000	1,0884	-	-	-	$\theta_0 = 0,0000$
Sul 1b	4	1,630	0,5400	1,63	1,27	-	$\theta_1 = 99999$
Sul 2	37	-1,653 ²	-4,2969 ¹	-3,01 ²	3,03 ²	-	SSD = 0,06
Total	64	-1,721 ²	-4,972 ¹	-3,67 ²	-3,56 ²	0,15 ²	p = 0,15

¹ $p \leq 0,02$ – valor significativo para Fs de Fu; ² $p \leq 0,05$ – valor significativo para os demais testes de neutralidade (Fu, 1997; Excoffier et al., 2005).

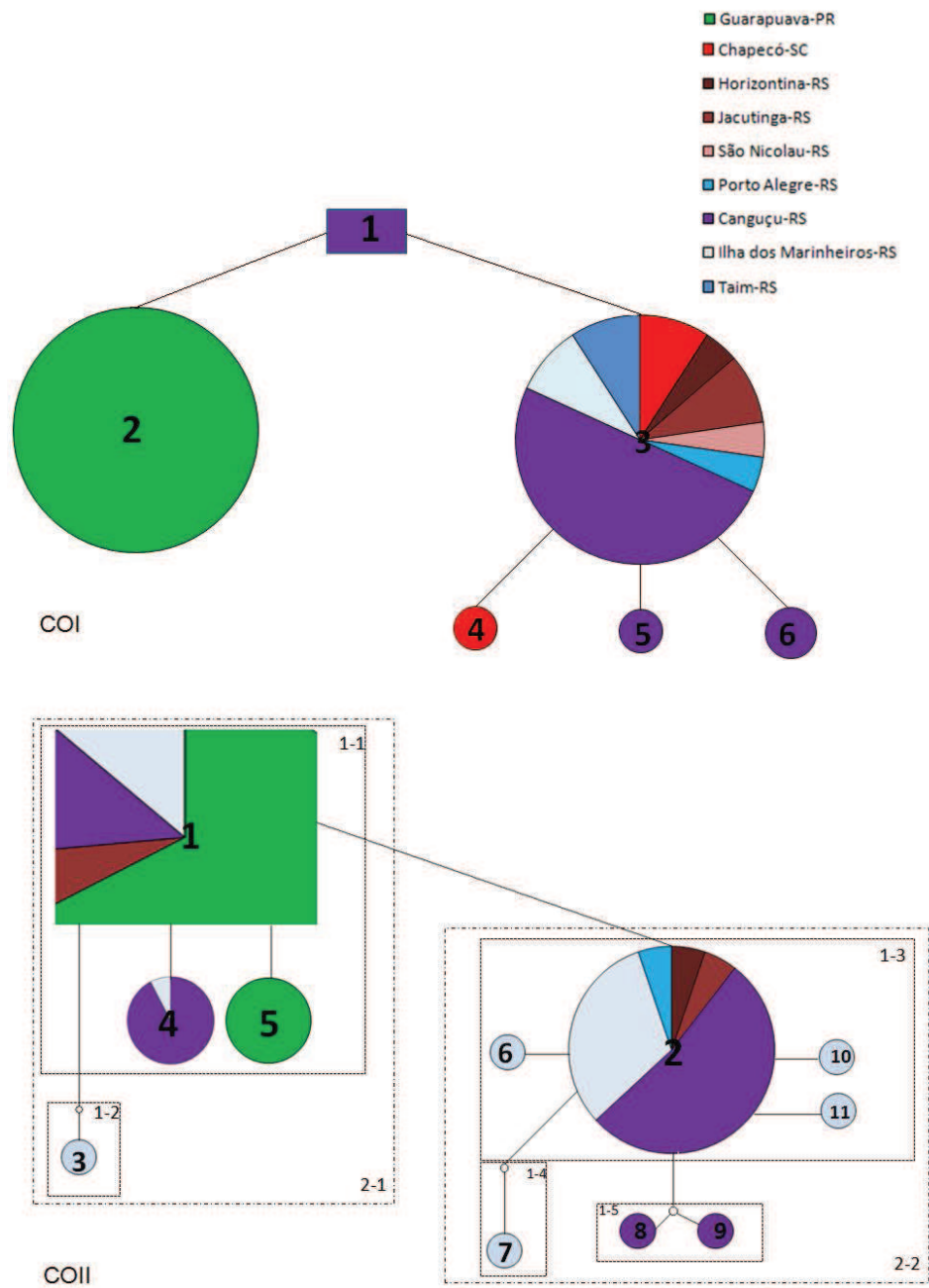


Figura 2. Redes de haplótipos dos genes Citocromo Oxidase I (A) e II (B) de localidades de *Drosophila ornatifrons* da região sul do Brasil. Os números (1 a 6 para COI, e 1 a 11 para COII) representam os haplótipos observados em cada localidade. Linhas inteiras e tracejadas em COII correspondem aos aninhamentos realizados para análise NCPA (Templeton, 1998).

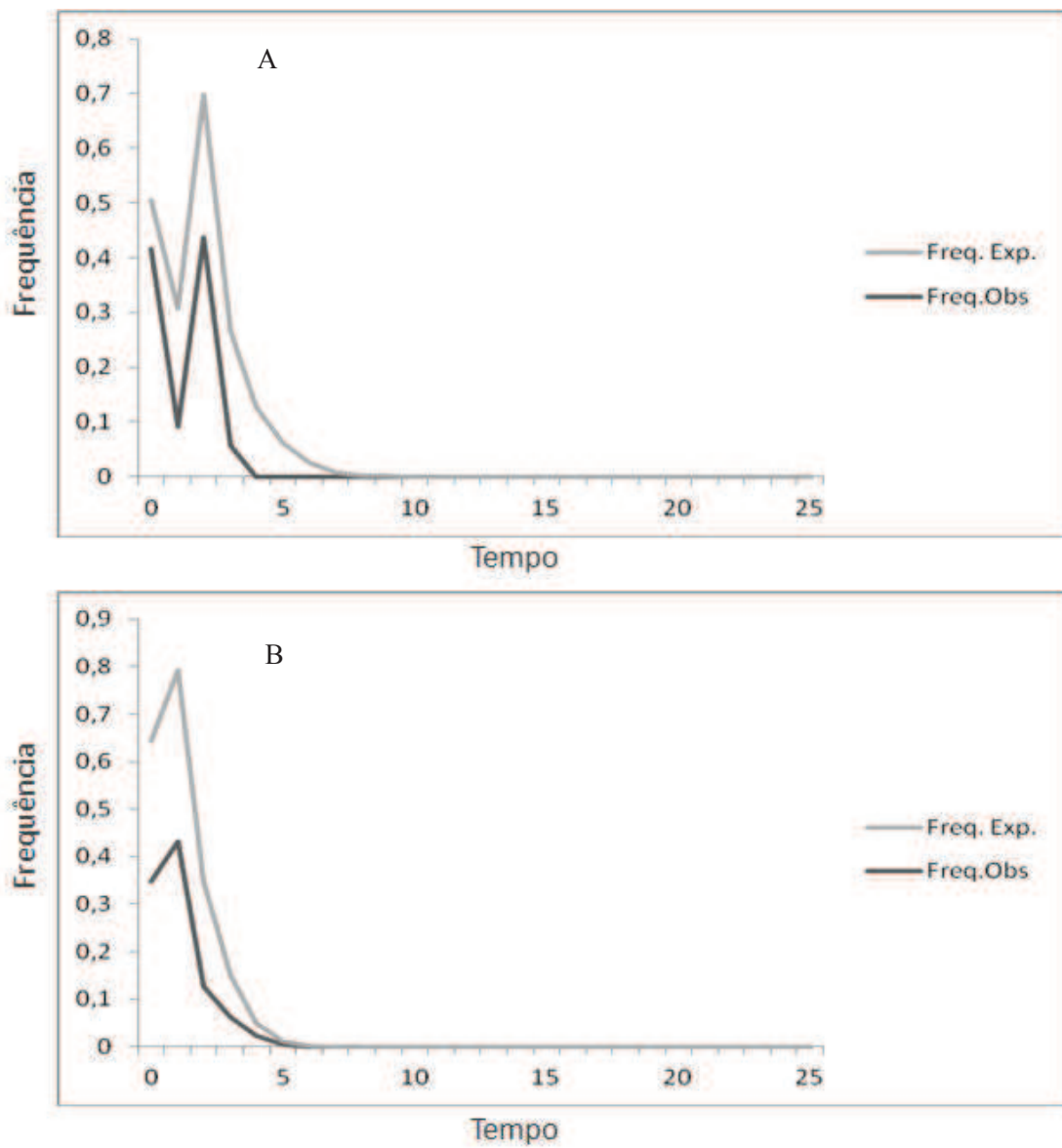


Figura 3. *Mismatch Distribution* para o gene Citocromo Oxidase I (A), $p = 0,23$ e II (B), $p = 0,15$ para *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil. Linha cinza representa a frequência esperada; linha preta representa a frequência observada.

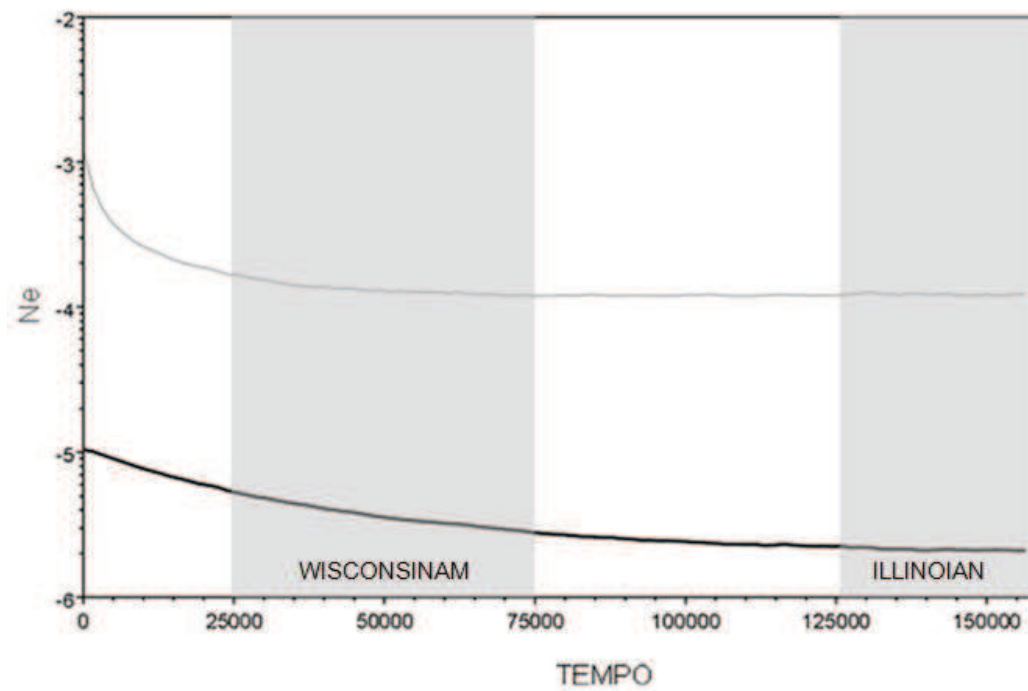


Figura 4. Resultados da *Bayesian Skyline Analyses* (BSP) para o gene Citocromo Oxidase II de *Drosophila ornatifrons* de localidades da região sul do Brasil. A média de variação do tamanho efetivo populacional (N_e) está compreendida dentro da área de probabilidade entre a linha cinza e a linha preta, com valor de $\tau = 1,03$. O eixo das ordenadas corresponde a média do tamanho populacional, medido pelo produto do tamanho efetivo populacional (N_e) e o tempo de geração em anos. Os retângulos em cinza representam os períodos glaciais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises filogenéticas recentes elevaram a categoria de grupos os subgrupos *guaramunu* e *guarani* (que pertenciam ao grupo *guarani*), os quais *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* pertencem. Apesar da existência de trabalhos filogenéticos que envolveram análises de algumas populações destas espécies, até o momento poucos trabalhos foram publicados com o objetivo principal de analisar a variabilidade intra e interpopulacional. Este trabalho pretendeu iniciar tal abordagem populacional para as espécies *D. maculifrons* e *D. ornatifrons*, por meio da análise da variação de haplótipos de genes mitocondriais de indivíduos coletados em áreas de Mata Atlântica do sul do Brasil.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as três populações de *D. maculifrons* analisadas revelou diferença significativa na variação haplotípica entre indivíduos coletados em áreas de Mata Atlântica de Floresta Ombrófila Mista (FOM) e de Floresta Estacional Semidecidual (FES) no estado do Paraná, sugerindo uma relação da distribuição da variação com o habitat. Contudo, esta relação pode ser devido a maior proximidade das populações coletadas em áreas de FOM (aproximadamente 6 Km), em relação a área de FES (aproximadamente 350 Km), sendo resultado de fluxo gênico restrito pela distância.

Uma análise de um número maior de populações coletadas em áreas de FOM e FES pode esclarecer melhor o padrão de distribuição das populações desta espécie. Desse modo, os dados gerados neste trabalho para *Drosophila maculifrons* foram agrupados com os resultados obtidos para outras populações amostradas em áreas de Mata Atlântica de diferentes fitofisionomias dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e submetido para publicação na revista *Molecular Ecology*. As populações de *D. maculifrons* dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram analisadas por De Ré (2012), da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria/RS, e mais três populações de São Paulo serão inseridas nestas análises e no artigo em submissão.

Para a espécie *Drosophila ornatifrons* foram analisadas nove localidades da região sul do Brasil, abrangendo uma ampla área de distribuição visto que a ocorrência desta espécie parece estar altamente restrita a ambientes úmidos específicos e de temperaturas mais amenas, encontrados especialmente na região sul do Brasil. Foram realizadas coletas em outras três regiões do estado de São

Paulo, contudo nenhum indivíduo de *D. ornatifrons* foi encontrado, provavelmente devido as condições de temperatura e umidade dessas áreas não serem favoráveis a ocorrência desses indivíduos. Além disso, também foi observado que mesmo nas áreas de coleta mais úmidas, a frequência de *D. ornatifrons* é baixa, especialmente quando comparada com *D. maculifrons*.

As análises dos indivíduos de *Drosophila ornatifrons* revelaram que possivelmente um evento de expansão demográfica ocorreu entre 20.000 e 25.000 anos atrás a partir do litoral do Rio Grande Sul. Os indivíduos que migraram podem ter originado as populações amostradas no interior do Rio Grande do Sul, bem como de Santa Catarina e Paraná. Este evento teve seu início principalmente no final do Winsconsiniano, quando houve o estabelecimento de temperaturas mais quentes e constantes no fim deste período, favorecendo a expansão desta espécie. Portanto, com o aparecimento destas condições adequadas a Mata Atlântica expandiu sua distribuição, que foi seguida por populações de *D. ornatifrons*, as quais podem ter encontrado barreiras clinais (provavelmente de umidade) a dispersão, que restringiu o fluxo gênico e resultou em menor diversidade das áreas colonizadas em relação a área ancestral.

Este trabalho contribuiu para a elucidação da história evolutiva de populações de *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons* do bioma Mata Atlântica do sul do Brasil, além de trazer achados importantes sobre a área de distribuição destas espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVISE, J.C. **Phylogeography**: history and formation of species. 1 ed. Harvard: Harvard University Press, 2000.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.

AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **J. Biogeogr.**, v.36, p. 3–15, 2009.

AVISE, J. C.; BALL, R. M. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. In: Futuyama, D.; Antonovics, J.(Org.). **Evolutionary Biology**. Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 45–67.

AVISE, J. C.; NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **J. Mol. Evol.**, v.20, p. 99-105, 1984.

BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Mol. Ecol.**, v.17, p. 3754-3574, 2008.

BIRKY, C. W.; MARUYAMA, T.; FUERST, P. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts and some results. **Genetics**, v.103, p. 513–527, 1983.

CABRERA, A.; WILLINK, A. **Biogeografía de América Latina**. Washington, DC: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1973.

CARNAVAL, AC; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v.323, p.785-789, 2009.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659, 2000.

COLBECK, G.J.; GIBBS, H.L.; MARRA, P.P.; HOBSON, K. E.; WEBSTER, M.S. Phylogeography of a widespread north American migratory songbird (*Setophaga ruticilla*). **J. Heredity**, v. 99, p. 453–463, 2008.

CRACRAFT, J.; PRUM, R. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. **Evolution**, v.42, p.603-620, 1988.

DE BRITO, R. O. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F.M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, p. 161-171, 2002.

DINERSTEIN E.; OLSON, D. M.; GRAHAM, D. J; WEBSTER, A. L.; PRIMM, S. A.; BOOKBINDER, M. P.; LEDEC, G. (1995). **A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean**. The World Bank in association with The World Wildlife Fund, Washington D.C.

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

DRUMMOND, A.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, p. 1185, 2005.

ENDLER, J.A. **Geographic variation, speciation, and clines**. Princeton: Princeton University Press, 1977.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 142-154, 2012.

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

FU, Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

FU, Y.; LI, W. Coalescing into the 21st Century: An Overview and Prospects of Coalescent Theory. **Theory in Population Biology**, v. 56, p. 1-10, 1999.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. Atlantic forest hotspots status: an overview. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**, v.1, p.13-11, 2003.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science** v.165, p.131–137, 1969.

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

HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, v. 405, p. 907-913, 2000.

HOFFMAN, J. L. I.; DASMAHAPATRA, K.K.; AMOS, W.; PHILIPS, C.D.; GELAT, T.S.; BICKMHAM, J.W. Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 2961-2978, 2009.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul**. Editora Polígono & Editora Universidade de Brasília, 1972.

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

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

KASTRITSIS, C.D., PASTEUR, G., QUICK, J.. Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediostriata* and *Drosophila griseolineata*. **Canad. J. Genet. Cytol.** v.12, p.952-959, 1970.

KINGMAN, J.F.C. The coalescent. **Stoch. Process. Their Appl.**, v.13, p.235-248, 1982.

KLEIN, R. M. Southern Brazilian phytogeographic features and probable influence of Upper Quaternary climatic changes in the floristic distribution. **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 33, p. 67-88, 1975.

KNOWLES, L.; MADDISON, W. P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 11, p.2623-2635, 2002.

LARA, M.C.; PATTON, J.L. Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. **Zoological Journal Linnean Society**, v.130, p.661-686, 2000.

LEITE, Y. **Evolution and systematics of the Atlantic Tree Rats, Genus Phyllomys (Rodentia, Echimyidae), with description of two new species**. 2003. 132 f. Thesis University of California.Berkeley. 2003.

LEONHARDT, A.; LORSCHBITTER, M. L. Palinomorfos do perfil sedimentar de uma turfeira em São Francisco de Paula, Planalto Leste do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v.30, p. 47-59, 2007.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Banco de desenvolvimento do Paraná, Curitiba, 350p., 1968.

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

MARROIG, G.; CERQUEIRA, R. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. **Journal of Comparative Biology**, v.2, p.103-118, 1997.

MORRONE, J. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on analyses of the entomofauna. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.467-94, 2006.

NAGARAJA, G. M.; NAGARAJU, J.; RANGANATH, H. A. Molecular phylogeny of the nasuta subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and Col mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms. **Genes and Genetic Systems**, v. 79, p. 293-299, 2004.

NIELSEN, R.; BEAUMONT, M. Statistical inferences in phylogeography. **Molecular Ecology**, v.18, p.1034-1047, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; JARENKOW, J. A.; RODAL, M. J. N. Floristic relationships of seasonally dry forests of eastern South America based on tree species distribution patterns. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (Org.). **Neotropical savannas and dry forests: Plant diversity, biogeography and conservation**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

PANCHAL, M.; BEAUMONT, M. The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. **Evolution**, v. 61, p. 1466-1480, 2007.

PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; WAITE, A.N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES, J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.85, p.13–26, 2005.

PENNINGTON, R.T.; PRADO, D.E.E.; PENDRY, C.A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, p. 261-273, 2000.

PLATNICK, N.; NELSON, G. A method of analysis for historical biogeography. **Systematic Zoology**, v.27, p.1-16, 1978.

POSADA, D.; CRANDALL, K.; TEMPLETON A. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 487-488, 2000.

PRADO, D.E. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. **Edinb. J. Bot.**, v.57, p. 437–461, 2000.

PRADO, D.E.; GIBBS, P.E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v.80, p.902-927, 1993.

RAMBO, B. História da flora do planalto riograndense. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 5, p. 185-232, 1953.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 2092–2100, 2002.

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

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

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

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics.. **J. Zool. Syst. Evol. Res.** v.48, p. 310–321, 2010b.

ROTH, L.; LORSCHREITER, M. L. Palynology of a bog in Parque Nacional de Aparados da Serra, East Plateau of Rio Grande do Sul, Brazil. **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula**, v.8, p. 39-69, 1993.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DNAsp, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, p. 2496-2497, 2003.

RUSSO, C.; TAKEZAKI, N., NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 391-404, 1995.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. **História Ecológica da Terra**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1994.

SANTANA-NETO, J., NERY, J., SOUZA, C., SUGUIO, K., OLIVEIRA, A., E OLIVEIRA, P. Variabilidade e mudanças climáticas no Brasil e seus impactos regionais. In: SOUZA, C.R.G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, AMSP; OLIVEIRA, P.E. (Org.). **Quaternário do Brasil ds.** Ribeirão Preto: Holos Editora, 2005.

SANTOS, M. H. **As rotas de dispersão de *Drosophila buzzatii* na América do Sul**. 2011. 128f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2011.

SCHERER, C.; LORSCHREITER, M. L. Palinomorfos de fungos e criptógamas em sedimentos quaternários de duas matas com Araucária, Planalto leste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 22, p. 131-144, 2008.

SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* in South America. In **Ecological Genetics and Evolution: The Cactus–Yeast–Drosophila Model System**. Sydney: Academic Press, 1982.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-702, 1994.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (1993) **Atlas da evolução dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1990-1995**, São Paulo.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2000) **Atlas dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica**, São Paulo.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Mol. Biotechnol.**, v. 5, p. 233–241, 1996.

SUGUIO, K.; SALLUN, A.E.M.; SOARES, E.A.A. Período Quaternário: “Quo Vadis”? **Revista Brasileira Geociências**, v.35, p. 427-432, 2005.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TCHAICKA, L.; EIZIRIK, E.; OLIVEIRA, T.G.; CÂNDIDO J.R.; FREITAS, J.F. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). **Molecular Ecology**, v.16, p.819-839, 2006.

TEMPLETON, A. R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Mol. Ecol.**, v. 7, p. 381-397, 1998.

TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 789-809, 2004.

TEMPLETON, A.R. **Genética de Populações e Teoria Microevolutivos**. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, v. 117, p. 343-351, 1987.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, v. 140, p. 767-782, 1995.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VANZOLINI, P.E.; WILLIAMS, E.E. South American anoles: The geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zool.** v.19, p. 1-298, 1970.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomics studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 63, p. 1-332, 1990.

YOTOKO, K.S.C.; MEDEIROS, H.F.; SOLFERINI, V.N.; KLACZKO, L.B. A molecular study of the Systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 28, p. 614-619, 2003.