

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

ASPECTOS ECOLÓGICOS E GENÉTICOS NO GÊNERO *DROSOPHILA*  
RELACIONADOS À FRAGMENTAÇÃO DA FLORESTA DE ARAUCÁRIA

RENATO CAVASINI

Guarapuava

2009

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

ASPECTOS ECOLÓGICOS E GENÉTICOS NO GÊNERO *DROSOPHILA*  
RELACIONADOS À FRAGMENTAÇÃO DA FLORESTA DE ARAUCÁRIA

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

2009

Orientador

Prof. Dr. ROGÉRIO PINCELA MATEUS

Co-orientador

Profa. Dra. LUCIANA PAES DE BARROS MACHADO

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Ademir e Delma, e a memória de  
minha mãe, por tanto amor,  
dedicação e exemplos  
de honestidade.

## Agradecimentos

Aos professores Drs. Rogério Pincela Mateus e Luciana Paes de Barros Machado, pela orientação precisa, confiança, apoio e amizade de sempre. Eu me orgulho muito de ser seus orientado, e agradeço a oportunidade e o voto de confiança. Muito obrigado!

A todos do Laboratório de Genética e Evolução (UNICENTRO), pelo fundamental auxílio no trabalho de coleta e identificação dos espécimes de *Drosophila* – Adriana Scherloski, Janderson P. Pericolo, Natália S. Alves e Vanessa F. Lopes (coletas de 2006); Daiane P. Simão, Emanuele C. Gustani, Katiane dos Santos, Kely C. Brito, Norbert P. Heinz e Priscila T. Rodrigues (coletas de 2008). E a Daiane P. Simão, Emanuele C. Gustani e Priscila T. Rodrigues pela importante ajuda durante os procedimentos eletroforéticos. Muito obrigado pela colaboração e amizade de todos!

Aos professores Drs. Maurício Osvaldo Moura e Maria Luisa Tunes Buschini, pela colaboração nas análises ecológicas. Muito obrigado pela atenção e amizade!

Ao professor Dr. Louis Bernard Klaczko (UNICAMP), pela informação sobre uma metodologia mais efetiva na captura de *D. mediopunctata*. Muito obrigado!

Aos funcionários do Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR, e aos proprietários da Fazenda Brandalise, pela permissão ao acesso dos locais de coleta. Muito obrigado a todos!

A todos da Estação Meteorológica do Campus CEDETEG (UNICENTRO), pelo fornecimento dos dados abióticos referentes ao período das coletas. Muito obrigado!

A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva (UNICENTRO / UEPG), por toda a atenção, amizade, auxílio e conhecimento. Muito obrigado!

A CAPES, ao CNPq, e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro a este trabalho.

A minha família e amigos, por tanto amor, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim. Muito obrigado!

Aqueles que neste momento fogem à minha memória, mas, que de alguma forma, deram a sua contribuição e fazem parte desta história. Obrigado!

## Lista de Figuras

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1.....	29
FIGURA 2.....	40
FIGURA 3.....	40

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1.....	68
FIGURA 2.....	75
FIGURA 3.....	76
FIGURA 4.....	83

### CAPÍTULO 4

FIGURA 1.....	104
FIGURA 2.....	104

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO 1

TABELA 1.....	34
TABELA 2.....	38

### CAPÍTULO 2

TABLE 1.....	57
--------------	----

### CAPÍTULO 3

TABELA 1.....	77
TABELA 2.....	81
TABELA 3.....	81

### CAPÍTULO 4

TABELA 1.....	103
---------------	-----

## Anexos

ANEXO 1.....	109
ANEXO 2.....	111
ANEXO 3.....	113

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>09</b>
<i>DROSOPHILA</i> .....	12
<i>DROSOPHILA MEDIOPUNCTATA</i> .....	14
OBJETIVOS.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>23</b>
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
Áreas de Estudo.....	28
Parque Municipal das Araucárias.....	28
Fazenda Brandalise.....	30
Amostragem de <i>Drosophila</i> .....	30
Taxonomia.....	31
Dados Abióticos.....	31
Análises dos dados.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>51</b>
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	53
INTRODUCTION.....	54
MATERIAL AND METHODS.....	55
RESULTS AND DISCUSSION.....	56
REFERENCES.....	58
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>59</b>
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	62
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
Áreas de Estudo.....	67
Parque Municipal das Araucárias.....	67
Fazenda Brandalise.....	69
Amostragem de <i>Drosophila mediopunctata</i> .....	69
Procedimentos Eletroforéticos.....	70
Dados Abióticos.....	71
Análises dos dados.....	71
RESULTADOS.....	74
DISCUSSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>97</b>
RESUMO.....	98
ABSTRACT.....	99
INTRODUÇÃO.....	100
MATERIAIS E MÉTODOS.....	101
Coletas.....	101
Análises dos dados.....	101
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>107</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O uso natural da terra mudou nas recentes décadas, não apenas resultando em uma substancial diminuição no total da cobertura florestal, mas também em uma distribuição e tamanho cada vez mais oblíquo dos fragmentos remanescentes. Assim, a fragmentação florestal constitui o processo que mais contribui para a atual perda da biodiversidade e extinção das espécies e existe uma urgente necessidade de identificar os seus principais efeitos sobre sistemas bióticos para encontrar soluções de manejo (Didham et al. 1996).

A destruição de habitats (envolvendo diretamente a perda de habitats, degradação na qualidade dos habitats, e fragmentação dos habitats remanescentes) é a causa mais significativa da extinção de populações e espécies (Hanski 1998). A perda de habitats tem por consequência a diminuição na abundância de indivíduos e o aumento nos níveis de isolamento entre as populações (restritas nos fragmentos remanescentes). As diferenças genéticas entre as populações aumentam e a variabilidade dentro das populações diminui, assim, seus valores adaptativos podem diminuir deixando-as mais suscetíveis à extinção (Templeton et al. 1990, 2001).

As comunidades de Florestas Tropicais são caracterizadas por sua alta riqueza de espécies e baixa abundância, tendo exercido um papel fundamental no desenvolvimento da biologia evolutiva (Darwin 1859; Bates 1862; Wallace 1878). Assim, estudos em sistemas de Florestas Tropicais têm feito importantes contribuições para a compreensão dos padrões de diversidade das espécies e estrutura das comunidades (DeVries e Walla 2001). Em vista do atual aumento na destruição dos habitats globais, estudos sobre diversidade de espécies são de vital importância para compreender as comunidades biológicas e sua conservação (Purvis e Hector 2000). Contudo, devido à grande riqueza de espécies nas Florestas

Tropicais, relativamente poucos estudos tem documentado as variações na distribuição da abundância das espécies de organismos Tropicais através do tempo e do espaço (Hubbell e Foster 1986; Wolda 1978, 1992; Morse et al. 1988; Terborgh et al. 1990; Gill 1991; Hanski e Cambefort 1991).

A distribuição de espécies no tempo e no espaço é vital para descrever as comunidades biológicas e desenvolver hipóteses para explicar a evolução e a manutenção da diversidade de espécies (Gleason 1926; Elton 1966; MacArthur 1972; Whittaker 1975; Wiens 1984; Tilman 1994; Brown 1995). A heterogeneidade ambiental e a complexidade dos habitats são importantes determinantes na composição das comunidades, e as respostas das espécies as variações ambientais fornecem informações ecológicas e de processos evolutivos como especiação, adaptação, dispersão, colonização, entre outros (Hubbell 2001). Investigações recentes também enfatizam a influência da heterogeneidade ambiental na composição das comunidades como um fator crítico que afeta a diversidade das espécies (Srivastava 1999; Loreau 2000; Gering e Crist 2002; Wagner e Wildi 2002). Então, estudos sobre variações espaciais nas abundâncias relativas das espécies são importantes para a compreensão da dinâmica das comunidades.

Outra observação biológica sobre as populações naturais é a flutuação no tamanho populacional, a qual implica em alterações na variabilidade genética dentro das populações e em diferenciações entre as populações (Futuyma 1998). Esta flutuação em muitas espécies é sazonal (variações temporais) e influenciada fortemente por adaptações sazonais ligadas a fatores ambientais, e flutuações anuais (Krebs 1985). De acordo com Brncic et al. (1985), a sazonalidade de cada espécie é o resultado de um longo e contínuo processo de adaptação às condições ambientais a qual a espécie geralmente vive. Segundo Frankham (1995), a flutuação no tamanho populacional é a variável mais importante que afeta a razão do tamanho populacional

efetivo com relação ao tamanho total ( $N_e/N$ ). Esta razão representa a taxa de endogamia e de perda da variabilidade genética em populações naturais, sendo um parâmetro crítico para a genética evolutiva e para a manutenção da biodiversidade.

A variabilidade genética de uma população é a base para os processos evolutivos. Assim, estudos sobre a variabilidade genética de populações naturais são extremamente importantes para compreender a história evolutiva de uma espécie (Mateus e Sene 2003). E para ter uma completa compreensão dos padrões e mecanismos evolutivos, é preciso relacionar a genética do organismo com o ambiente no qual ele vive, colocando o conhecimento genético sobre um contexto ecológico (Tidon 2006). Então, efetivas abordagens sobre a conservação da variabilidade genética nas populações naturais e preservação da biodiversidade, necessitam de análises conjuntas entre dados ecológicos e genéticos.

Pesquisas com dados isoenzimáticos, realizadas através de técnicas eletroforéticas, vem sendo utilizadas por geneticistas evolutivos e de populações desde a década de 1960. Isto porque elas oferecem uma maneira de avaliar a variação genética das populações através do produto direto da expressão gênica (Hubby e Lewontin 1966; Lewontin e Hubby 1966). Nos estudos envolvendo polimorfismo de proteínas e isoenzimas, existe a preocupação de relacionar a variação encontrada em populações naturais com vários aspectos ambientais, e também com as estruturas e funções das enzimas. Assim, a abordagem isoenzimática é importante para estudos de variabilidade genética em populações (Mateus et al. 2005).

Assim, o isolamento e a fragmentação induzem mudanças na estrutura florestal, podendo causar o rompimento dos processos biológicos que mantêm a biodiversidade e o funcionamento do ecossistema. Esses processos são largamente mediados por insetos, e a fragmentação florestal não apenas influencia na

abundância e diversidade deste grupo de organismos, mas também modifica as interações entre insetos, incluindo *Drosophila*, e outros organismos, direta e indiretamente. Enquanto as funções ecológicas dos insetos são geralmente bem documentadas, os efeitos da fragmentação florestal nas suas populações são pouco compreendidos (Didham et al. 1996).

### ***Drosophila***

O gênero *Drosophila* é o mais abundante da família Drosophilidae, compreendendo aproximadamente 53% das mais de 3500 espécies de pequenas moscas descritas para esta família (Bächli 1998). Algumas delas são endêmicas de certas regiões, e outras são cosmopolitas que muitas vezes se dispersam em associação às atividades humanas (Tidon-Sklorz e Sene 1999). A fauna de *Drosophila* nas regiões Neotropicais é altamente diversificada (Val et al. 1981), com numerosas espécies ainda por serem descritas.

Sobre a abordagem genética, vários estudos têm investigado o polimorfismo de proteínas e isoenzimas em populações naturais de *Drosophila* (Kojima et al. 1972; Sene e Carson 1977; Cavener e Clegg 1981; Prout e Barker 1993; Saavedra et al. 1995b; Moraes e Sene 2002; Mateus e Sene 2003, 2007; Mateus et al. 2005, 2008; Cavasini et al. 2008). Porém, poucos apresentaram o objetivo de relacionar a variabilidade genética com a qualidade dos ambientes naturais e o seu estado de conservação.

Os primeiros dados sobre comunidades brasileiras de *Drosophila* foram publicados por Duda (1925). Na região sudeste do Brasil, Dobzhansky e Pavan (1943) foram pioneiros e descreveram várias espécies novas. Após 1940, muitos trabalhos sobre a fauna brasileira de *Drosophila* foram publicados (Pavan e Cunha 1947; Dobzhansky e Pavan 1950; Pavan 1950, 1959; Mourão et al. 1965). Posteriormente,

outros pesquisadores analisaram a fauna de *Drosophila* nos domínios morfoclimáticos do Brasil, com o objetivo de melhor compreender a distribuição geográfica das espécies mais comuns (Sene et al. 1980; Val et al. 1981; Vilela et al. 1983).

Vários aspectos fazem da *Drosophila* um excelente modelo biológico: tamanho pequeno; grande abundância; ampla distribuição; ciclo de vida curto; fácil coleta, identificação e manipulação; extrema sensibilidade para mudanças nas condições de seu habitat; entre outros (Tidon 2006). Este gênero desempenhou um importante papel no desenvolvimento das teorias genéticas e evolutivas, e mais recentemente em estudos de biologia molecular e do desenvolvimento (Brookes 2001). Atualmente, também tem sido utilizado como um possível grupo foco para estudos de biodiversidade (Van der Linde e Sevenster 2002), e algumas espécies como bioindicadores para perturbações humanas na qualidade do ambiente (da Mata et al. 2008).

Flutuações acentuadas no tamanho das populações ocorrem em muitas espécies de *Drosophila* em ciclos anuais, geralmente por causa de especificidades ecológicas por locais de reprodução, e em resposta a disponibilidade de recursos (Dobzhansky e Pavan 1950). Estes insetos são altamente sensíveis a pequenas modificações ambientais, que são refletidas no tamanho das populações naturais (Tidon-Sklorz e Sene 1992). Assim, estudos sobre a estrutura populacional e ecologia de espécies de *Drosophila* tem fornecido importantes informações, proporcionando melhor entendimento sobre seus processos evolutivos (Bizzo e Sene 1982). Desta forma, estas características corroboram com a utilização de comunidades de *Drosophila* como indicadores da qualidade ambiental.

Embora as populações naturais Neotropicais de *Drosophila* sejam objeto de vários estudos ecológicos (Dobzhansky e Pavan 1950; Pavan 1959; Val et al. 1981; Tidon-Sklorz e Sene 1992, 1995; Saavedra et al. 1995a; Moraes e Sene 2003; Mateus

et al. 2006; Tidon 2006; de Toni et al. 2007; da Mata et al. 2008), o conhecimento sobre a ecologia das populações da maioria das espécies Neotropicais ainda é limitado (Brncic et al. 1985; Saavedra et al. 1995a) comparado ao das espécies Paleárticas deste grupo.

### ***Drosophila mediopunctata***

*Drosophila mediopunctata* Dobzhansky e Pavan (1943) pertence ao grupo *tripunctata* (Frota-Pessoa 1954), o qual é endêmico das regiões Neotropicais e inclui 64 espécies descritas que residem nos habitats de florestas (Vilela e Bächli 2000). Este é o segundo maior grupo de *Drosophila* nesta região e o maior do gênero que ocorre nas Florestas Neotropicais (Klaczko 2006). *Drosophila mediopunctata* é uma espécie que reside estritamente em florestas e não é associada com habitats humanos, tem ampla distribuição geográfica sendo encontrada em muitas partes do Brasil e El Salvador (Val et al. 1981). É muito abundante em algumas áreas, particularmente no sul da sua distribuição ou em elevadas altitudes durante os meses mais frios do ano (Saavedra et al. 1995a). Vários aspectos de sua biologia fazem de *D. mediopunctata* um interessante modelo para estudos em genética de populações naturais e evolução (Klaczko 1995, 2006), bem como para estudos sobre a qualidade ambiental em Florestas Neotropicais, visto que esta espécie é restrita a estes habitats e não está associada à ambientes alterados.

*Drosophila mediopunctata* tem seis pares de cromossomos ( $2n = 12$ ), cinco acrocêntricos 'rods' e um par de 'dot' (o qual não se politeniza) (Kastritsis 1966). Ananina et al. (2002) publicaram um mapa destes cromossomos politênicos com um total de 2111 bandas, onde foram marcados os pontos de quebras das inversões que ocorrem naturalmente nesta espécie. Os cromossomos X, II e IV apresentaram polimorfismo de inversões, sendo o cromossomo II o mais polimórfico com 17

inversões, oito na região distal e nove na proximal, com um forte desequilíbrio de ligação entre as inversões destas duas regiões (Peixoto e Klaczko 1991; Ananina et al. 2002). A frequência de algumas destas inversões são correlacionadas com variações sazonais, altitudinais e latitudinais (Ananina et al. 2004), variações no tamanho e na forma das asas (Bitner-Mathé et al. 1995), e variações na temperatura e no policromatismo (Hatadani et al. 2004). O cromossomo X tem quatro arranjos gênicos diferentes, um deles é associado com o fenômeno da razão sexual (Carvalho et al. 1989). O cromossomo IV tem apenas duas inversões.

Estudos de hereditariedade em algumas características de *D. mediopunctata* também foram realizados, como por exemplo, a herdabilidade do número de ramos nas aristas (Bitner-Mathé e Klaczko 1998), do tamanho e forma das asas (Bitner-Mathé e Klaczko 1999a, 1999b), e da proporção sexual (Varandas et al. 1997). Entretanto, até o momento não existe nenhum estudo sobre a variação isoenzimática em populações naturais de *D. mediopunctata*, apenas uma análise prévia em espécies do grupo *tripunctata* (Mateus et al. 2008), e uma análise da expressão isoenzimática diferencial do corpo de indivíduos desta espécie (Cavasini et al. 2008) (Capítulo 2).

## **Objetivos**

Tendo em vista o atual impacto da ação antrópica sobre os habitats naturais, resultando na fragmentação florestal e na conseqüente perda de biodiversidade, estudos sobre comunidades biológicas e suas populações são de vital importância para melhor entender como eventos ecológicos e processos evolutivos auxiliam na manutenção da biodiversidade. Assim, os objetivos deste estudo foram os de avaliar a estrutura de duas comunidades de *Drosophila* através do tempo e do espaço, bem como a variabilidade isoenzimática intrapopulacional de suas populações naturais de

*D. mediopunctata*. Desta forma, poder-se-á relacionar a diversidade biológica e a variabilidade genética avaliadas com as características e estado de preservação de cada uma das áreas estudadas, a fim de contribuir para futuros programas de conservação biológica e de biodiversidade de florestas tropicais da América do Sul.

### Referências Bibliográficas

ANANINA, G.; PEIXOTO, A. A.; SOUZA, W. N.; KLACZKO, L. B. Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 691-694, 2002.

ANANINA, G.; PEIXOTO, A. A.; BITNER-MATHÉ, B. C.; SOUZA, W. N.; SILVA, L. B.; VALENTE, V. L. S.; KLACZKO, L. B. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 61-69, 2004.

BÄCHLI, G. Family Drosophilidae. In: Papp, L.; B. Darvas (Eds) **Contributions to a Manual of Palearctic Diptera**. 3. ed. Higher Brachycera. Science Herald, Budapest, 1998.

BATES, H. W. **The Naturalist on the River Amazons**. Transactions of the Linnaean Society XXIII. 1862.

BITNER-MATHÉ, B. C.; KLACZKO, L. B. Variation and heritability of arisal morphology in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. **Hereditas**, v. 128, p. 67-71, 1998.

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

BITNER-MATHÉ, B. C.; KLACZKO, L. B. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. **Genetica**, v. 105, p. 35-41, 1999b.

BITNER-MATHÉ, B. C.; PEIXOTO, A. A.; KLACZKO, L. B. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. **Heredity**, v. 75, p. 54-61, 1995.

BIZZO, N. M. V.; SENE, F. M. Studies on the natural populations of *Drosophila* from Peruibe (SP) Brazil (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, p. 539-544, 1982.

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

- BROOKES, M. **Fly: an experimental life**. Weiden-feld & Nicolson, London. 2001.
- BROWN, J. H. **Macroecology**. Chicago University Press. 1995.
- CARVALHO, A. B.; PEIXOTO, A. A.; KLACZKO, L. B. Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 62, p. 425-428, 1989.
- CAVASINI, R.; GUSTANI, E. C.; RODRIGUES, P. T.; SIMÃO, D. P.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Differential body expression of isoenzymatic loci in adults of the *Drosophila mediopunctata* (Diptera: Drosophilidae). **Drosophila Information Service**, v. 91, p. 90-91, 2008.
- CAVENER, D. R.; CLEGG, M. T. Temporal stability of allozyme frequencies in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 98, p. 613-623, 1981.
- DA MATA, R. A.; MCGEOCH, M.; TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biodiversity and conservation**, v. 17, p. 2899-2916, 2008.
- DARWIN, C. R. **The Origin of Species by Means of the Natural Selection or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life**. Murray, London. 1859.
- DE TONI, D. C.; GOTTSCHALK, M. S.; CORDEIRO, J.; HOFMANN, P. P. R.; VALENTE, V. L. S. Study of the Drosophilidae (Diptera) Communities on Atlantic Forest Islands of Santa Catarina State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 356-375, 2007.
- DEVRIES, P. J.; WALLA, T. R. Species diversity and community structure in neotropical fruit-feeding butterflies. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 74, p. 1-15, 2001.
- DIDHAM, R. K.; GHAZOUL, J.; STORK, N. E.; DAVIS, A. J. Insects in fragmented forests: a functional approach. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 255-260, 1996.
- DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo**, v. 36, p. 7-72, 1943.
- DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Local and seasonal variation in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **Journal of Animal Ecology**, v. 19, p. 1-14, 1950.
- DUDA, O. Die Costaricanischen Drosophiliden des ungarischen National-Museums zu Budapest. **Annls hist.-nat. Mus. natn. Hung**, v. 22, p. 149-229, 1925.
- ELTON, C. S. **Animal ecology**. October House, New York. 1966.
- FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetics Research**, v. 66, p. 95-107, 1995.

- FROTA-PESSOA, O. Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). **Arquivos do Museu Paranaense**, v. 10, p. 253-329, 1954.
- FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**. 3. ed. Sunderland, MA. Sinauer Associates. 1998.
- GERING, J. C.; CRIST, T. O. The alpha-beta-regional relationship: providing new insights into local-regional patterns of species richness and scale dependence of diversity components. **Ecology Letters**, v. 5, p. 433-444, 2002.
- GILL, B. D. Dung beetles in tropical American forests. In: Hanski, I.; Y. Cambefort (Eds) **Dung beetle ecology**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1991. p. 211-229.
- GLEASON, H. A. The individualistic concept of the plant association. **Bull. Torrey Bot. Club**, v. 53, p. 7-26, 1926.
- HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, v. 396, p. 41-49, 1998.
- HANSKI, I.; CAMBERFORT, Y. **Dung beetle ecology**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1991.
- HATADANI, L. M.; BAPTISTA, J. C. R.; SOUZA, W. N.; KLACZKO, L. B. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. **Heredity**, v. 93, p. 525-534, 2004.
- HUBBELL, S. P. **The unified neutral theory of biodiversity and biogeography**. Princeton University Press, 2001.
- HUBBELL, S. P.; FOSTER, R. B. Commonness and rarity in a neotropical forest: implications for tropical tree conservation. In: Soulé, M. E. (Eds) **Conservation biology. The science of scarcity and diversity**. Sunderland, Mass. Sinauer, 1986. p. 205-231.
- HUBBY, J. L.; LEWONTIN, R. C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I: The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 577-594, 1966.
- KASTRITSIS, C. D. Cytological studies of some species of the *tripunctata* group of *Drosophila*. **University Texas Publs Stud Genet**, v. 6615, p. 413-474, 1966.
- KLACZKO, L. B. Population genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: Levine, L. (Eds) **Genetics of Natural Populations. The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky**. Columbia University Press, New York, 1995. p. 140-153.
- KLACZKO, L. B. Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. **Genetica**, v. 126, p. 43-55, 2006.

KOJIMA, K.; SMOUSE, P.; YANG, S.; NAIR, P. S.; BRNCIC, D. Isozyme frequency patterns in *Drosophila Pavani* associated with geographical seasonal variables. **Genetics**, v. 72, p. 721-731, 1972.

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

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II: Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 595-609, 1966.

LOREAU, M. Are communities saturated? On the relationship between a, b and g diversity. **Ecology Letters**, v. 3, p. 73-76, 2000.

MACARTHUR, R. H. **Geographical ecology**. Harper and Row, 1972.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biochemical Genetics**, v. 41, p. 219-233, 2003.

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

MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. Differential body expression of isoenzymatic loci in adults of the cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Drosophila Information Service**, v. 88, p. 46-48, 2005.

MATEUS, R. P.; BUSCHINI, M. L. T.; SENE, F. M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 719-729, 2006.

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

MORAES, E. M.; SENE, F. M. Breeding structure of an isolated cactophilic *Drosophila* population on a sandstone table hill. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 40, p. 1-7, 2002.

MORAES, E. M.; SENE, F. M. Relationships between necrotic cactus availability and population size in a cactophilic *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) located on a sandstone table hill in Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 51, p. 205-212, 2003.

MORSE, D. R.; STORK, N. E.; LAWTON, J. H. Species number, species abundance and body length relationships of arboreal beetles in Bornean lowland rain forest trees. **Ecological Entomology**, v. 13, p. 25-37, 1988.

- MOURÃO, C. A.; GALLO, A. J.; BICUDO, H. E. M. C. Sobre a Sistemática de *Drosophila* no Brasil, com a descrição de *D. mendeli sp.n.* e “Relação de Espécies Brasileiras do Gênero *Drosophila*”. **Ciência e Cultura**, v. 17, p. 577-585, 1965.
- PAVAN, C. Espécies Brasileiras de *Drosophila*. II. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo**, v. 111, p. 1-37, 1950.
- PAVAN, C. Relações entre populações naturais de *Drosophila* e o meio ambiente. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo**, v. 221, p. 1-81, 1959.
- PAVAN, C.; da CUNHA, A. B. Espécies Brasileiras de *Drosophila*. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo**, v. 86, p. 3-47, 1947.
- PEIXOTO, A. A.; KLACZKO, L. B. Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. **Genetics**, v. 129, p. 773-777, 1991.
- PROUT, T.; BARKER, J. S. F. *F* statistics in *Drosophila buzzatii*: Selection, population size and inbreeding. **Genetics**, v. 134, p. 369-375, 1993.
- PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. **Nature**, v. 405, p. 212-219, 2000.
- SAAVEDRA, C. C.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; NAPP, M.; VALENTE, V. L. S. A descriptive and analytical study of 4 Neotropical drosophilid communities. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 33, p. 62-74, 1995a.
- SAAVEDRA, C. C. R.; VALENTE, V. L. S.; NAPP, M. An ecological/genetic approach to the study of enzymatic polymorphisms in *Drosophila maculifrons*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 147-164, 1995b.
- SENE, F. M.; CARSON, H. L. Genetic variation in Hawaiian *Drosophila*. IV: Allozymic similarity between *D. silvestris* and *D. heteroneura* from island of Hawaii. **Genetics**, v. 86, p. 187-198, 1977.
- SENE, F. M.; VAL, F. C.; VILELA, C. R.; PEREIRA, M. A. Q. R. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia e Secretaria da Agricultura**, v. 33, p. 315-326, 1980.
- SRIVASTAVA, D. S. Using local-regional richness plots to test for species saturation: pitfalls and potentials. **Journal of Animal Ecology**, v. 68, p. 1-6, 1999.
- TEMPLETON, A. R.; ROBERTSON, R. J.; BRISSON, J.; STRASBURG, J. Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 5426-5432, 2001.

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

TERBORGH, J.; ROBINSON, S. K.; PARKER, T. A.; MUNN, C. A.; PIERPONT, N. Structure and organization of an Amazonian forest bird community. **Ecological Monographs**, v. 60, p. 213-238, 1990.

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

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 311-317, 1992.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Fauna of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the northern area of the "Cadeia do Espinhaço", States of Minas Gerais and Bahia, Brazil: Biogeographical and ecological aspects. **Iheringia Série Zoologia**, v. 78, p. 85-94, 1995.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. *Drosophila*. In: (Brandão, C. R. F.; E. M. Canello (Eds) **Invertebrados Terrestres. 5. ed. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX**. FAPESP, São Paulo, 1999.

TILMAN, D. Competition and biodiversity in spatially structured habitats. **Ecology**, v. 75, p. 2-16, 1994.

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

VAN DER LINDE, K.; SEVENSTER, J. G. *Drosophila* diversity over a disturbance gradient. **Proceedings Experimental and Applied Entomology**, v. 13, p. 51-56, 2002.

VARANDAS, F. R.; SAMPAIO, M. C.; CARVALHO, A. B. Heritability of sexual proportion in experimental sex-ratio populations of *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 79, p. 104-112, 1997.

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

VILELA, C. R.; PEREIRA, M. A. Q. R.; SENE, F. M. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. II. The repleta group. **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 66-70, 1983.

WAGNER, H. H.; WILDI, O. Realistic simulation of the effects of abundance distribution and spatial heterogeneity on non-parametric estimators of species richness. **Ecoscience**, v. 9, p. 241-250, 2002.

WALLACE, A. R. **Tropical Nature and Other Essays**. MacMillan, London and New York, 1878.

WHITTAKER, R. H. **Communities and ecosystems**. Mac-Millan, 1975.

WIENS, J. A. On understanding a non-equilibrium world: myth and reality in community patterns and processes. In: Strong, D. (Eds) **Ecological communities: conceptual issues and the evidence**. Princeton University Press, 1984. p. 439-457.

WOLDA, H. Fluctuations in abundance of tropical insects. **American Naturalist**, v. 112, p. 1017-1045, 1978.

WOLDA, H. Trends in abundance of tropical forest insects. **Oecologia**, v. 89, p. 47-52, 1992.

# CAPÍTULO 1

---

ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE *DROSOPHILA* (DIPTERA:  
DROSOPHILIDAE) EM DOIS FRAGMENTOS COM FLORESTA DE ARAUCÁRIA

## Resumo

Devido ao aumento atual na destruição dos habitats globais, estudos sobre diversidade são de vital importância para compreender as comunidades biológicas e sua conservação. O gênero *Drosophila* é um excelente modelo biológico e vem sendo utilizado em estudos de biodiversidade e na avaliação da qualidade ambiental. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a estrutura de duas comunidades de *Drosophila* através do tempo e do espaço a fim de relacionar sua composição e variação com o estado de conservação das áreas. Os resultados indicaram que o fragmento florestal do Parque Municipal das Araucárias (Parque), uma unidade de conservação, apresentou maiores índices de diversidade, abundância e riqueza de espécies, quando comparado ao fragmento florestal da Fazenda Brandalise (Guairacá), uma propriedade particular com área superior a quatro vezes o tamanho do Parque. Esta observação pode ser explicada pela maior heterogeneidade e melhor estado de conservação da área do Parque. Entretanto, as proporções de espécies bioindicadoras, endêmicas e não associadas a ambientes alterados foram maiores no Guairacá. Em análises temporais, estas proporções diminuíram significativamente entre o ano de 2006 e 2008, principalmente na área do Guairacá, podendo indicar assim, que a qualidade das comunidades de *Drosophila* das áreas estudadas podem estar diminuindo, possivelmente devido a alterações dos ambientes naturais causados pela ação antrópica.

Palavras-chave: Comunidade de *Drosophila*; variação espacial e temporal; fragmentação florestal; conservação biológica.

## Abstract

Due to the current increase in habitat destruction, works about diversity are important to understand aspects of the biological communities for their conservation. The *Drosophila* genus consists in a good biological model and it has been used in environmental quality evaluation and bioindication studies. Thus, the aim of this work was to assess two *Drosophila* communities structure throughout time and space. The results pointed out that the *Drosophila* community of the forest fragment found in the Parque Municipal das Araucárias (Parque), which constitute a conservation unit, showed larger species diversity, abundance and richness indexes when compared with the community found in the Fazenda Brandalise (Guairacá) fragment, a private property with more than four times the total Parque area. This observation can be explained because of the larger heterogeneity and better conservation state of the Parque area. However, the proportions of bioindicator, endemic and not associate with disturbed environments species were larger in Guairacá. In temporal analysis, this proportion decreased significantly between the years 2006 and 2008, specially in the Guairacá area, indicating that the *Drosophila* community quality of the studied areas are decreasing, possible due to alterations in the natural environment caused by antropic action.

Key words: *Drosophila* community; spatial and temporal variations; forest fragmentation; biological conservation.

## Introdução

A destruição de habitats naturais é a causa mais significativa da extinção de populações e espécies (Hanski 1998) e a fragmentação florestal é o processo que mais contribui para a atual perda da biodiversidade. Assim, existe uma urgente necessidade de identificar os principais efeitos da fragmentação florestal em sistemas bióticos e de encontrar soluções de manejo (Didham et al. 1996). Devido ao aumento atual na destruição dos habitats globais, estudos sobre diversidade são de vital importância para compreender as comunidades biológicas e sua conservação (Purvis e Hector 2000).

O isolamento e a fragmentação induzem mudanças na estrutura florestal, podendo causar o rompimento dos processos biológicos que mantêm a biodiversidade e o funcionamento do ecossistema. Em um nível amplo, esses processos são mediados por insetos, e a fragmentação florestal não apenas influencia na sua abundância e diversidade, como também modifica as interações entre insetos, incluindo *Drosophila*, e outros organismos, direta e indiretamente. Enquanto as funções ecológicas dos insetos são geralmente bem documentadas, os efeitos da fragmentação florestal nas suas populações são pouco compreendidos (Didham et al. 1996).

O gênero *Drosophila* é o mais abundante da família Drosophilidae (Bächli 1998), algumas espécies são endêmicas de certas regiões e outras são cosmopolitas que muitas vezes se dispersam em associação às atividades humanas (Tidon-Sklorz e Sene 1999). A fauna de *Drosophila* nas regiões Neotropicais é altamente diversificada (Val et al. 1981), com numerosas espécies ainda por serem descritas. Vários aspectos fazem da *Drosophila* um excelente modelo biológico: tamanho pequeno; grande abundância; ampla distribuição; ciclo de vida curto; fácil coleta,

identificação e manipulação; extrema sensibilidade para mudanças nas condições de seu habitat: entre outros (Tidon 2006). Este gênero tem sido utilizado como um possível grupo foco para estudos de biodiversidade (Van der Linde e Sevenster 2002), e algumas espécies como bioindicadores para perturbações humanas na qualidade do ambiente (da Mata et al. 2008).

Embora as populações naturais Neotropicais de *Drosophila* sejam objeto de estudos ecológicos (Dobzhansky e Pavan 1950; Pavan 1959; Val et al. 1981; Tidon-Sklorz e Sene 1992, 1995; Saavedra et al. 1995; Moraes e Sene 2003; Mateus et al. 2006; Tidon 2006; de Toni et al. 2007; da Mata et al. 2008), o conhecimento sobre a ecologia das populações da maioria das espécies Neotropicais ainda é limitado (Brncic et al. 1985; Saavedra et al. 1995) comparado ao das espécies Paleárticas deste grupo.

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a estrutura de duas comunidades de *Drosophila* através do tempo e do espaço, quanto à abundância de indivíduos, número de espécies, e índices ecológicos de diversidade, levando em consideração as proporções de espécies bioindicadoras da qualidade ambiental, e espécies endêmicas não associadas a ambientes alterados. A partir disso, a biodiversidade avaliada para cada uma das comunidades de *Drosophila* foi relacionada com as características e estado de conservação de cada uma das áreas estudadas.

## **Materiais e Métodos**

### **Áreas de Estudo**

Para a realização deste estudo foram escolhidas duas áreas representativas de Floresta Ombrófila Mista – Mata de Araucária, com predominância de *Araucaria angustifolia* (Coniferae: Araucariaceae) (Figura 1). Estes fragmentos estão localizados no terceiro planalto paranaense, na sub-região denominada por Maack (1981) de Planalto de Guarapuava. Segundo a classificação climática de Köeppen, a região de Guarapuava tem clima mesotérmico úmido e superúmido, sem estações secas e com verões frescos. As médias de temperatura dos meses mais quentes são inferiores a 22 °C. As geadas são severas e freqüentes, e a temperatura média do mês mais frio é 12,9 °C. As duas áreas de coleta estão geograficamente separadas a uma distância de 6 Km, e entre elas existem outros fragmentos compostos por Floresta de Araucária.

Parque Municipal das Araucárias:

O primeiro fragmento é uma unidade de conservação denominada Parque Municipal das Araucárias (25°21'14" S, 51°29'50" O, 1064 m de altitude). Com uma área total de 104 ha composta por Mata de Araucária (43 ha), Floresta de Galeria (10,1 ha) (fisionomia distinta da Floresta de Araucária, onde a dominância do pinheiro é substituída pela do branquilha), Campo (6,8 ha), Várzea (11,1 ha), e áreas alteradas (33 ha) (fonte: SEMAFLOR – Guarapuava-PR). Esta área será citada aqui como “Parque”.



*Figura 1. Imagem de satélite da região a nordeste da cidade de Guarapuava – Paraná – Brasil. a) Parque Municipal das Araucárias. b) Fazenda Brandalise.*

Fazenda Brandalise:

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

### **Amostragem de *Drosophila***

Nas duas áreas foram realizadas coletas representativas das quatro estações do ano, durante os anos de 2006 e 2008: Verão – 26/Fevereiro/2006 e 19/Fevereiro/2008; Outono – 21/Maio/2006 e 19/Maio/2008; Inverno – 13/Agosto/2006 e 09/Agosto/2008; e Primavera – 05/Dezembro/2006 e 30/Outubro/2008.

Nestas coletas foram utilizadas armadilhas fechadas, modificadas daquelas descritas por Medeiros e Klaczko (1999), com iscas compostas de banana, laranja e fermento biológico (Sene et al. 1981). Em cada fragmento foram traçadas duas transecções horizontais paralelas, a uma distância de 15 m uma da outra, e com 200 m de comprimento cada. Foram instaladas seis armadilhas ao longo de cada transecção, distantes 40 m umas das outras e a 1,5 m acima do solo. Em cada coleta, as armadilhas permaneciam armadas por três dias. Os indivíduos adultos do gênero *Drosophila* capturados em cada coleta realizada foram transferidos diretamente das armadilhas para dentro de tubos de ensaio contendo meio de cultura, e transportados vivos até o laboratório.

## **Taxonomia**

Os indivíduos coletados foram identificados com o auxílio de microscópios estereoscópicos, utilizando chaves de identificação taxonômica existentes na literatura (Freire-Maia e Pavan 1949; Frota-Pessoa 1954).

Devido à existência de espécies crípticas e/ou de difícil identificação, alguns espécimes foram identificados somente até o nível de grupo ou subgrupo. O subgrupo *willistoni* inclui seis espécies crípticas de difícil identificação (Tidon-Sklorz e Sene 1999), duas destas espécies (*D. paulistorum* e *D. willistoni*) ocorrem nos estados de São Paulo e Santa Catarina (Tidon-Sklorz e Sene 1999; Schmitz et al. 2007; respectivamente). O subgrupo *repleta* inclui sete espécies, destas, três (*D. eleonora*, *D. repleta* e *D. zottii*) são descritas para o estado de São Paulo e duas (*D. repleta* e *D. zottii*) para Santa Catarina (Tidon-Sklorz e Sene 1999; Schmitz et al. 2007; respectivamente). O grupo *saltans* é formado por aproximadamente 20 espécies de ocorrência neotropical (Val et al. 1981), e algumas delas são de difícil identificação.

## **Dados Abióticos**

Os dados de temperatura, umidade relativa, precipitação e luminosidade (Anexo 1), relativos ao período das coletas foram fornecidos pela Estação Meteorológica do Campus do CEDETEG – UNICENTRO. Esta estação é localizada a menos de 10 km das duas áreas estudadas. Estes fatores ambientais foram escolhidos porque interagem fortemente com *Drosophila* e são limitantes para a abundância e a presença das espécies deste gênero (Tidon 2006).

## Análises dos Dados

Para estimar a diversidade da comunidade de *Drosophila* em cada fragmento e em cada estação, três índices ecológicos foram utilizados segundo Magurran (1988): (1) Índice de riqueza de Margalef,  $D_{Mg} = (S - 1)/(\ln N)$ , onde  $S$  representa o número de espécies e  $N$  o número de indivíduos. (2) Índice de heterogeneidade de Shannon,  $H' = -(\sum p_i \ln p_i)$ , onde  $p_i$  representa a frequência da espécie  $i$ . (3) Índice de equitabilidade de Pielou,  $J = H'/(\ln S')$ , onde  $H'$  é o índice de Shannon e  $S'$  o número de espécies na amostra. Através do número de espécies ( $S$ ) e da abundância de indivíduos ( $N$ ).

Foram realizadas regressões entre as médias dos fatores ambientais avaliados (Anexo 1) e a abundância das espécies representativas ( $N > 30$ ), através das estações ao longo dos anos estudados. Os resultados significativos de  $p$  indicarão possíveis influências destes fatores ambientais na presença e na abundância destas espécies de *Drosophila*. O programa PAST (Paleontological Statistics – software para computador e manual está disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) foi utilizado para calcular os índices ecológicos ( $D_{Mg}$ ;  $H'$ ;  $J$ ) e as regressões.

Para avaliar a qualidade da assembléia de *Drosophila* de cada fragmento em cada um dos anos estudados, duas abordagens foram utilizadas: (1) Comparação das frequências de espécies exóticas (introduzidas na região neotropical) e/ou relacionadas com habitats antrópicos (ambientes alterados), com espécies Neotropicais e não associadas a habitats humanos (classificação de acordo com Tidon-Sklorz e Sene 1999; Tidon 2006; Schmitz et al. 2007; da Mata et al. 2008). (2) Comparação das frequências de espécies consideradas indicadoras confiáveis para a avaliação da qualidade de ambientes florestais, com espécies não bioindicadoras (segundo da Mata et al. 2008 – *D. ornatifrons*, *D. paraguayensis* e *D. willistoni*, apresentam preferência por Florestas de Galeria não alteradas).

## Resultados

Para as coletas realizadas nos anos de 2006 e 2008, um total de 3481 espécimes do gênero *Drosophila* foram coletados e identificados (Tabela 1, Anexos 2 e 3). Estes indivíduos foram identificados como pertencentes a quatro diferentes subgêneros, 17 grupos e 57 espécies. Deste total, 1943 foram capturados na área do Parque, com representantes de todos os subgêneros e grupos amostrados, e de 50 das 57 espécies. Para o fragmento do Guairacá, foram coletados 1538 indivíduos pertencentes a 45 diferentes espécies, 15 grupos e aos quatro subgêneros.

A Tabela 1 mostra que além do maior número de espécies e indivíduos coletados, a área do Parque também apresentou os maiores valores para os três índices de diversidade avaliados, quando comparado ao Guairacá: riqueza (Parque,  $D_{Mg} = 6,47$ ; Guairacá,  $D_{Mg} = 6,00$ ); heterogeneidade (Parque,  $H' = 2,21$ ; Guairacá,  $H' = 1,57$ ); e equitabilidade (Parque,  $J = 0,57$ ; Guairacá,  $J = 0,41$ ).

**Tabela 1.** Abundância absoluta das espécies de *Drosophila* coletadas sazonalmente em dois fragmentos de Floresta de Araucárias durante os anos de 2006 e 2008 e resultados dos índices de diversidade: riqueza (Margalef -  $D_{Mg}$ ); heterogeneidade (Shannon -  $H'$ ); e equitabilidade (Pielou -  $J'$ ).

Grupo	Espécie	Espacial		Temporal				Total
		PA	GC	Ver	Out	Inv	Pri	
Gênero <i>Drosophila</i>								
Subgênero <i>Dorsilopha</i>								
<i>busckii</i>	<i>D. busckii</i>	1	4	1	2	2	0	5
Subgênero <i>Drosophila</i>								
<i>annulimana</i>	<i>D. annulimana</i>	5	8	8	0	0	5	13
	<i>D. arassari</i>	12	7	0	7	11	1	19
<i>bromeliae</i>	<i>D. bromelioides</i>	7	1	6	0	2	0	8
<i>calloptera</i>	<i>D. calloptera</i>	1	0	0	0	1	0	1
<i>cardini</i>	<i>D. cardini</i>	46	21	24	26	0	17	67
	<i>D. neocardini</i>	4	23	26	1	0	0	27
	<i>D. polymorpha</i>	253	120	217	22	11	123	373
<i>coffeata</i>	<i>D. coffeata</i>	1	0	0	0	1	0	1
	<i>D. fuscolineata</i>	2	1	0	2	1	0	3
<i>dreyfusi</i>	<i>D. camargoi</i>	4	0	2	1	0	1	4
	<i>D. dreyfusi</i>	7	2	0	8	1	0	9
<i>guarani</i>	<i>D. griseolineata</i>	1	2	0	0	2	1	3
	<i>D. guaraja</i>	21	9	5	21	3	1	30
	<i>D. guaru</i>	12	22	2	4	23	5	34
	<i>D. maculifrons</i>	24	5	11	15	0	3	29
	<i>D. ornatifrons</i>	26	12	5	4	28	1	38
<i>immigrans</i>	<i>D. immigrans</i>	13	6	3	6	2	8	19
<i>mesophragmatica</i>	<i>D. mesophragmatica</i>	8	2	10	0	0	0	10
<i>pallidipennis</i>	<i>D. pallidipennis</i>	11	7	1	7	2	8	18

Continua

Continuação

<i>peruviana</i>	<i>D. peruviana</i>	9	0	0	0	0	9	<b>9</b>
<i>repleta</i>	<i>D. fascioides</i>	1	0	0	1	0	0	<b>1</b>
	<i>D. hydei</i>	1	1	1	0	0	1	<b>2</b>
	<i>D. moju</i>	3	4	2	4	1	0	<b>7</b>
	<i>D. onca</i>	2	0	0	0	2	0	<b>2</b>
	<i>D. repleta*</i>	0	5	5	0	0	0	<b>5</b>
<i>tripunctata</i>	<i>D. addisoni</i>	9	5	0	7	7	0	<b>14</b>
	<i>D. angustibucca</i>	2	0	0	2	0	0	<b>2</b>
	<i>D. bandeirantium</i>	18	8	4	9	5	8	<b>26</b>
	<i>D. bifilum</i>	4	1	0	5	0	0	<b>5</b>
	<i>D. bipunctata</i>	4	0	0	4	0	0	<b>4</b>
	<i>D. divisa</i>	0	1	0	1	0	0	<b>1</b>
	<i>D. mediocris</i>	1	0	0	1	0	0	<b>1</b>
	<i>D. medioimpressa</i>	6	3	0	7	2	0	<b>9</b>
	<i>D. mediopicta</i>	30	7	12	18	0	7	<b>37</b>
	<i>D. mediopunctata</i>	72	61	0	60	52	21	<b>133</b>
	<i>D. mediotriata</i>	12	7	14	3	1	1	<b>19</b>
	<i>D. morena</i>	5	1	0	4	2	0	<b>6</b>
	<i>D. nigricinta</i>	2	0	0	2	0	0	<b>2</b>
	<i>D. paraguayensis</i>	19	9	0	28	0	0	<b>28</b>
	<i>D. platitarsus</i>	1	0	0	1	0	0	<b>1</b>
	<i>D. prosimilis</i>	10	3	0	12	0	1	<b>13</b>
	<i>D. pruinafacies</i>	4	1	0	5	0	0	<b>5</b>
	<i>D. trifilum</i>	0	1	0	1	0	0	<b>1</b>
Não agrupada	<i>D. caponei</i>	1	1	0	0	1	1	<b>2</b>
Não agrupada	<i>D. impudica</i>	0	1	1	0	0	0	<b>1</b>
Não agrupada	<i>D. tuchaua</i>	2	3	0	4	1	0	<b>5</b>
Subgênero <i>Scaptodrosophila</i>								
Não agrupada	<i>D. latifasciaeformis</i>	5	1	4	1	1	0	<b>6</b>
Subgênero <i>Sophophora</i>								
<i>melanogaster</i>	<i>D. ananassae</i>	3	0	0	0	2	1	<b>3</b>
	<i>D. montium</i>	744	121	807	7	11	40	<b>865</b>
	<i>D. simulans</i>	82	10	59	29	0	4	<b>92</b>

Continua

Continuação

<i>saltans</i>	<i>D. prosaltans</i>	0	1	0	0	0	1	<b>1</b>
	<i>D. saltans</i> **	0	2	2	0	0	0	<b>2</b>
	<i>D. sturtevanti</i>	16	6	16	0	4	2	<b>22</b>
<i>willistoni</i>	<i>D. bocainensis</i>	0	1	0	0	1	0	<b>1</b>
	<i>D. capricorni</i>	17	12	5	13	1	10	<b>29</b>
	<i>D. willistoni</i> *	399	1009	1082	266	22	38	<b>1408</b>
<b>Abundância Total (N)</b>		1943	1538	2335	621	206	319	<b>3481</b>
<b>Número de Espécies (S)</b>		50	45	28	40	31	27	<b>57</b>
<b>Riqueza (<math>D_{mg}</math>)</b>		6,47	6,00	3,48	6,06	5,63	4,51	<b>6,87</b>
<b>Heterogeneidade (H)</b>		2,21	1,57	1,43	2,46	2,61	2,25	<b>2,08</b>
<b>Equitabilidade (J')</b>		0,57	0,41	0,43	0,67	0,76	0,68	<b>0,51</b>

PA, Parque; GC, Guairacá; Ver, Verão; Out, Outono; Inv, Inverno; Pri, Primavera.

\* e \*\*, espécies crípticas ou não que foram identificadas somente até o nível de subgrupo\* ou grupo\*\*.

Os resultados das análises sazonais através das estações do ano também estão apresentados na Tabela 1, e mostraram que o Verão, com 28 espécies coletadas e sendo a estação com maior abundância de indivíduos (2335), apresentou os menores valores para todos os índices de diversidade avaliados ( $D_{Mg} = 3,48$ ;  $H' = 1,43$ ;  $J = 0,43$ ). No Outono, onde foram coletados 621 indivíduos e o maior número de espécies (40), a riqueza ( $D_{Mg} = 6,06$ ) também foi a maior, mas os índices de heterogeneidade ( $H' = 2,46$ ) e equitabilidade ( $J = 0,67$ ) apresentaram valores intermediários. Os maiores valores de heterogeneidade ( $H' = 2,61$ ) e equitabilidade ( $J = 0,76$ ) foram registrados no Inverno, onde foram coletadas 31 espécies e apresentou a menor abundância de indivíduos (206), e apresentou valores intermediários para o índice de riqueza ( $D_{Mg} = 5,63$ ). Na Primavera, foram coletados 319 indivíduos e o menor número de espécies (27), onde todos os índices de diversidade analisados apresentaram valores intermediários entre as estações ( $D_{Mg} = 4,51$ ;  $H' = 2,25$ ;  $J = 0,68$ ).

As regressões realizadas entre as variáveis ambientais e a abundância das espécies representativas ( $N > 30$ ), revelaram que quatro espécies apresentaram uma significativa influência de pelo menos um dos fatores ambientais avaliados (Tabela 2): *D. polymorpha* com luminosidade ( $p = 0,028$ ); *D. mediopunctata* com temperatura ( $p = 0,068$ ) e luminosidade ( $p = 0,100$ ); *D. ornatifrons* com luminosidade ( $p = 0,071$ ); e *D. guaraja* com temperatura ( $p = 0,091$ ).

**Tabela 2.** Valores das regressões entre o número de indivíduos das espécies representativas ( $N > 30$ ) e as variáveis climáticas avaliadas.

<b>Espécie</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Umidade</b>	<b>Precipitação</b>	<b>Luminosidade</b>
<i>D. willistoni</i>	0,233	0,610	0,417	0,867
<i>D. montium</i>	0,317	0,955	0,536	0,136
<i>D. polymorpha</i>	0,120	0,456	0,435	0,028**
<i>D. mediopunctata</i>	0,068*	0,608	0,940	0,100*
<i>D. simulans</i>	0,765	0,905	0,584	0,302
<i>D. cardini</i>	0,441	0,931	0,793	0,167
<i>D. ornatifrons</i>	0,111	0,310	0,113	0,071*
<i>D. mediopicta</i>	0,904	0,976	0,636	0,810
<i>D. guaru</i>	0,584	0,385	0,809	0,367
<i>D. guaraja</i>	0,091*	0,560	0,977	0,863

Significância \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,05$ .

A Figura 2 apresenta a comparação entre a frequência das espécies exóticas e/ou relacionadas com habitats antrópicos (*D. ananassae*, *D. busckii*, *D. fuscolineata*, *D. hydei*, *D. immigrans*, *D. latifasciaeformis*, *D. montium*, *D. polymorpha*, *D. prosaltans*, *D. repleta*, e *D. simulans*), com espécies Neotropicais e não associadas a ambientes alterados. A média para os anos de 2006 e 2008 da proporção de espécies endêmicas não associadas com ambientes alterados foi maior no Guairacá do que no Parque (82,4% e 43,2%, respectivamente; dados não mostrados), e para as duas áreas esta proporção foi maior no ano de 2006 e menor em 2008 (Parque 2006, 60,5%; Parque 2008, 36,8%; Guairacá 2006, 91,6%; Guairacá 2008, 54,8%).

A comparação das frequências de espécies consideradas indicadoras confiáveis para a avaliação da qualidade de ambientes florestais (*D. ornatifrons*, *D. paraguayensis* e *D. willistoni*), com espécies não consideradas bioindicadoras confiáveis, são apresentadas na Figura 3. A média para os anos de 2006 e 2008 da proporção de espécies bioindicadoras foi maior no Guairacá do que no Parque (67,0% e 22,9%, respectivamente; dados não mostrados), e para as duas áreas esta proporção foi maior no ano de 2006 e menor em 2008 (Parque 2006, 32,8%; Parque 2008, 19,2%; Guairacá 2006, 83,0%; Guairacá 2008, 18,5%). Entretanto, para o ano de 2008, o Parque apresentou maior frequência do que o Guairacá.

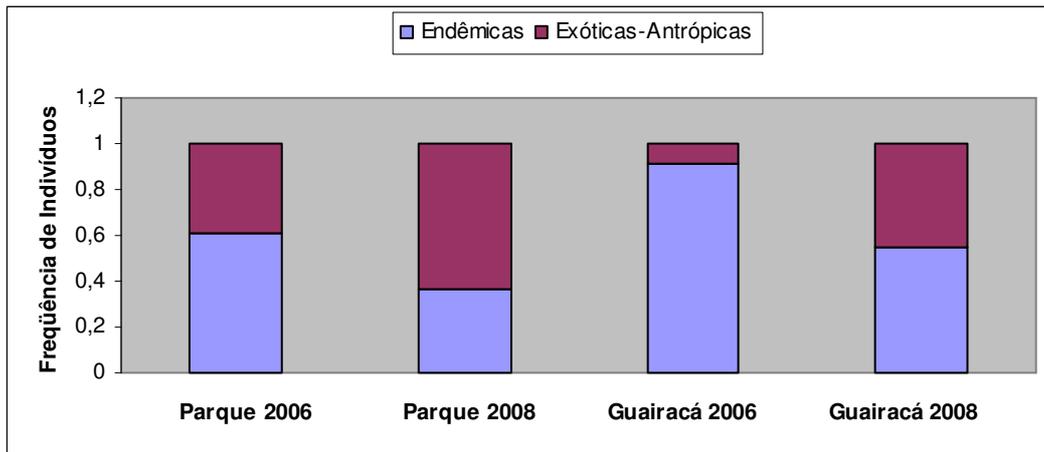


Figura 2. Frequências de espécies exóticas e/ou associadas com habitats antrópicos comparadas com as frequências de espécies Neotropicais (endêmicas) e não associadas com ambientes alterados, considerando as duas áreas de Floresta de Araucária, Parque e Guairacá, em dois anos de coleta (2006 e 2008).

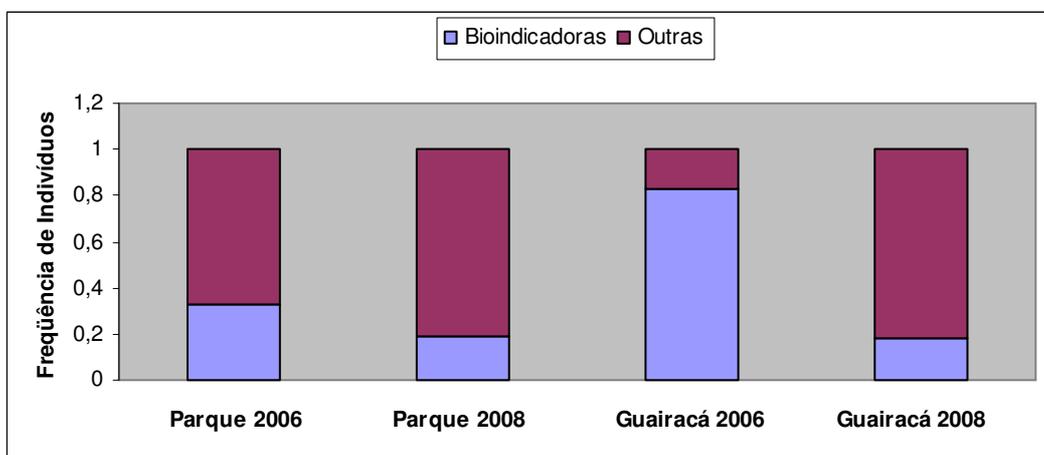


Figura 3. Frequências de espécies bioindicadoras confiáveis para a avaliação da qualidade de ambientes florestais comparadas com as frequências de espécies não bioindicadoras, considerando as duas áreas de Floresta de Araucária, Parque e Guairacá, em dois anos de coleta (2006 e 2008).

## Discussão

Abordagens sobre variações temporais e espaciais na composição de comunidades biológicas são importantes para estudos sobre a estrutura e a diversidade destas comunidades, bem como para estudos sobre a conservação da biodiversidade por meio da conservação e preservação dos habitats naturais e de suas comunidades.

A comparação realizada por Tidon (2006) entre populações de *Drosophilidae* do Cerrado e de Florestas de Galeria, indicou uma maior diversidade na estação seca (Inverno) em ambos os ecossistemas, apesar de que as maiores riquezas específicas foram encontradas nos períodos úmidos. A autora atribui este fato à redução do tamanho populacional de quase todas as espécies, devido ao estresse ambiental em estações secas e a migração destas espécies para ecossistemas adjacentes. Assim, a diversidade é elevada pela uniformidade na contribuição de indivíduos de cada espécie.

Nossos resultados indicaram que no Outono ocorreu um aumento na riqueza de espécies (maiores valores de  $S$  e  $D_{Mg}$ ). Mas no Inverno, com uma situação de elevado estresse ambiental, o tamanho da maioria das populações foi reduzido, causando um aumento na diversidade da comunidade de *Drosophila* (maiores valores de  $J$  e  $H'$ ). Estas observações foram devido ao aumento da equitabilidade e heterogeneidade, e a conseqüente diminuição da dominância das espécies no Inverno. Estas observações também foram relatadas por Tidon (2006) e de Toni et al. (2007).

A abundância em populações de insetos pode variar constantemente no tempo por alguns motivos, como mudanças macro e microclimáticas, e variações na disponibilidade de recursos alimentares (Wolda 1988). As diferentes condições

climáticas durante o ano são fundamentais para a flutuação no tamanho populacional. A temperatura e a umidade afetam a maioria dos parâmetros vitais para a sobrevivência de *Drosophila*, assim como a viabilidade, comportamento de acasalamento, fertilidade, tempo de desenvolvimento, descendência, e outros fatores que são relacionados diretamente com o tamanho de uma população. Além disso, a temperatura afeta a agilidade e conseqüentemente o número de moscas que se movem em direção às iscas (de Toni et al. 2007).

Os estudos de *Drosophila* em regiões Temperadas revelam que a abundância de diferentes espécies muda significativamente com o tempo e freqüentemente são dependes das condições climáticas (Patterson 1943; Pipkin 1952; Basden 1953; Cooper e Dobzhansky 1956; Mather 1956; Paik 1957; Shorrocks 1975; Kimura 1976; Jaenike 1978a, 1978b; Franck e Valente 1985; Valente et al. 1989; Valente e Araujo 1991; Benado e Brncic 1994; Saavedra et al. 1995; Kim 1996; Rohde e Valente 1996; Goñi et al. 1997). Entretanto, estudos sazonais em regiões Tropicais não apresentam padrões consistentes relativos ao relacionamento entre a abundância de espécies e fatores climáticos (Dobzhansky e Pavan 1950; Pipkin 1953; Heed 1957; Pavan 1959; Hunter 1966; Hunter e Navarro 1969; Gupta 1974; Dasmohapatra et al. 1982; Martins 1987; Tidon-Sklorz e Sene 1992). Isto indica que, nestas áreas, a disponibilidade de locais de reprodução e alimentação desempenha um papel decisivo na flutuação do tamanho populacional das espécies de *Drosophila* (Tidon 2006), e as Florestas Tropicais podem ser consideradas sistemas de grande complexidade que devem ter propriedades não presentes em sistemas simples, tais como os encontrados em climas Temperados (Dobzhansky e Pavan 1950).

Nossos resultados sobre a influência dos fatores ambientais na abundância das espécies de *Drosophila* revelaram que quatro espécies apresentaram relações com a temperatura e/ou luminosidade. Nenhuma espécie analisada mostrou relações

significativas com umidade ou precipitação (Tabela 2). Assim, nossas observações estão de acordo com as relatadas para as Florestas Neotropicais (Tidon 2006).

Entretanto, a temperatura, a umidade (relativa e precipitação) e a intensidade luminosa são consideradas fatores que, mesmo independente da densidade, regulam o tamanho das populações de *Drosophila*. Além disso, estes elementos também exercem influências sobre os recursos alimentares e ações de parasitas e predadores (fatores dependentes da densidade). A fenologia das plantas exploradas por espécies de *Drosophila* depende diretamente dos fatores climáticos, reforçando a importância da sazonalidade para a composição das comunidades (de Toni et al. 2007).

Nossos dados sobre a distribuição temporal de *Drosophila* mostraram grandes flutuações no tamanho das populações da maioria das espécies coletadas. Embora a maioria destas espécies tenha apresentado o pico do tamanho populacional nas estações úmidas, algumas delas foram mais abundantes nas estações secas e frias. Este fenômeno apresenta novas oportunidades de nichos nas estações secas devido à diminuição do tamanho populacional da maioria das espécies de *Drosophila*. A diversidade de espécies nas estações secas é geralmente alta, e esta flutuação temporal da comunidade de *Drosophila* provavelmente contribui para a manutenção da biodiversidade nas regiões Tropicais (Tidon 2006).

Nas análises espaciais, o fragmento florestal do Parque apresentou maior abundância, riqueza e diversidade de espécies de *Drosophila* quando comparado à área do Guairacá. Embora o Guairacá possua uma área florestal maior, aproximadamente quatro vezes o tamanho do Parque, os resultados observados podem ser explicados de duas formas: (1) o Parque possui vários tipos diferentes de habitats na sua composição, sendo mais heterogêneo que o Guairacá, podendo assim apresentar mais microhabitats, ampliando as oportunidades de nichos, e assim, uma maior biodiversidade poderia ser mantida; e/ou (2) o Parque é uma Reserva Ecológica

desde 1991, portanto é uma área que é efetivamente preservada e conservada, enquanto que no Guairacá existe uma grande atividade antrópica extrativista (ervamate e pinhão), o que poderia afetar a estrutura da comunidade de *Drosophila* nesta área, explicando assim a baixa diversidade encontrada em comparação à área do Parque.

Entretanto, quando a composição da comunidade de *Drosophila* foi avaliada qualitativamente para as duas áreas, o Guairacá apresentou maiores proporções de espécies bioindicadoras, endêmicas e não associadas a ambientes alterados. Estes resultados estão diretamente relacionados com a grande dominância do subgênero *willistoni* nas amostras coletadas no Guairacá, principalmente no Verão de 2006 (Anexo 3). Esta elevada dominância também implicou em uma diminuição nos índices de diversidade ( $H'$  e  $J$ ) deste fragmento. Embora, estes dados também indiquem que para a média dos dois anos de coletas, a qualidade ambiental no fragmento do Guairacá foi maior do que no Parque.

As espécies bioindicadoras (*D. ornatifrons*, *D. paraguayensis* e *D. willistoni*) apresentam níveis significativos de frequência de ocorrência (fidelidade) e preferência (especificidade) por áreas não alteradas de Floresta de Galeria, quando comparadas a áreas alteradas de Floresta de Galeria, áreas abertas (Cerrado) ou urbanas (da Mata et al. 2008). Por outro lado, as espécies exóticas e/ou associadas com habitats antrópicos (*D. ananassae*, *D. busckii*, *D. fuscolineata*, *D. hydei*, *D. immigrans*, *D. latifasciaeformis*, *D. montium*, *D. polymorpha*, *D. prosaltans*, *D. repleta*, *D. simulans*) aumentam suas preferências por ambientes alterados, quando comparado com estágios não alterados. Estas espécies são chamadas de espécies detectoras, e também são utilizadas como bioindicadores ecológicos. Assim, avaliar as mudanças nas abundâncias relativas das diferentes categorias de espécies fornece um bom panorama das alterações nas comunidades de *Drosophila* em diferentes habitats.

Estas informações podem ser úteis não apenas em pesquisas diagnósticas, mas também em estudos periódicos de monitoramento e ocorrência de distúrbios ambientais. Deste modo, abordagens qualitativas são extremamente apropriadas para estudos relacionados com a conservação da biodiversidade (da Mata et al. 2008).

Nas comparações entre estas classes de espécies bioindicadoras através dos anos estudados (Figuras 2 e 3) foi observado que as proporções nas abundâncias das espécies endêmicas e não associadas a ambientes alterados foram maiores nas coletas de 2006 e menores em 2008, nas duas áreas. Isto revela uma diminuição nas freqüências destas espécies bioindicadoras ao decorrer do período de estudo, podendo assim indicar uma redução na qualidade destes ambientes. Entretanto, o fragmento do Guairacá apresentou reduções mais intensas nas freqüências destas espécies, quando comparado com o Parque. Alguns fatores podem explicar os resultados observados: (1) a intensa ação antrópica sobre a área do Guairacá pode estar diminuindo a qualidade ambiental do fragmento, reduzindo assim a freqüência de espécies endêmicas e não associadas a ambientes alterados; e (2) embora o fragmento do Parque seja uma Reserva Ecológica efetivamente preservada e conservada, a destruição de áreas naturais próximas pode estar interferindo na sua qualidade ambiental, e conseqüentemente na estrutura da comunidade de *Drosophila* local. Além disso, a área do Parque localiza-se margeada por áreas urbanas (residenciais), o que poderia contribuir para os resultados observados.

Sobre a estrutura das comunidades de *Drosophila* avaliadas neste estudo, e a qualidade dos fragmentos, algumas questões e considerações ainda permanecem: (1) Qual é o real estado de conservação das áreas estudadas? E dos fragmentos florestais nesta região? (2) A abundância, riqueza e diversidade de espécies de *Drosophila* observadas para estas áreas são realmente representativas para o bioma de Floresta de Araucária? (3) As diferenças entre as composições, diversidades e

estruturas das comunidades de *Drosophila* nas duas áreas avaliadas, são mais intensificadas pelas diferenças nas composições dos habitats, ou pelas diferenças nos níveis de alterações antrópicas dos ambientes? (4) Sobre a ação antrópica na área do Guairacá, o quanto este distúrbio ambiental está influenciando na comunidade de *Drosophila* local? E regional? (5) Se as comunidades biológicas do Parque realmente estiverem sendo afetadas pelas alterações ambientais nas regiões próximas, o quão efetivo para a conservação da biodiversidade pode ser a preservação de apenas uma pequena área isolada? A complementação deste estudo e acompanhamento da estrutura da comunidade de *Drosophila* por um tempo mais longo podem contribuir para a obtenção dos dados que venham a resolver tais questões.

Este estudo avaliou a estrutura da comunidade de *Drosophila* em dois fragmentos de Floresta de Araucária, sazonalmente ao longo dos anos de 2006 e 2008. A composição e a diversidade destas comunidades foram discutidas temporalmente e espacialmente, bem como a frequência de classes de espécies bioindicadoras da qualidade ambiental. A composição, qualidade e estado de conservação das áreas também foram relacionados com os dados analisados. Além disso, nossos resultados corroboram a necessidade de novas políticas de conservação dos remanescentes florestais, tendo como objetivo a efetiva manutenção das comunidades biológicas e a preservação da biodiversidade.

## Referências Bibliográficas

- BÄCHLI, G. Family Drosophilidae. In: Papp, L.; B. Darvas (Eds) **Contributions to a Manual of Palearctic Diptera**. 3. ed. Higher Brachycera. Science Herald, Budapest, 1998.
- BASDEN, E. B. The autumn flush of *Drosophila* (Diptera). **Nature**, v. 172, p. 1155-1156, 1953.
- BENADO, M.; BRNCIC, D. An eight-year phenological study of a local drosophilid community in Central Chile. **Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung**, v. 32, p. 51-63, 1994.
- BRNCIC, D.; BUDNIK, M.; GUINEZ, R. An analysis of a Drosophilidae community in Central Chile during a 3 year period. **Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolution-sforschung**, v. 23, p. 90-100, 1985.
- COOPER, D.M.; DOBZHANSKY, T. Studies on the ecology of *Drosophila* in the Yosemite region of California. I. The occurrence of species of *Drosophila* in different life zones and at different seasons. **Ecology**, v. 37, p. 526-533, 1956.
- DA MATA, R. A.; MCGEOCH, M.; TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biodiversity and conservation**, v. 17, p. 2899-2916, 2008.
- DASMOHAPATRA, D. P.; TRIPATHY, N. K.; DAS, C. C. Seasonal studies on *Drosophila* fauna of Khallikote Ghats, Orissa, India. **Drosophila Information Service**, v. 58, p. 38, 1982.
- DE TONI, D. C.; GOTTSCHALK, M. S.; CORDEIRO, J.; HOFMANN, P. P. R.; VALENTE, V. L. S. Study of the Drosophilidae (Diptera) Communities on Atlantic Forest Islands of Santa Catarina State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 356-375, 2007.
- DIDHAM, R. K.; GHAZOUL, J.; STORK, N. E.; DAVIS, A. J. Insects in fragmented forests: a functional approach. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 255-260, 1996.
- DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Local and seasonal variation in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **Journal of Animal Ecology**, v. 19, p. 1-14, 1950.
- FRANCK, G.; VALENTE, V. L. S. Study on the fluctuation in *Drosophila* populations of Bento Goncalves, RS, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 45, p. 133-141, 1985.
- FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da drosófila. **Cultus**, v. 1, p. 3-66, 1949.

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

GOÑI, B.; MARTINEZ, M. E.; DAGUER, P. Studies of two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 41, p. 89-93, 1997.

GUPTA, J. P. A preliminary observation on the seasonal activity of abundant *Drosophila* species at Chandraprabha, Uttar Pradesh. **Drosophila Information Service**, v. 51, p. 85-86, 1974.

HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, v. 396, p. 41-49, 1998.

HEED, W. B. Ecological and distributional notes on Drosophilidae (Diptera) of El Salvador. **University of Texas Publication**, v. 5721, p. 62-78, 1957.

HUNTER, A. S. High-altitude *Drosophila* of Colômbia (Diptera–Drosophilidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 59, p. 413-423, 1966.

HUNTER, A. S.; NAVARRO, A. A natural population of *Drosophila* (Diptera – Drosophilidae) in Colombia. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, p. 1101-1105, 1969.

JAENIKE, J. Ecological genetics in *Drosophila-Athabasca* – its effect on local abundance. **American Naturalist**, v. 112, p. 287-299, 1978a.

JAENIKE, J. Effect of island area on *Drosophila* population densities. **Oecologia**, v. 36, p. 327-332, 1978b.

KIM, W. T. Seasonal fluctuation and vertical microdistribution of drosophilid flies dwelling in the broad-leaved forests on Cheju-Do (Quelpart Island). **Korean Journal of Zoology**, v. 39, p. 325-336, 1996.

KIMURA, M. T. *Drosophila* survey of Hokkaido. XXX. Microdistribution and seasonal fluctuations of drosophilid flies dwelling among the undergrowth plants. **Journal of Faculty of Science, Hokkaido University**, v. 20, p. 192-202, 1976.

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

MAGURRAN, A. E. **Ecological Diversity and its Measurement**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1988.

MARTINS, M. Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). **Boletim Museu Paraense Emilio Goeldi**, v. 3, p. 195-218, 1987.

MATEUS, R. P.; BUSCHINI, M. L. T.; SENE, F. M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 719-729, 2006.

- MATHER, W. B. The genus *Drosophila* (Diptera) in eastern Queensland. II. Seasonal changes in a natural population. **Australian Journal of Zoology**, v. 4, p. 65-75, 1956.
- MEDEIROS, H. F.; KLACZKO, L. B. A weakly biased *Drosophila* trap. **Drosophila Information Service**, v. 82, p. 100-102, 1999.
- MORAES, E. M.; SENE, F. M. Relationships between necrotic cactus availability and population size in a cactophilic *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) located on a sandstone table hill in Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 51, p. 205-212, 2003.
- PAIK, Y. K. Seasonal changes in *Drosophila* populations in two adjacent areas in Korea. **Drosophila Information Service**, v. 31, p. 151-153, 1957.
- PATTERSON, J. T. The Drosophilidae of the Southwest. **University of Texas Publication**, v. 4313, p. 7-216, 1943.
- PAVAN, C. Relações entre populações naturais de *Drosophila* e o meio ambiente. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo**, v. 221, p. 1-81, 1959.
- PIPKIN, S. B. Seasonal fluctuations in *Drosophila* populations at different altitudes in the Lebanon mountains. **Zeitschrift für Induktive Abstammungs und Vererbungslehre**, v. 84, p. 270-305, 1952.
- PIPKIN, S. B. Fluctuations in *Drosophila* populations in a tropical area. **American Naturalist**, v. 87, p. 317-322, 1953.
- PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. **Nature**, v. 405, p. 212-219, 2000.
- ROHDE, C.; VALENTE, V. L. S. Ecological characteristics of urban populations of *Drosophila polymorpha* Dobzhansky and Pavan and *Drosophila cardinoides* Dobzhansky and Pavan (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 40, p. 75-79, 1996.
- SAAVEDRA, C. C.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; NAPP, M.; VALENTE, V. L. S. A descriptive and analytical study of 4 Neotropical drosophilid communities. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 33, p. 62-74, 1995.
- SCHMITZ, H. J.; VALENTE, V. L. S.; HOFMANN, P. R. P. Taxonomic Survey of Drosophilidae (Diptera) from Mangrove Forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 53-64, 2007.
- SENE, F. M. PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R.; BIZZO, N. M. V. Influence of different ways to set baits for collection of *Drosophila* flies in three natural environments. **Drosophila Information Service**, v. 56, p. 118-121, 1981.
- SHORROCKS, B. Distribution and abundance of woodland species of British *Drosophila* (Diptera-Drosophilidae). **Journal of Animal Ecology**, v. 44, p. 851-864, 1975.

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

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 311-317, 1992.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Fauna of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the northern area of the “Cadeia do Espinhaço”, States of Minas Gerais and Bahia, Brazil: Biogeographical and ecological aspects. **Iheringia Série Zoologia**, v. 78, p. 85-94, 1995.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. *Drosophila*. In: (Brandão, C. R. F.; E. M. Canello (Eds) **Invertebrados Terrestres. 5. ed. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX**. FAPESP, São Paulo, 1999.

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

VALENTE, V. L. S.; ARAUJO, A. M. Ecological aspects of *Drosophila* species in two contrasting environments in southern Brazil (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 35, p. 237-253, 1991.

VALENTE, V. L. S.; RUSZCZYK, A.; DOS SANTOS, R. A.; BONORINO, C. B. C.; BRUM, B. E. P.; REGNER, L.; MORALES, N. B. Genetic and ecological studies on urban and marginal populations of *Drosophila* in the south of Brazil. **Evolucion Biologica**, v. 3, p. 19-35, 1989.

VAN DER LINDE, K.; SEVENSTER, J. G. *Drosophila* diversity over a disturbance gradient. **Proceedings Experimental and Applied Entomology**, v. 13, p. 51-56, 2002.

WOLDA, H. Insect seasonality – why? **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 19, p. 1-18, 1988.

## CAPÍTULO 2

---

DIFFERENTIAL BODY EXPRESSION OF ISOENZYMATIC LOCI IN ADULTS OF THE  
*DROSOPHILA MEDIOPUNCTATA* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

## Resumo

Vários estudos têm sido realizados sobre polimorfismo de proteínas e isoenzimas usando diferentes organismos, incluindo *Drosophila*. Recentemente, análises de dados combinados de locos isoenzimáticos, seqüências de DNA e morfologia, tem sido proposto para produzir melhores resultados sobre a história e a estrutura genética das populações. *Drosophila mediopunctata* possui muitas características que fazem dela um interessante modelo para estudos de genética de populações e evolutivos. Assim, o objetivo deste estudo foi o de detectar a expressão isoenzimática diferencial do corpo em *D. mediopunctata*, com o propósito de fornecer o padrão de expressão como um recurso para futuros estudos usando a combinação de dados isoenzimáticos, DNA e morfologia. Nossos resultados demonstraram que isso é possível e sugere que a extração do DNA seja realizada utilizando a cabeça, deixando as partes remanescentes para análises isoenzimáticas.

Palavras-chave: Variação isoenzimática; expressão diferencial; *Drosophila mediopunctata*.

## Abstract

Several works have been done on protein and isoenzyme polymorphisms using different organisms, including *Drosophila*. More recently, a combined data analysis of isoenzyme loci, DNA sequencing and morphology has been proposed producing better results about the history and genetic structure of populations. *Drosophila mediopunctata* has many characteristics that make it an interesting model for studies of evolution and population genetics. Thus, the aim of this work was to detect isoenzymatic differential body expression in *D. mediopunctata*, with the purpose of provide the pattern of expression as a tool for future combined works using isoenzyme, DNA and morphology data. Our results demonstrated that it is possible and suggest that the DNA extraction should carried out using the head, leaving the remaining parts for isoenzymatic assays.

Key words: Isoenzimatic variation; differential expression; *Drosophila mediopunctata*.

## Introduction

*Drosophila mediopunctata* belongs to the *D. tripunctata* group, which is endemic of the Neotropical region and incloses 64 nominal species (Vilela and Bächli 2000; Klaczko 2006). It is the second larger Drosophilidae group in this region and the largest group of the genus that occur in the Neotropical forests. In high altitudes and the cool season, *D. mediopunctata* is the more currently found species of the group. According to Klaczko (2006), this species has many characteristics that make it an interesting model for studies of evolution and population genetics.

The electrophoresis technique has been used by evolutionary and population geneticists since 1966 because it offers a way to evaluate the population genetic variation through the direct product of gene expression (Mateus et al. 2005). Several works have been done on protein and isoenzyme polymorphisms using different organisms, including *Drosophila*. In many of this works there is a preoccupation to relate the variation found in natural populations with several environmental aspects, and also with enzyme structure and functions, since the isoenzymatic approach is very important for population genetic variability studies. More recently, it has been proposed the combined data analysis of isoenzyme loci, DNA sequencing and morphology to produce better results about history and genetic structure of populations (Estoup et al. 1998; Dufresne et al. 2002; Mateus et al. 2005).

Thus, the aim of this work was to detect isoenzymatic differential tissue expression in *Drosophila mediopunctata*, with the purpose to provide the pattern of expression as a tool for future works of combined isoenzyme, DNA and morphology data.

## Material and Methods

Eighteen adult specimens of *Drosophila mediopunctata* were collected in the “Parque Municipal das Araucárias” (25°21'14” S, 51°29'50” W), located in the municipality of Guarapuava, Paraná state, Brazil. The three main body segments of these insects (head, thorax and abdomen) were separated. Seventeen samples were prepared for electrophoresis, six containing three heads each, six with three thoraxes each, and five with two abdomens each. These samples were submitted to gel electrophoresis and isoenzymatic loci analysis according to Mateus and Sene (2003), and the isoenzymatic body expression pattern was researched.

## Results and Discussion

The results were qualitatively analyzed accordingly to the isoenzymatic expression levels used by Mateus et al. (2005), with modifications: very low, low, high and very high expression (Table 1). Eight isoenzymatic systems were analyzed, resulting in 11 different loci. The head showed qualitatively significant expression (high or very high) of only three loci (*Est-1*, *Hk* and *Pgm*). On the other hand, the abdomen showed non significant expression (low or very low) of only two loci (*Est-1* and *Est-2*). Although thorax has showed the larger number of loci with very high expression level (*Est-1*, *Est-2*, *Mdh-2* and *Me*), it also had five loci with non significant expression (*Est-3*, *Gpdh*, *Hk*, *Lap* and *Pgm*).

Our results revealed that it is possible to perform a combined analysis using isoenzymes, DNA and morphology for the *Drosophila mediopunctata* natural populations as the DNA extraction can be carried out with the head, leaving the remaining parts for isoenzymatic and morphological approaches.

**Table 1.** Qualitative analysis of isoenzymatic body expression pattern of *Drosophila mediopunctata*. + = very low expression; ++ = low expression; +++ = high expression; ++++ = very high expression.

Loci	Head	Thorax	Abdomen
<i>Est-1</i>	++++	++++	+
<i>Est-2</i>	++	++++	++
<i>Est-3</i>	+	++	+++
<i>Gpdh</i>	+	++	++++
<i>Hk</i>	+++	+	+++
<i>Idh</i>	+	+++	+++
<i>Lap</i>	+	++	+++
<i>Mdh-1</i>	++	+++	+++
<i>Mdh-2</i>	++	++++	+++
<i>Me</i>	++	++++	+++
<i>Pgm</i>	+++	+	+++

## References

- DUFRESNE, F.; BOURGET, E.; BERNATCHEZ, L. Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*? **Molecular Ecology**, v. 11, p. 113-123, 2002.
- ESTOUP, A.; ROUSSET, F.; MICHALAKIS, Y.; CORNUET, J. M.; ADRIAMANGA, M.; GUYOMARD, R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 339-353, 1998.
- KLACZKO, L. B. Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. **Genetica**, v. 126, p. 43-55, 2006.
- MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biochemical Genetics**, v. 41, p. 219-233, 2003.
- MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. Differential body expression of isoenzymatic loci in adults of the cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Drosophila Information Service**, v. 88, p. 46-48, 2005.
- VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Five new species of Neotropical *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Bulletin de la Société Entomologique Suisse**, v. 73, p. 49-65, 2000.

## CAPÍTULO 3

---

VARIAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *DROSOPHILA*  
*MEDIOPUNCTATA* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) EM DOIS FRAGMENTOS COM  
FLORESTA DE ARAUCÁRIA

## Resumo

A destruição de habitats naturais é a causa mais significativa da extinção de populações e espécies. Assim, estudos sobre a variabilidade genética de populações naturais são de extrema importância para a compreensão de processos evolutivos que atuam na manutenção da biodiversidade. *Drosophila mediopunctata* é um interessante modelo biológico para estudos em genética de populações naturais e evolução, bem como para avaliações da qualidade ambiental. Assim, os objetivos deste estudo foram os de avaliar a estrutura isoenzimática de duas populações naturais de *D. mediopunctata* através do tempo e do espaço visando contribuir para futuros programas de conservação biológica. Os resultados indicaram uma alta deficiência de heterozigotos, possivelmente devido a fatores como alelos nulos, efeitos temporais de Wahlund, seleção contra heterozigotos e endogamia. Observou-se também uma moderada diferenciação genética entre as populações no tempo e no espaço, possivelmente influenciadas pela seleção natural em processos de adaptações à heterogeneidade ambiental, pela ação da deriva genética e secundariamente da endogamia, influenciadas diretamente pela flutuação no tamanho populacional. Com a análise dos resultados, pode-se inferir que para as populações naturais de *D. mediopunctata* estudadas, no final do inverno um evento de gargalo de garrafa ocorreu em resultado à diminuição do tamanho populacional, causando a formação de estrutura subpopulacionais devido principalmente à ação da deriva genética. No início do outono, com o aumento substancial do tamanho das populações e altos níveis de migração e fluxo gênico, o evento de gargalo de garrafa termina e a estrutura microgeográfica anteriormente adquirida desaparece como resultado da homogeneização genética entre as populações. Nossos resultados também indicaram que a variabilidade genética avaliada foi maior na unidade de

conservação Parque Municipal das Araucárias, quando comparada com a Fazenda Brandalise, uma propriedade particular com área superior a quatro vezes o tamanho do Parque. Esta observação pode ser explicada pela maior heterogeneidade e melhor estado de conservação do Parque. Assim, nossos resultados corroboram a necessidade de novas políticas de conservação dos remanescentes florestais, tendo como objetivo a preservação da biodiversidade e a manutenção da variabilidade genética de populações naturais.

Palavras-chave: *Drosophila mediopunctata*; variação isoenzimática; variação espacial e temporal; fragmentação florestal; conservação biológica.

## Abstract

Habitat destruction is the most significant cause of population and species extinction. Studies about genetic variability in natural populations are very important to understand the evolutionary processes that can be acting in the biodiversity maintenance. *Drosophila mediopunctata* is an interesting biological model for studies about the genetics and evolution of natural populations, as well as for environment quality evaluations. Thus, the aim of this work was to assess the isoenzymatic variability of two *D. mediopunctata* natural populations throughout time and space in order to contribute to future biodiversity conservation programs. The results indicated a very high deficiency of heterozygotes, probably due to null alleles, temporal Wahlund effect, selection against heterozygotes and/or inbreeding. A moderate genetic differentiation between populations in time and space was observed. This could be due to natural selection in the process of adaptation to the environmental heterogeneity, the action of genetic drift, and/or inbreeding. These two last ones could be directly affected by the variation in population size. At the end of winter a bottleneck event occurred after a decrease in population size, causing the formation of subpopulation structure favoring the action of genetic drift. In beginning of autumn, with the substantial increase of population size and the high levels of migration and gene flow, the bottleneck finishes and the microgeographic structure previously observed disappear with the genetic homogenization among populations. Our results also indicated that the genetic diversity detected was larger in the conservation unit Parque Municipal das Araucárias when compared with Fazenda Brandalise, a private property four times larger than Parque. This observation can be explained considering the larger heterogeneity and better conservation state of the Parque area. Thus, our results corroborate the

necessity of new politics regarding forest conservation, aiming the biodiversity preservation and the genetic variability maintenance in natural populations.

Key words: *Drosophila mediopunctata*; isoenzymatic variation; spatial and temporal variations; forest fragmentation; biological conservation.

## Introdução

A destruição de habitats naturais é a causa mais significativa da extinção de populações e espécies (Hanski 1998). A perda de habitats tem por consequência a diminuição na abundância de indivíduos e o aumento nos níveis de isolamento entre as populações (restritas nos fragmentos remanescentes). As diferenças genéticas entre as populações aumentam e a variabilidade dentro das populações diminui, assim, seus valores adaptativos podem diminuir deixando-as mais suscetíveis à extinção (Templeton et al. 1990, 2001).

Outra observação biológica sobre as populações naturais é a flutuação no tamanho populacional, a qual implica em alterações na variabilidade genética dentro das populações e em diferenciações entre as populações (Futuyma 1998). A flutuação no tamanho populacional é a variável mais importante que afeta a razão do tamanho populacional efetivo com relação ao tamanho total ( $N_e/N$ ). Esta razão representa a taxa de endogamia e de perda da variabilidade genética em populações naturais, sendo um parâmetro crítico para a genética evolutiva e para a manutenção da biodiversidade (Frankham 1995).

Flutuações acentuadas no tamanho das populações ocorrem em muitas espécies de *Drosophila* em ciclos anuais, geralmente por causa de especificidades ecológicas por locais de reprodução, e em resposta a disponibilidade de recursos (Dobzhansky e Pavan 1950). Estes insetos são altamente sensíveis a pequenas modificações ambientais, que são refletidas no tamanho das populações naturais (Tidon-Sklorz e Sene 1992).

*Drosophila mediopunctata* Dobzhansky e Pavan (1943) pertence ao grupo *tripunctata* (Frota-Pessoa 1954), o qual é endêmico das regiões Neotropicais e inclui 64 espécies descritas que residem nos habitats de florestas (Vilela e Bächli 2000).

Este é o segundo maior grupo de *Drosophila* nesta região e o maior do gênero que ocorre nas Florestas Neotropicais (Klaczko 2006). *D. mediopunctata* é uma espécie que reside estritamente em florestas e não é associada com habitats humanos, tem ampla distribuição geográfica sendo encontrada em muitas partes do Brasil e El Salvador (Val et al. 1981). É muito abundante em algumas áreas, particularmente no sul da sua distribuição ou em elevadas altitudes durante os meses mais frios do ano (Saavedra et al. 1995). Vários aspectos de sua biologia fazem de *D. mediopunctata* um interessante modelo para estudos em genética de populações naturais e evolução (Klaczko 1995, 2006).

Pesquisas com dados isoenzimáticos realizadas através de técnicas eletroforéticas vem sendo utilizadas por geneticistas evolutivos e de populações desde a década de 1960, Isto porque elas oferecem uma maneira de avaliar a variação genética das populações através do produto direto da expressão gênica (Hubby e Lewontin 1966; Lewontin e Hubby 1966). O nível de variação genética dentro das populações tem recebido considerável atenção porque ele é considerado geralmente como sendo o indicativo da vitalidade das espécies e o potencial para respostas evolutivas em mudanças ambientais (Barrett e Kohn 1991; Ellstrand e Elam 1993; Frankel et al. 1995; Templeton et al. 1990). Estudos de correlações temporais ou espaciais entre parâmetros ambientais e freqüências alélicas ou genotípicas em populações naturais fornecem supostas evidências de seleção, embora isso não prove seleção direta no loco enzimático (Bubliy et al. 1999; Kojima et al. 1972; Land et al. 2000; Mulley et al. 1979). Alguns estudos têm determinado que a heterogeneidade espacial ou temporal pode manter o polimorfismo genético (Felsenstein 1976; Hedrick et al. 1976; Karlin 1982).

Até o momento, não existe nenhum estudo sobre a variação isoenzimática em populações naturais de *D. mediopunctata*, apenas uma análise prévia em espécies do

grupo *tripunctata* (Mateus et al. 2008), e uma análise da expressão isoenzimática diferencial do corpo de indivíduos desta espécie (Cavasini et al. 2008) (Capítulo 2). A variabilidade genética de uma população é a base para os processos evolutivos. Assim, estudos sobre a variabilidade genética de populações naturais são extremamente importantes para compreender a história evolutiva de uma espécie (Mateus e Sene 2003).

Os objetivos deste estudo foram avaliar a variabilidade isoenzimática intrapopulacional de duas populações naturais de *D. mediopunctata* através do tempo e do espaço, discutir os processos evolutivos que podem estar ocorrendo nestas populações, bem como alguns eventos que podem estar induzindo estes processos. Além disso, relacionar a variabilidade genética avaliada em cada uma das populações com as características e estado de conservação de cada uma das áreas estudadas.

## **Materiais e Métodos**

### **Áreas de Estudo**

Para a realização deste estudo foram escolhidas duas áreas representativas de Floresta Ombrófila Mista – Mata de Araucária, com predominância de *Araucaria angustifolia* (Coniferae: Araucariaceae) (Figura 1). Estes fragmentos estão localizados no terceiro planalto paranaense, na sub-região denominada por Maack (1981) de Planalto de Guarapuava. Segundo a classificação climática de Köeppen, a região de Guarapuava tem clima mesotérmico úmido e superúmido, sem estações secas e com verões frescos. As médias de temperatura dos meses mais quentes são inferiores a 22 °C. As geadas são severas e freqüentes, e a temperatura média do mês mais frio é 12,9 °C. As duas áreas de coleta estão geograficamente separadas a uma distância de 6 Km, e entre elas existem outros fragmentos compostos por Floresta de Araucária.

Parque Municipal das Araucárias:

O Parque Municipal das Araucárias (25°21'14" S, 51°29'50" O, 1064 m de altitude) apresenta uma área total de 104 ha composta por Mata de Araucária (43 ha), Floresta de Galeria (10,1 ha) (fisionomia distinta da Floresta de Araucária, onde a dominância do pinheiro é substituída pela do branquilha), Campo (6,8 ha), Várzea (11,1 ha), e áreas alteradas (33 ha) (fonte: SEMAFLO – Guarapuava-PR). Esta área será citada aqui como "Parque".



*Figura 1. Imagem de satélite da região a nordeste da cidade de Guarapuava – Paraná – Brasil. a) Parque Municipal das Araucárias. b) Fazenda Brandalise.*

Fazenda Brandalise:

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

### **Amostragem de *Drosophila mediopunctata***

As amostras de *D. mediopunctata* utilizadas neste estudo foram obtidas sazonalmente durante o ano de 2008, através de duas metodologias de coleta. (1) Todos os indivíduos desta espécie que foram capturados nas coletas de 2008 descritas no Capítulo 1 (página 30), foram utilizados. (2) Para incrementar o tamanho amostral a ser analisado, também foram realizadas coletas com armadilhas abertas (pratos no chão) utilizando as mesmas iscas das armadilhas fechadas, e captura ativa através de redes entomológicas (Klaczko, L. B., comunicação pessoal).

Todos os espécimes identificados como *D. mediopunctata* nas duas metodologias de coleta foram identificados com relação ao sexo e ao padrão morfológico do número de pintas na região posterior do abdômen (policromatismo), para futuros estudos (por exemplo, razão sexual – Capítulo 4). Cada corpo (tórax/abdômen) foi armazenado individualmente em tubos de 1,5 mL a -20 °C, para análises isoenzimáticas. Cada cabeça foi armazenada individualmente em tubos de 1,5 mL a -20 °C, contendo 500 µL de álcool 70%, para futuros projetos envolvendo análises moleculares utilizando DNA e análises combinadas de dados de isoenzima e

DNA, conforme proposto por Cavasini et al. (2008) (Capítulo 2) para *D. mediopunctata*.

### **Procedimentos Eletroforéticos**

Todas as amostras de tórax/abdômen de *D. mediopunctata* foram individualmente homogeneizadas em 30 µL de água destilada e cada sobrenadante foi absorvido por três papéis de filtro Whatman 3MM (5 x 7 mm). Estas amostras foram aplicadas em gel de amido a 14% (Penetrose 30™) e analisadas quanto à variabilidade isoenzimática para oito locos, divididos em duas classes de acordo com o tipo de sistema eletroforético: (1) TC1 (Castanhera e Contel 1995) – Esterase (*Est*), α-Glicerofosfato desidrogenase (*Gpdh*), Isocitrato desidrogenase (*Idh*), Leucina amino peptidase (*Lap*), Malato desidrogenase (*Mdh*), e Enzima málica (*Me*). (2) TC2 (Sene e Carson 1977) – Hexoquinase (*Hk*), e Fosfoglicomutase (*Pgm*). Os sistemas TC1 e TC2 foram aplicados em géis horizontais de 20,5 cm x 14 cm x 0,8 cm, aplicando 3 V/cm por 5:00 h e 5:30 h (respectivamente) a 4 °C.

As colorações para *Est* e *Lap* foram preparadas pelo método de Harris e Hopkinson (1976); *Gpdh*, *Idh* e *Me* pelo método descrito por Falcão e Contel (1991b); *Hk* e *Pgm* pelo método descrito por Mateus e Sene (2003); e *Mdh* pelo método descrito por Falcão e Contel (1991a). Posteriormente, os géis foram fotografados em sistema de captura de imagens (Molecular Imaging L-Pix HE – Loccus Technology), e genotipados. Os locos foram numerados em ordem crescente do mais aniônico para o mais catiônico. Os alelos foram numerados em ordem crescente do mais catiônico para o mais aniônico.

## Dados Abióticos

Os dados de temperatura, umidade relativa, precipitação e luminosidade, para o período das coletas, foram fornecidos pela Estação Meteorológica do Campus do CEDETEG – UNICENTRO (Anexo 1, referente a 2008). Esta estação é localizada a menos de 10 km das duas áreas estudadas. Estes fatores ambientais foram escolhidos porque interagem fortemente com *Drosophila* e são limitantes para a abundância e a presença das espécies deste gênero (Tidon 2006).

## Análises dos Dados

O programa computacional TFGA (Miller 1997) foi utilizado para obter a frequência alélica, heterozigiosidade (observada –  $H_o$ , e esperada –  $H_e$ ), porcentagem de locos polimórficos, estatística  $F$  de Wright (Weir e Cockerham 1984), distância genética (Nei 1972), e teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste exato com o método convencional de Monte Carlo e o teste de Markov Chain (10 batches e 2000 permutações por batches). Cinco matrizes de dados foram criadas para realizar estas análises: duas temporais, separadamente para o Parque e o Guairacá, e tendo as estações como sendo diferentes populações; e três matrizes espaciais, separadamente para o Outono, Inverno e Primavera, e tendo os fragmentos como sendo diferentes populações. Os dados relativos ao Verão não foram considerados devido à captura de apenas um único indivíduo nesta estação.

Os valores obtidos para  $F_{st}$  por meio da estatística  $F$  de Wright foram utilizados em três abordagens: (1) Classificação da diferenciação genética entre os fragmentos (análises espaciais) e entre as estações (análises temporais), usando o guia qualitativo proposto por Wright (1978) em 'baixo' (0 – 0,05), 'moderado' (0,05 – 0,15), 'alto' (0,15 – 0,25) e 'muito alto' (> 0,25); (2) Cálculo do tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) para cada um dos fragmentos utilizando a equação dada por Waples (1989),  $F_{st} =$

$1 - [1 - 1/(2 N_e)]^t$ , onde  $t$  é o número de gerações, e determinado para estes dados como sendo três (considerando o tempo entre as coletas e o ciclo de vida da espécie); (3) Estimativa da taxa de fluxo gênico entre os dois fragmentos estudados para cada uma das estações através da fórmula dada por Wright (1931),  $F_{st} = 1 / (4 Nm + 1)$ , onde  $Nm$  representa o número efetivo de gametas migrantes entre as populações por geração; e posterior verificação do balanço entre a deriva genética e o fluxo gênico de acordo com Kimura e Weiss (1964). Para esta última abordagem, foi assumido que as populações estudadas estão em equilíbrio de acordo com o modelo de ilhas, no qual esta equação é baseada.

Dois testes de gargalo de garrafa gênico (*bottleneck*) foram realizados utilizando o software BOTTLENECK (Cornuet e Luikart 1996; software para computador e manual está disponível em: <http://www1.montpellier.inra.fr/URLB/bottleneck/bottleneck.html>), a fim de verificar a correlação entre as restrições da variabilidade genética com o índice de diversidade genética. A primeira avaliação utilizou o teste de Wilcoxon e o modelo de infinitos alelos. Este método estatístico é baseado no fato de que reduções no tamanho efetivo das populações resultam na perda desigual de alelos e da heterozigosidade. Pelo fato de que o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a diversidade genética, um evento recente de gargalo de garrafa pode vir a ser detectado. O segundo teste compara a distribuição das freqüências alélicas com a distribuição esperada em modelo-L (*L-shape* – L-sh). A população que tenha passado através de um gargalo de garrafa gênico provavelmente irá exibir um modelo deslocado (*shift mode* – SM) nas distribuições das freqüências alélicas.

Para estimar as possíveis ações da seleção natural sobre a variabilidade isoenzimática das populações estudadas, as variações temporais do alelo mais

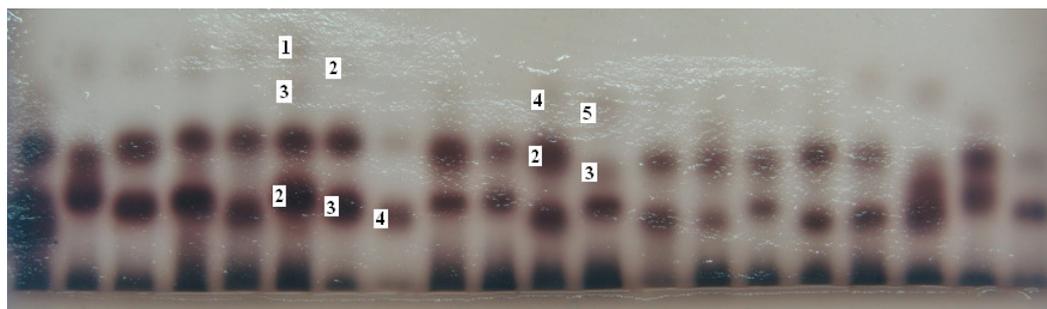
freqüente de cada um dos locos analisados foram correlacionadas com as médias das variáveis ambientais (Anexo 1), para as estações avaliadas.

## Resultados

Para as duas metodologias de coleta utilizadas no ano de 2008, um total de 157 espécimes de *D. mediopunctata* foram obtidos, 110 no Parque (Outono = 52; Inverno = 41; Primavera = 17) e 47 no Guairacá (Outono = 24; Inverno = 13; Primavera = 10). As análises isoenzimáticas resultaram em 22 locos e 63 alelos observados. Do total de locos, 72,73% apresentaram mais de um alelo (16 dos 22). Porém, apenas 15 locos e 55 alelos foram analisados devido ao número representativo de amostras. Destes, 54 alelos ocorreram no Parque (Outono = 49; Inverno = 42; Primavera = 46) e 52 no Guairacá (Outono = 44; Inverno = 39; Primavera = 38). Uma amostra dos géis de eletroforese, e a nomenclatura utilizada para denominar locos e alelos estão apresentadas nas Figuras 2 e 3.

A Tabela 1 apresenta os valores de frequência alélica e variabilidade genética dos locos analisados em cada coleta. Todos os locos apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em pelo menos duas das seis coletas. Para os locos analisados o polimorfismo em cada coleta variou entre 80% e 100%. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou entre 0,130 e 0,250 (Guairacá na Primavera e Parque no Inverno, respectivamente), e a média da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou entre 0,400 e 0,461 (Guairacá no Outono e Parque na Primavera, respectivamente). A média sazonal da heterozigosidade observada para o Parque foi de 0,232 e para o Guairacá de 0,202. Os testes de gargalo de garrafa detectaram um excesso de H estatisticamente significativo em duas coletas (Parque no Outono,  $p = 0,009$ ; e Guairacá na Primavera,  $p = 0,039$ ; dados não mostrados), e a distribuição da frequência alélica em modelo deslocado (SM) ocorreram em duas coletas (Guairacá no Inverno e na Primavera).

a)

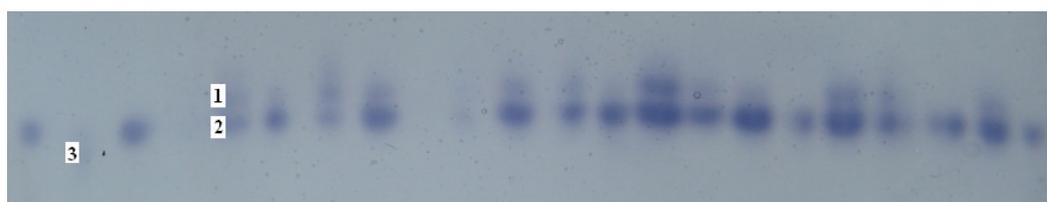


*Est-3*

*Est-2*

*Est-1*

b)



*Gpdh-2*

c)



*Hk-3*

*Hk-2*

*Hk-1*

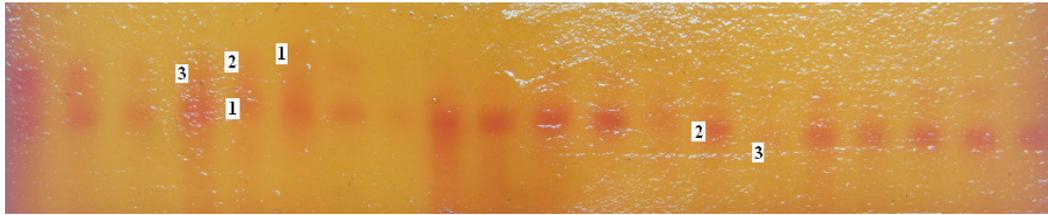
d)



*Idh-2*

Figura 2. Géis de amido (*Penetrose 30<sup>TM</sup>*) a 14% com indivíduos de duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata*. a) Esterase. b)  $\alpha$ -Glicerofosfato desidrogenase. c) Hexoquinase. d) Isocitrato desidrogenase

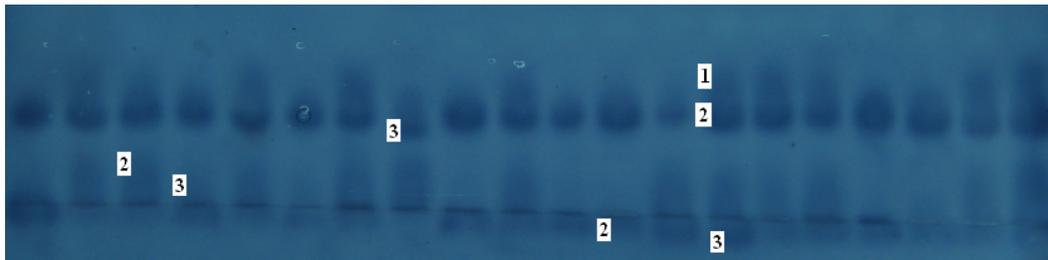
a)



**Lap-2**

**Lap-1**

b)

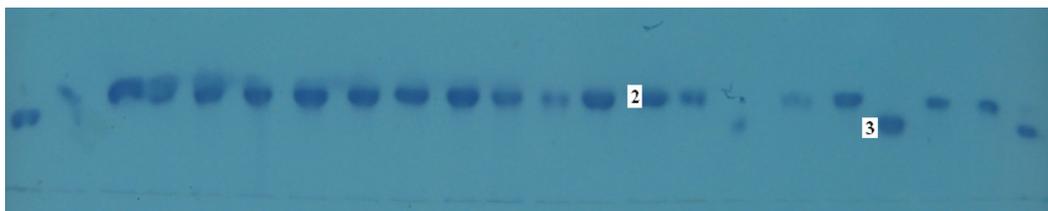


**Mdh-4**

**Mdh-2**

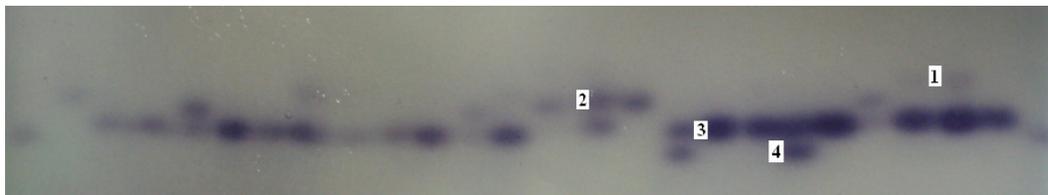
**Mdh-1**

c)



**Me**

d)



**Pgm**

Figura 3. Géis de amido (*Penetrose 30<sup>TM</sup>*) a 14% com indivíduos de duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata*. a) *Leucina amino peptidase*. b) *Malato desidrogenase*. c) *Enzima málica*. d) *Fosfoglicomutase*.

**Tabela 1.** Frequência alélica de 15 locos isoenzimáticos analisados sazonalmente em duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* e resultados das análises de polimorfismo, heterozigosidade, equilíbrio de Hardy-Weinberg e gargalo de garrafa.

Locos/ Alelos	Parque			Guairacá		
	Outono	Inverno	Primavera	Outono	Inverno	Primavera
<i>Est-1</i>	(n = 22)	(n = 41)	(n = 10)	(n = 20)	(n = 13)	(n = 09)
1	0,091	–	0,200	0,050	0,039	<b>0,167</b>
2	0,364	0,402	0,200	0,275	0,308	<b>0,222</b>
3	0,500	0,378	0,250	0,400	0,461	<b>0,222</b>
4	–	0,220	0,250	0,225	0,192	<b>0,111</b>
5	0,045	–	0,100	0,050	–	<b>0,278</b>
<i>Est-2</i>	(n = 39)	(n = 41)	(n = 11)	(n = 21)	(n = 13)	(n = 06)
1	<b>0,064</b>	0,110	0,091	0,119	0,116	<b>0,167</b>
2	<b>0,244</b>	0,598	0,364	0,405	0,346	–
3	<b>0,423</b>	0,256	0,318	0,333	0,269	<b>0,083</b>
4	<b>0,218</b>	0,024	0,091	0,095	0,153	<b>0,250</b>
5	<b>0,051</b>	0,012	0,136	0,048	0,116	<b>0,500</b>
<i>Est-3</i>	(n = 39)	(n = 39)	(n = 10)	(n = 19)	(n = 11)	(n = 04)
1	–	0,115	0,050	0,026	0,182	–
2	0,077	0,308	0,400	0,026	0,227	–
3	0,756	0,308	0,450	0,553	0,500	0,250
4	0,116	0,205	–	0,290	0,091	0,500
5	0,051	0,064	0,100	0,105	–	0,250
<i>Gpdh-2</i>	(n = 47)	(n = 41)	(n = 12)	(n = 21)	(n = 11)	(n = 06)
1	0,170	0,293	0,042	–	<b>0,182</b>	–
2	0,702	0,695	0,791	0,952	<b>0,727</b>	<b>0,833</b>
3	0,128	0,012	0,167	0,048	<b>0,091</b>	<b>0,167</b>
<i>Hk-1</i>	(n = 22)	(n = 21)	(n = 02)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 02)
1	0,114	–	<b>0,500</b>	–	0,100	–
2	0,477	<b>0,310</b>	<b>0,250</b>	0,500	0,800	<b>0,500</b>
3	0,409	<b>0,690</b>	<b>0,250</b>	0,500	0,100	<b>0,500</b>
<i>Hk-2</i>	(n = 31)	(n = 10)	(n = 08)	(n = 18)	(n = 03)	(n = 04)
1	0,210	<b>0,100</b>	–	0,055	–	<b>0,250</b>
2	0,742	<b>0,900</b>	<b>0,937</b>	0,917	<b>0,667</b>	<b>0,750</b>
3	0,048	–	<b>0,063</b>	0,028	<b>0,333</b>	–

Continua

Continuação

<i>Hk-3</i>	(n = 39)	(n = 0)	(n = 09)	(n = 18)	(n = 06)	(n = 03)
1	–	–	–	–	0,167	–
2	<b>0,949</b>	–	0,778	0,944	0,500	1,000
3	<b>0,051</b>	–	0,222	0,056	0,333	–
<i>Idh-2</i>	(n = 32)	(n = 41)	(n = 15)	(n = 11)	(n = 13)	(n = 06)
1	0,109	<b>0,061</b>	0,100	0,182	<b>0,115</b>	–
2	0,703	<b>0,915</b>	0,400	0,727	<b>0,846</b>	0,500
3	0,188	<b>0,024</b>	0,433	0,091	<b>0,039</b>	0,417
4	–	–	0,067	–	–	0,083
<i>Lap-1</i>	(n = 34)	(n = 41)	(n = 08)	(n = 16)	(n = 13)	(n = 07)
1	0,176	0,037	0,125	0,281	–	<b>0,143</b>
2	0,765	0,890	0,625	0,719	<b>0,846</b>	<b>0,786</b>
3	0,059	0,073	0,250	–	<b>0,154</b>	<b>0,071</b>
<i>Lap-2</i>	(n = 25)	(n = 33)	(n = 12)	(n = 19)	(n = 12)	(n = 07)
1	0,200	0,152	<b>0,083</b>	0,158	–	–
2	0,680	0,712	<b>0,667</b>	0,737	0,917	0,429
3	0,120	0,136	<b>0,250</b>	0,105	0,083	0,571
<i>Mdh-1</i>	(n = 47)	(n = 41)	(n = 16)	(n = 19)	(n = 13)	(n = 06)
1	0,085	0,049	0,031	<b>0,263</b>	<b>0,077</b>	<b>0,083</b>
2	0,830	0,878	0,813	<b>0,737</b>	<b>0,808</b>	<b>0,750</b>
3	0,085	0,073	0,156	–	<b>0,115</b>	<b>0,167</b>
<i>Mdh-2</i>	(n = 31)	(n = 37)	(n = 02)	(n = 23)	(n = 07)	(n = 04)
1	–	0,013	–	–	–	–
2	0,742	0,365	<b>0,750</b>	0,609	<b>0,643</b>	1,000
3	0,258	0,622	<b>0,250</b>	0,391	<b>0,357</b>	–
<i>Mdh-4</i>	(n = 50)	(n = 41)	(n = 15)	(n = 21)	(n = 12)	(n = 07)
1	0,230	0,390	0,367	<b>0,262</b>	<b>0,333</b>	0,071
2	0,660	0,610	0,333	<b>0,738</b>	<b>0,667</b>	0,286
3	0,110	–	0,267	–	–	0,643
4	–	–	0,033	–	–	–
<i>Me</i>	(n = 44)	(n = 41)	(n = 05)	(n = 20)	(n = 13)	(n = 06)
1	0,068	0,146	–	–	–	0,167
2	0,796	0,854	<b>0,800</b>	0,950	1,000	0,666
3	0,125	–	<b>0,200</b>	0,050	–	0,167
4	0,011	–	–	–	–	–

Continua

Continuação

<i>Pgm</i>	(n = 51)	(n = 18)	(n = 11)	(n = 07)	(n = 0)	(n = 03)
1	0,098	–	–	0,143	–	–
2	0,117	0,167	–	0,071	–	–
3	0,765	0,778	1,000	0,643	–	1,000
4	0,020	0,055	–	0,143	–	–
<b>NA</b>	49	42	46	44	39	38
<b><math>P_{0,95}</math></b>	1,000	1,000	0,933	0,933	0,933	0,800
<b><math>H_o</math></b>	0,229	0,250	0,217	0,241	0,236	0,130
<b><math>H_e</math></b>	0,434	0,440	0,461	0,400	0,454	0,402
<b>DFA</b>	L-sh*	L-sh	L-sh	L-sh	SM	SM*

n, número de espécimes analisados; NA, número de alelos observados;  $P_{0,95}$ , proporção de locos polimórficos analisados;  $H_o$ , média da heterozigosidade observada;  $H_e$ , média da heterozigosidade esperada; DFA, distribuição da frequência alélica; L-sh, distribuição em modelo-L; SM, distribuição em modelo deslocado.

Números em negrito representam frequências que estão em equilíbrio de Hardy–Weinberg.

\*Significante Excesso de H.

A identidade ( $I$ ) e a distância ( $D$ ) genética de Nei (1972) entre as estações em cada uma das populações, e entre as duas populações em cada uma das estações, são mostradas na Tabela 2. As estações mais similares foram o Outono e o Inverno para as duas populações (Parque,  $D = 0,077$ ;  $I = 0,926$ ; Guairacá,  $D = 0,075$ ;  $I = 0,927$ ), e as mais divergentes foram o Inverno e a Primavera, também para ambas as populações (Parque,  $D = 0,132$ ;  $I = 0,876$ ; Guairacá,  $D = 0,250$ ;  $I = 0,779$ ). Quando as duas populações foram comparadas em cada estação, observou-se que estas populações foram mais similares no Outono ( $D = 0,033$ ;  $I = 0,967$ ), e mais divergentes na Primavera ( $D = 0,131$ ;  $I = 0,877$ ).

A estatística  $F$  de Wright (Tabela 3) resultou, para as abordagens temporais, em uma diferenciação genética moderada e estatisticamente diferente de zero entre as estações nas duas populações (Parque,  $F_{st} = 0,074$ ; Guairacá,  $F_{st} = 0,080$ ). Para as abordagens espaciais, as estações do Outono e da Primavera apresentaram valores que não foram estatisticamente diferentes de zero ( $F_{st} = 0,011$ ;  $F_{st} = -0,007$ ; respectivamente), e pode indicar que não houve diferenciação genética entre as duas populações nestas estações. Contudo, para o Inverno, este índice resultou em uma diferenciação moderada e significativamente diferente de zero entre as populações ( $F_{st} = 0,066$ ). Pode ser observada ainda uma deficiência de heterozigotos muito alta nas análises temporais e espaciais, com todos os valores de  $F_{is}$  e de  $F_{it}$  positivos e significativamente diferentes de zero.

O tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) para as populações do Parque e do Guairacá através das estações foi de aproximadamente 20 e 18 indivíduos, respectivamente. A estimativa do número de migrantes ( $Nm$ ), avaliada entre os fragmentos no Outono e no Inverno ( $F_{st}$  positivos), foi de aproximadamente 23 e 4 gametas migrantes por geração, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 2.** Distância (*D*) e identidade (*I*) genética de Nei (1972) entre duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* em cada uma das estações, e entre as estações em cada uma das populações. (*D*) números em negrito; (*I*) números em itálico.

Estações	Temporal						Espacial	
	Parque			Guairacá			Parque e Guairacá ( <i>I</i> )	(D)
	Out	Inv	Pri	Out	Inv	Pri		
Out	–	<b>0,077</b>	<b>0,083</b>	–	<b>0,075</b>	<b>0,163</b>	<i>0,967</i>	<b>0,033</b>
Inv	<i>0,926</i>	–	<b>0,132</b>	<i>0,927</i>	–	<b>0,250</b>	<i>0,919</i>	<b>0,084</b>
Pri	<i>0,921</i>	<i>0,876</i>	–	<i>0,849</i>	<i>0,779</i>	–	<i>0,877</i>	<b>0,131</b>

Out = Outono; Inv = Inverno; Pri = Primavera.

**Tabela 3.** Estatística *F* de Wright temporal e espacial para os 15 locos analisados nas duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* ao longo das estações, e estimativas de tamanho efetivo da população e de número de migrantes.

Índices	95% IC	Temporal		Espacial		
		PA	GC	Out	Inv	Pri
<i>F<sub>st</sub></i>		<b>0,074</b>	<b>0,080</b>	<b>0,011</b>	<b>0,066</b>	<b>–,007</b>
	Mínimo	0,039	0,036	–,006	0,000	–,069
	Máximo	0,109	0,128	0,030	0,162	0,051
<i>F<sub>it</sub></i>		<b>0,482</b>	<b>0,525</b>	<b>0,458</b>	<b>0,380</b>	<b>0,662</b>
	Mínimo	0,289	0,387	0,193	0,064	0,546
	Máximo	0,669	0,661	0,701	0,647	0,788
<i>F<sub>is</sub></i>		<b>0,441</b>	<b>0,484</b>	<b>0,452</b>	<b>0,336</b>	<b>0,664</b>
	Mínimo	0,222	0,319	0,177	0,005	0,551
	Máximo	0,645	0,636	0,699	0,634	0,787
<i>N<sub>e</sub></i>		19,844	18,359	–	–	–
<i>N<sub>m</sub></i>		–	–	23,335	3,544	–

IC = intervalo de confiança do nível de significância; PA = Parque; GC = Guairacá; Out = Outono; Inv = Inverno; Pri = Primavera; *N<sub>e</sub>* = tamanho efetivo da população; *N<sub>m</sub>* = número de migrantes.

A Figura 4 apresenta correlações visuais entre as variações sazonais dos alelos mais freqüentes de cinco locos, com as variáveis ambientais observadas. O loco de *Est-3* apresentou correlação negativa entre a freqüência alélica e a precipitação (Figura 4-a). O loco de *Hk-2* apresentou correlação positiva entre a freqüência alélica e a umidade relativa (Figura 4-b). O loco de *Hk-3* apresentou correlação positiva entre a freqüência alélica e a luminosidade (Figura 4-c). Os locos de *Lap-2* e *Me* apresentaram correlações negativas entre as freqüências alélicas e a temperatura (Figuras 4-d e 4-e, respectivamente).

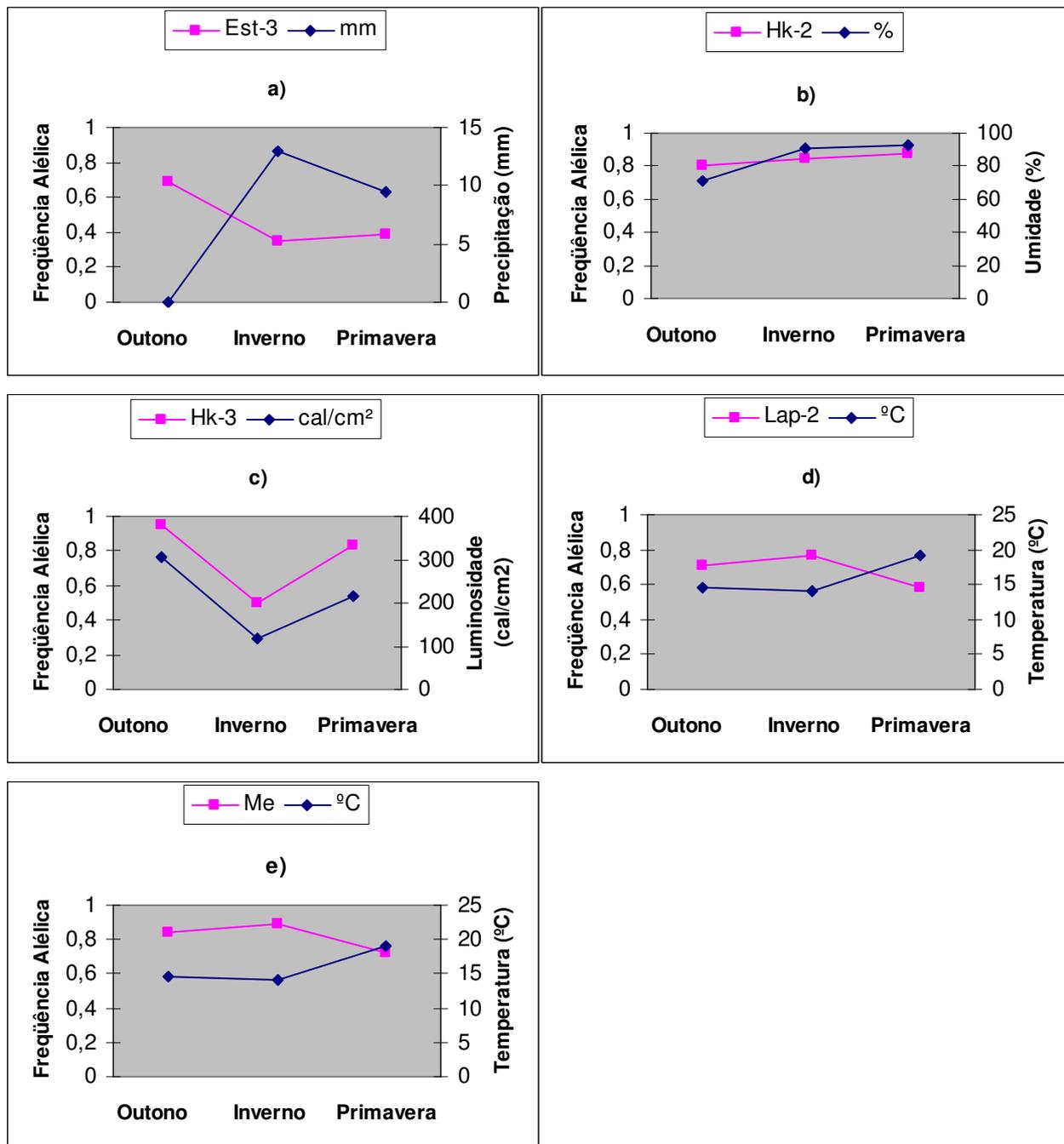


Figura 4 Variações sazonais do alelo mais freqüente de cinco locos de duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* comparada com variáveis ambientais. a) Est-3 e precipitação. b) Hk-2 e umidade. c) Hk-3 e luminosidade. d) Lap-2 e temperatura. e) Me e temperatura.

## Discussão

Abordagens sobre variações temporais e espaciais no padrão isoenzimático de populações naturais são importantes em estudos sobre processos e mecanismos evolutivos, bem como para estudos sobre a conservação da variabilidade genética das populações naturais, por meio da conservação e preservação dos habitats naturais e de suas populações.

As variações temporal e espacial nas freqüências alélicas analisadas revelaram que os 15 locos analisados apresentaram significativo desvio das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em pelo menos duas das seis coletas. Este resultado pode ser devido a vários fatores: introdução de novos conjuntos gênicos de outras populações, isto é, fluxo gênico; seleção natural moldando as variações nas freqüências alélicas; ação da deriva genética, causando modificações aleatórias nas freqüências; e/ou comportamento endogâmico. Com os dados analisados aqui, as influências de todas estas possibilidades serão discutidas.

Seleção natural causada por fatores ambientais é uma possível causa, uma vez que foram observadas variações na precipitação, umidade relativa, luminosidade e temperatura, e correlações visuais entre estas variáveis ambientais com a flutuação nas freqüências alélicas de cinco locos (*Est-3*, *Hk-2*, *Hk-3*, *Lap-2* e *Me*). As correlações visuais (Figura 4) podem ser um forte indício de que estes locos possam estar sendo selecionados, ou podem estar sobre o efeito carona na seleção de outros genes, regiões gênicas ou cromossômicas. Neste caso, seria necessário verificar as possíveis associações entre estes locos e as inversões cromossômicas já descritas para *D. mediopunctata* (Ananina et al. 2002), além das correlações entre as próprias inversões e estas variáveis abióticas.

A observação de fatores ambientais associados com variação temporal na frequência alélica isoenzimática também é encontrada em outras espécies de *Drosophila*. Por exemplo, Barker et al. (1986) estudando a estrutura microgeográfica espacial e temporal de uma população natural de *D. buzzatii* na Austrália, constataram que durante quatro anos (coletas mensais), a frequência alélica e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), e observada ( $H_o$ ), de quatro (*Adh-1*, *Aldox*, *Hex* e *Pgm*) dos seis locos avaliados (*Adh-1*, *Aldox*, *Est-1*, *Est-2*, *Hex* e *Pgm*), apresentaram significativas associações com uma ou mais variáveis ambientais. Três alelos apresentaram mudanças direcionais que foram correlacionadas com mudanças direcionais nas variáveis ambientais. Estes dados corroboram parcialmente nossas observações uma vez que, em ambos os estudos, os locos de *Est-1* e *Est-2* não foram relacionados com variáveis ambientais. Embora, o loco de *Pgm* em *D. buzzatii* Australianas esteja associado com fatores ambientais, esta observação não foi constatada neste estudo com *D. mediopunctata*.

Outro exemplo de relações entre frequência alélica e variáveis ambientais é relatado por Mateus e Sene (2003), em populações naturais de *D. antonietae* na região sudeste do Brasil. Foram observadas correlações visuais entre a variação na proporção dos alelos mais freqüentes de seis locos (*Adh-1*, *Est-2*, *Hk-2*, *Lap*, *Me* e *Pgm*) com variação na precipitação. Quando estes dados são confrontados com os resultados aqui apresentados, nota-se que em ambos os estudos os locos de *Hk-2* e *Me* correlacionam-se com fatores ambientais. Entretanto, o loco de *Hk-2* em *D. mediopunctata* está relacionado com a umidade relativa, e em *D. antonietae* com a precipitação. Tendo em vista que estas duas variáveis ambientais estão intimamente relacionadas, e que são fatores que influenciam fortemente na biologia de *Drosophila*, pode-se inferir que a umidade (relativa do ar, ou em nível de precipitação

pluviométrica) pode ter influencia sobre a frequência alélica do loco de *Hk-2* em algumas espécies do gênero *Drosophila*.

Uma deficiência muito alta de heterozigotos foi encontrada nas análises temporais e espaciais a partir dos valores positivos de  $F_{is}$ . Isto foi confirmado pela observação de que, em todas as coletas, a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) foi muito baixa em comparação a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ). Sob acasalamentos aleatórios, um  $F_{is}$  negativo pode ser esperado (Kimura e Crow 1963). De acordo com Prout e Barker (1993), existem várias possíveis razões para um  $F_{is}$  positivo: alelos nulos, efeitos temporais de Wahlund, seleção contra heterozigotos, acasalamento preferencial e endogamia.

Alelos nulos geralmente têm baixa frequência e podem explicar um  $F_{is}$  positivo porque os heterozigotos com alelos nulos aparecem genotipados como homozigotos, aumentando substancialmente o  $F_{is}$ . Efeito de Wahlund na amostra temporal pode ser possível se considerarmos que mais de uma geração foi amostrada em cada coleta, isto é, houve sobreposição de gerações nas amostras. Seleção contra heterozigotos é difícil de ser detectada, pela dificuldade em verificar se a seleção atua diretamente no loco isoenzimático ou se este está sob efeito carona na seleção de inversões cromossômicas, por exemplo. Acasalamento preferencial parece improvável porque este comportamento nunca foi observado em espécies de *Drosophila* (Kelly e Noor 1996). Mas por outro lado, a endogamia vem sendo usada para explicar altos níveis de deficiência de heterozigotos mesmo quando a biologia reprodutiva da espécie trabalha contra isso (Charlesworth 1991). Contudo, nenhum estudo sobre o comportamento endogâmico em *D. mediopunctata* existe até o momento.

Estes resultados demonstraram claramente uma diferenciação genética temporal significativa para os dois fragmentos a partir da estatística  $F$  de Wright, que mostraram níveis moderados de diferenciação entre as coletas ao longo das estações

avaliadas ( $F_{st} = 0,074$  para o Parque; e  $F_{st} = 0,080$  para o Guairacá). As análises de identidade genética de Nei (1972) demonstraram o mesmo padrão, onde as estações apresentaram similaridades genéticas moderadas quando comparadas umas com as outras, e os valores variaram aproximadamente entre 77% e 93%.

Com relação à variabilidade genética espacial, apenas o  $F_{st}$  obtido no Inverno foi estatisticamente diferente de zero ( $F_{st} = 0,066$ ), e indicou a existência de uma significativa estruturação populacional nesta estação do ano (subpopulações no Parque e no Guairacá). Análises de identidade genética de Nei estão parcialmente de acordo com estas observações, apresentando similaridades genéticas moderadas entre os fragmentos no Inverno e na Primavera (aproximadamente 92% e 88%, respectivamente). Entretanto, estruturas de subpopulações não foram observadas no Outono.

Outros estudos com populações naturais de *Drosophila* também relataram a existência de estruturação populacional. Por exemplo, Kojima et al. (1972) estudando 14 populações de *D. pavana* no Chile, observaram 16 locos dos quais oito eram polimórficos, e as variações de suas frequências alélicas entre as populações foram significativamente altas (quatro locos com  $p < 0,01$ ). Em todos os casos, uma parte significativa da variação entre as populações foi associada com variações em fatores ambientais (latitude, elevação, mês de coleta), e os autores sugerem evidências de seleção natural influenciando em adaptações a diferentes locais.

Em outro exemplo, Mateus e Sene (2007) estudando 11 populações naturais de *D. antonietae* no Sul e Sudeste do Brasil, avaliaram a variabilidade genética de 14 locos isoenzimáticos e observaram uma moderada diferenciação genética entre as populações ( $F_{st} = 0,0723$ ). Este valor é muito próximo dos encontrados em nosso estudo (onde foram utilizados praticamente os mesmos sistemas eletroforéticos), entretanto, a avaliação nas populações de *D. antonietae* foi macrogeográfica e em *D.*

*mediopunctata* foi microgeográfica. Em outro estudo com populações naturais de *D. antonietae*, os mesmos autores (Mateus e Sene 2003) encontraram níveis de diferenciação genética baixo ( $F_{st} = 0,0355$ ) e muito baixo ( $F_{st} = 0,0023$ ) para análises microgeográficas temporais e espaciais, respectivamente. Estas observações podem indicar que a diferenciação genética em populações naturais de *D. mediopunctata* ocorra em níveis mais elevados do que em *D. antonietae*, uma vez que esta última é restrita a vegetações cactofílicas, e possivelmente suas populações tenham um nível maior de isolamento.

A flutuação no tamanho populacional de *D. mediopunctata* foi observada através das estações do ano (Verão com um indivíduo, Outono com 76, Inverno com 54, e Primavera com 27). Esta variação parece ser cíclica em um ano, assim como observado por Dobzhansky e Pavan (1950) para a maioria das espécies do gênero *Drosophila*. Os nossos resultados revelam que o tamanho máximo populacional ocorreu no Outono, e declinou através das estações até o Verão, com o tamanho mínimo. Estes dados, quando confrontados com a similaridade genética de Nei para as estações analisadas, demonstram uma correlação entre a flutuação no tamanho populacional e a distância genética (Tabela 2). Quando o tamanho populacional diminui, as duas populações aumentam sua distância genética. Esta observação sugere uma forte ação da deriva genética sobre as populações estudadas, principalmente quando o tamanho populacional é pequeno, uma vez que com a redução no tamanho populacional, aumenta a probabilidade da variação das freqüências alélicas serem aleatórias, induzindo a diferenciações genéticas entre as populações.

A existência de estruturas subpopulacionais no Inverno e na Primavera (estações analisadas que apresentaram as menores abundâncias) também corrobora o aumento da probabilidade da presença da deriva genética nestes períodos. E

possivelmente, este seja um dos principais processos evolutivos que levem a formação de estruturas microgeográficas através do tempo nesta espécie. Porém, a redução no tamanho populacional também pode causar a diminuição na probabilidade de ocorrência de acasalamentos aleatórios, podendo assim aumentar as taxas de endogamia na população. Embora comportamento endogâmico não tenha sido observado para esta espécie, é possível que com a redução do tamanho populacional, acasalamentos entre indivíduos aparentados podem passar a ocorrer com uma maior frequência. Entretanto, a ação da seleção natural, influenciada por processos adaptativos a ambientes heterogêneos, não pode ser descartada como uma possível força que possa contribuir para a formação da estrutura microgeográfica temporal e espacial observada nas populações naturais de *D. mediopunctata* estudadas.

O número de migrantes estimado entre as duas populações mostrou-se maior no Outono e menor no Inverno. De acordo com Long (1986), os valores de  $F_{it}$  são reduzidos após migrações, e este índice confirma a alta taxa de fluxo gênico no Outono (Tabela 3). Para o Inverno, o número de migrantes calculado pode ter sido superestimado, porque a presença de estrutura subpopulacionais indica que no equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico, a deriva genética deveria sobrepor-se ao fluxo gênico, e não o oposto. Assim, o número de migrantes no Inverno (aproximadamente quatro gametas migrantes por geração) deve ser um reflexo dos altos índices de fluxo gênico que ocorreram no Outono.

O significativo excesso de H detectado no Outono e na Primavera (Tabela 1) sugere a ocorrência de um recente evento de gargalo de garrafa genético. Esta observação é corroborada pela correlação observada entre a flutuação no tamanho populacional com a distância genética de Nei, e pela presença dos processos evolutivos discutidos anteriormente. Assim, pode-se inferir que, para as populações

naturais de *D. mediopunctata* estudadas, no final do Inverno ocorre um evento de gargalo de garrafa em resultado à diminuição do tamanho populacional, causando a formação de estrutura subpopulacionais devido principalmente à ação da deriva genética. No início do Outono, com o aumento substancial do tamanho das populações e altos níveis de migração e fluxo gênico, o evento de gargalo de garrafa termina e a estrutura microgeográfica anteriormente adquirida desaparece como resultado da homogeneização genética entre as populações.

Os processos evolutivos relacionados com a flutuação no tamanho populacional, principalmente a deriva genética e a endogamia, induzem a perda de variabilidade genética em populações naturais (Futuyma 1998). Quanto menor for o tamanho da população, menor também será a variabilidade. Esta observação foi parcialmente confirmada para as populações estudadas através de dois índices de variabilidade genética, o número de alelos presentes na amostra e a heterozigosidade observada. A população do Guairacá apresentou os valores de ambos os índices correlacionados positivamente com o tamanho populacional (Tabela 1), mas, o mesmo não foi observado na população do Parque.

Os resultados das análises espaciais da variabilidade isoenzimática revelam que a população de *D. mediopunctata* do Parque, apresentou maior variabilidade genética que a do Guairacá (54 alelos,  $H_o = 0,232$ ; 52 alelos,  $H_o = 0,202$ ; respectivamente). Embora o Guairacá possua uma área florestal maior (aproximadamente quatro vezes o tamanho do Parque), apresentou menor abundância de indivíduos (menos da metade) e menor variabilidade genética que o Parque. Os resultados observados podem ser explicados de duas formas: (1) o Parque possui vários tipos diferentes de habitats na sua composição, sendo mais heterogêneo que o Guairacá, podendo assim apresentar mais microhabitats que podem manter uma maior variabilidade genética através de uma microestruturação da

população; e/ou (2) o Parque é uma Reserva Ecológica desde 1991, portanto é uma área que é efetivamente preservada e conservada, enquanto que no Guairacá existe uma grande atividade antrópica extrativista (erva-mate e pinhão), o que poderia afetar a variabilidade genética da população de *D. mediopunctata*.

Se este cenário evolutivo observado e discutido aqui estiver ocorrendo através dos anos e em outras populações, então, algumas questões e considerações sobre a estrutura metapopulacional de *D. mediopunctata* podem ser feitas: (1) A primeira questão é justamente como estão estruturadas estas populações nas Florestas de Araucárias, e como são as interações entre estas populações? E com populações de outros biomas? (2) Sobre a flutuação no tamanho populacional, qual é o verdadeiro papel das migrações na manutenção das estruturas microgeográficas? Como este processo realmente ocorre para não permitir que as populações permaneçam completamente isoladas, ficando cada vez mais diferentes e com menor variabilidade genética? (3) Qual é o nível de significância da variabilidade genética em cada uma das subpopulações, e o quanto ela corresponde ao total? E qual seria o impacto da suposta perda de uma dessas subpopulações na variabilidade genética total da população? (4) Em relação à questão anterior, a alteração dos ambientes naturais, e a extrema sensibilidade desta espécie para mudanças ambientais; qual seria o real risco de extinção das populações de *D. mediopunctata* nas Florestas de Araucárias, e qual o impacto disso para as populações de outros biomas?

Este estudo apresentou a variação isoenzimática de duas populações naturais de *D. mediopunctata* no tempo e no espaço. Foram discutidos os processos e eventos evolutivos que podem estar ocorrendo nestas populações, bem como algum conhecimento sobre sua estrutura genética intrapopulacional. Este estudo foi à primeira investigação sobre a variação isoenzimática em *D. mediopunctata*, e contribuiu para o atual conhecimento sobre a genética evolutiva desta espécie. Além disso,

nossos resultados corroboram a necessidade de novas políticas de conservação dos remanescentes florestais, tendo como objetivo a preservação da biodiversidade e a manutenção da variabilidade genética de populações naturais.

## Referências Bibliográficas

ANANINA, G.; PEIXOTO, A. A.; SOUZA, W. N.; KLACZKO, L. B. Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 691-694, 2002.

BARKER, J. S. F.; EAST, P. D.; WEIR, B. S. Temporal and microgeographic variation in allozyme frequencies in a natural population of *Drosophila buzzatii*. **Genetics**, v. 112, p. 577-611, 1986.

BARRETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In: Falk, D. A.; K. E. Holsinger (Eds) **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford University Press, New York, 1991. p. 3-30.

BUBLIY, O. A.; KALABUSHKIN, B. A.; IMASHEVA, A. G. Geographic variation of six allozyme loci in *Drosophila melanogaster*: An analysis of data from different continents. **Hereditas**, v. 130, p. 25-32, 1999.

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

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

CHARLESWORTH, D. The apparent selection on neutral marker loci in partially inbreeding populations. **Genetics Research**, v. 57, p. 159-175, 1991.

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

DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo**, v. 36, p. 7-72, 1943.

DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Local and seasonal variation in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **Journal of Animal Ecology**, v. 19, p. 1-14, 1950.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217-242, 1993.

FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees, II: Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for

- multiple fertilizations in stingless bees. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 47-59, 1991a.
- FALCÃO, T. M. M. A.; CONTEL, E. P. B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees, III: Electrophoretic data for ME, GPD, SOD and IDH. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 61-72, 1991b.
- FELSENSTEIN, J. The theoretical population genetics of variable selection and migration. **Annual Review of Genetics**, v. 10, p. 253-280, 1976.
- FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The Conservation of Plant Biodiversity**, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.
- FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetics Research**, v. 66, p. 95-107, 1995.
- FROTA-PESSOA, O. Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). **Arquivos do Museu Paranaense**, v. 10, p. 253-329, 1954.
- FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**. 3. ed. Sunderland, MA. Sinauer Associates. 1998.
- HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, v. 396, p. 41-49, 1998.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A. **Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics**. 1. ed. North-Holland, Amsterdam, 1976.
- HEDRICK, P. W.; GINEVAN, M. E.; EWING, E. P. Genetic polymorphism in heterogeneous environments. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 7, p. 1-32, 1976.
- HUBBY, J. L.; LEWONTIN, R. C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I: The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 577-594, 1966.
- KARLIN, S. Classifications of selection–migration structures and conditions for a protected polymorphism. **Evolutionary Biology**, v. 14, p. 61-204, 1982.
- KELLY, J. K.; NOOR, M. A. F. Speciation by reinforcement: A model derived from studies of *Drosophila*. **Genetics**, v. 143, p. 1485-1497, 1996.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The measurement of effective population number. **Evolution**, v. 17, p. 279-288, 1963.
- KIMURA, M.; WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, p. 561-576, 1964.
- KLACZKO, L. B. Population genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: Levine, L. (Eds) **Genetics of Natural Populations. The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky**. Columbia University Press, New York, 1995. p. 140-153.

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

KOJIMA, K.; SMOUSE, P.; YANG, S.; NAIR, P. S.; BRNCIC, D. Isozyme frequency patterns in *Drosophila Pavani* associated with geographical seasonal variables. **Genetics**, v. 72, p. 721-731, 1972.

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

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II: Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 595-609, 1966.

LONG, J. C. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's *F*-statistics. **Genetics**, v. 112, p. 629-647, 1986.

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

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biochemical Genetics**, v. 41, p. 219-233, 2003.

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

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

MILLER, M. P. **TFPGA – Tools For Population Genetic Analyses**, Version 1.3, 1997. (software para computador e manual está disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>).

MULLEY, J. C.; JAMES, J. W.; BARKER, J. S. F. Allozyme genotype–environment relationships in natural populations of *Drosophila buzzatii*. **Biochemical Genetics**, v. 17, p. 105-126, 1979.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

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

SAAVEDRA, C. C.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; NAPP, M.; VALENTE, V. L. S. A descriptive and analytical study of 4 Neotropical drosophilid communities. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 33, p. 62-74, 1995.

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

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

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

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

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 311-317, 1992.

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

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

WAPLES, R. S. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. **Genetics**, v. 121, p. 379-391, 1989.

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

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population: Variability Within and Among Natural Populations**. 4. ed. University Chicago press, Chicago, 1978.

## CAPÍTULO 4

---

MECANISMOS EVOLUTIVOS NA MANUTENÇÃO DA RAZÃO SEXUAL EM  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *DROSOPHILA MEDIOPUNCTATA* (DIPTERA:  
DROSOPHILIDAE)

## Resumo

A razão sexual tem sido descrita como o produto de progênies com desiguais proporções sexuais induzidas por desvio meiótico. Em *Drosophila mediopunctata*, os mecanismos cromossômicos responsáveis pela razão sexual estão descritos na literatura, embora muitas questões sobre a evolução e a manutenção deste fenômeno permaneçam desconhecidas. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a variação nas proporções de machos e fêmeas e correlacioná-las com variáveis ecológicas. As análises dos resultados indicaram que a seleção natural, influenciada por variáveis climáticas (principalmente precipitação e luminosidade), pode ser o principal fator que influencia a razão sexual nesta espécie. Assim, a seleção natural possivelmente seja o mecanismo evolutivo que mais afete o desvio meiótico, mantendo a razão sexual em um macho para duas fêmeas (1:2) nas populações naturais de *D. mediopunctata* estudadas.

Palavras-chave: Razão sexual; mecanismos evolutivos; *Drosophila mediopunctata*; populações naturais.

## Abstract

The sex-ratio trait has been described as the production of progenies with unequal sexual proportions induced by meiotic drive. In *Drosophila mediopunctata*, the chromosome mechanisms responsible for the sex-ratio have been described in literature, although many questions around the evolution and maintenance of sex-ratio system remain unclear. Thus, the aim of this work was to evaluate the variation in male and female proportions and to perform correlations with ecological variables. The results showed that natural selection influenced by climatic variables (mainly rain precipitation and luminosity) can be the main factor that induce the sex-ratio in this species. Thus, the natural selection is likely to be the evolutionary mechanism that is affecting meiotic drive, keeping the sex-ratio 1 male : 2 female in the analyzed *D. mediopunctata* natural populations.

Key words: Sex-ratio; evolutionary mechanisms; *Drosophila mediopunctata*; natural populations.

## Introdução

A razão sexual tem sido descrita como o produto de progênies com desiguais proporções sexuais induzidas por desvio meiótico, uma violação da primeira lei de Mendel na qual um heterozigoto produz proporções desiguais dos dois tipos gaméticos (Sandler e Novitsky 1957; Lyttle 1991). Em *Drosophila*, desvio meiótico do cromossomo X contra o Y (produzindo progênies tendendo a fêmeas) é conhecido em muitas espécies (Gershenson 1928; Jaenike 1996), incluindo *Drosophila mediopunctata* (Carvalho et al. 1997). Esta espécie em particular tem sido bem estudada por Carvalho e Klaczko (1992, 1993, 1994) e Carvalho et al. (1989, 1997, 1998), os quais descreveram os mecanismos cromossômicos do desvio meiótico responsáveis pela razão sexual nesta espécie.

No entanto, muitas questões sobre a evolução e a manutenção no sistema de razão sexual em *D. mediopunctata* permanecem desconhecidas. Devido à falta de informações ecológicas sobre este assunto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a razão sexual em duas populações naturais de *D. mediopunctata* sazonalmente durante um ano, e relacionar os dados obtidos com variações ambientais e populacionais. Com a análise dos resultados, pretende-se inferir as possíveis ações de processos evolutivos na manutenção da razão sexual nesta espécie.

## **Materiais e Métodos**

### **Coletas**

Os dados referentes às descrições das áreas estudadas, metodologia de coleta dos espécimes de *D. mediopunctata*, e avaliação das variáveis ambientais, estão descritas no Capítulo 3 (paginas 67 a 71).

### **Análises dos Dados**

As proporções de machos/fêmeas em cada estação do ano foram correlacionadas com o tamanho populacional amostral (abundância total de indivíduos amostrados), e com as variáveis climáticas (ambientais) avaliadas. Para estes cálculos foi utilizado o programa PAST (Paleontological Statistics – software para computador e manual está disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta a proporção de machos e fêmeas em cada estação do ano (os dados do verão não foram incluídos devido à observação de um único indivíduo coletado). Para as populações estudadas, esta proporção ficou aproximadamente em um macho para duas fêmeas (1:2 – 51:106). A maior proporção de machos (aproximadamente 40%) foi observada no outono, e a menor frequência (aproximadamente 20%) no inverno. Valores intermediários (aproximadamente 30%) foram observados na primavera.

Os resultados das correlações realizadas entre as proporções de machos/fêmeas com as variáveis climáticas, apresentaram valores estatisticamente significativos para precipitação e luminosidade (Tabela 1 e Figuras 1 e 2). Isto demonstra que as flutuações nas frequências de machos/fêmeas possivelmente sejam influenciadas por estes fatores ambientais. Assim, pode ser inferido que a seleção natural, influenciada por variáveis climáticas, principalmente precipitação e luminosidade, auxilia na manutenção da razão sexual em populações naturais de *D. mediopunctata*.

Outro argumento que corrobora com os resultados observados é a influencia de variáveis climáticas (incluindo principalmente as quatro variáveis analisadas aqui) sobre os recursos alimentares e locais reprodutivos das espécies do gênero *Drosophila*, influenciando assim, diretamente em sua distribuição, abundância e reprodução (Tidon 2006; Markow e O'Grady 2008).

**Tabela 1.** Freqüências de machos e fêmeas em duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* ao longo das estações. Correlações entre as proporções e as variáveis climáticas e o tamanho populacional amostral.

<b>Sazonalidade</b> <b>Sexo – Macho/Fêmea</b> <b>Variáveis Ecológicas</b>	Outono	Inverno	Primavera	Total	<b>Correlação</b>  <b>(p)</b>
	M / F	M / F	M / F	M / F	
Abundância Total	76	54	27	157	0,63
Abundância Relativa	31 / 45	12 / 42	8 / 19	51 / 106	–
Proporções (%)	40,8 /	22,2 /	29,6 /	32,5 /	–
Temperatura (°C)	14,5	14,1	19,1	–	0,97
Umidade Relativa (%)	71,4	90,5	92,8	–	0,32
Precipitação (mm)	0	12,9	9,5	–	0,09*
Luminosidade	304	117,4	214	–	0,09*

\* Nível de significância  $p < 0,1$

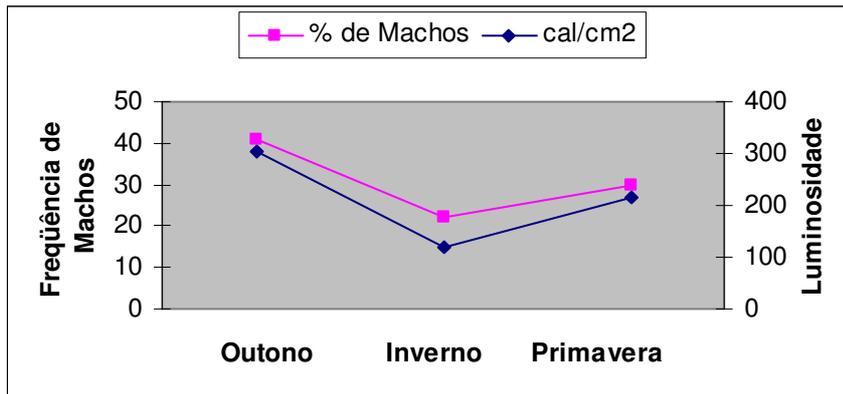


Figura 1. Correlação visual entre a proporção de machos coletados em duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* em cada estação, com a variação sazonal da luminosidade.

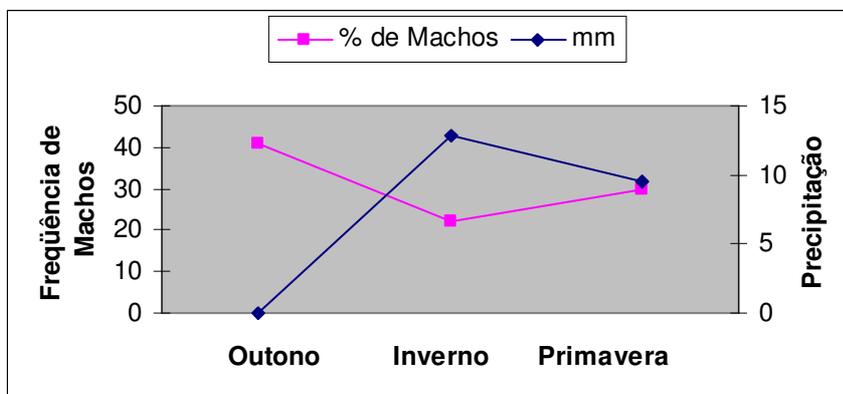


Figura 2. Correlação visual entre a proporção de machos coletados em duas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* em cada estação, com a variação sazonal da precipitação.

Além disso, populações naturais de *D. mediopunctata* estudadas por Carvalho et al. (1998) estão de acordo com o princípio de Fisher (1930), o qual presume que qualquer população com reprodução sexuada apresenta um equilíbrio energético no investimento de machos e fêmeas. Sendo que a evolução e a manutenção destas proporções sexuais são mantidas por seleção natural sobre regiões dos cromossomos sexuais (mais especificamente, alelos autossômicos em *D. mediopunctata*).

Por outro lado, a flutuação nas frequências de machos/fêmeas parece ser pouco influenciada pelas variações no tamanho populacional (Tabela 1). Isto pode indicar que processos evolutivos como deriva genética e endogamia, que são diretamente influenciados pelo tamanho das populações, não devem atuar fortemente na manutenção da razão sexual em populações naturais de *D. mediopunctata*.

As análises dos resultados indicaram que a seleção natural, influenciada por variáveis climáticas (principalmente precipitação e luminosidade), pode ser o principal fator que influencia a razão sexual em *D. mediopunctata*. Assim, a seleção natural possivelmente deve ser o mecanismo evolutivo que mais afete o desvio meiótico, mantendo a razão sexual em um macho para duas fêmeas (1:2) nas populações naturais de *D. mediopunctata* estudadas.

## Referências Bibliográficas

- CARVALHO, A. B.; KLACZKO, L. B. Age and sex-ratio expression in *Drosophila mediopunctata*. **Genetica**, v. 87, p. 107-111, 1992.
- CARVALHO, A. B.; KLACZKO, L. B. Autosomal suppressors of sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 71, p. 546-551, 1993.
- CARVALHO, A. B.; KLACZKO, L. B. Y-linked suppressors of the sex-ratio trait in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 73, p. 573-579, 1994.
- CARVALHO, A. B.; PEIXOTO, A. A.; KLACZKO, L. B. Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 62, p. 425-428, 1989.
- CARVALHO, A. B.; VAZ, S. C.; KLACZKO, L. B. Polymorphism for Y-linked suppressors of sex-ratio in two natural populations of *Drosophila mediopunctata*. **Genetics**, v. 146, p. 891-902, 1997.
- CARVALHO, A. B.; SAMPAIO, M. C.; VARANDAS, F. R.; KLACZKO, L. B. An Experimental Demonstration of Fisher's Principle: Evolution of Sexual Proportion by Natural Selection. **Genetics**, v. 148, p. 719-731, 1998.
- FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. Claredon Press, Oxford, 1930.
- GERSHENSON, S. A new sex-ratio abnormality in *D. obscura*. **Genetics**, v. 13, p. 488-507, 1928.
- JAENIKE, J. Sex ratio meiotic drive in the *Drosophila pinaria* group. **American Naturalist**, v. 148, p. 237-254, 1996.
- LYTTLE, T. W. Segregation distorters. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 511-557, 1991.
- MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Reproductive ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 22, p. 747-759, 2008.
- SANDLER, L.; NOVITSKY, E. Meiotic drive as an evolutionary force. **American Naturalist**, v. 91, p. 105-110, 1957.
- TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, p. 233-247, 2006.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Efetivas abordagens sobre a conservação dos habitats naturais, tendo como objetivos a preservação da biodiversidade e da variabilidade genética, bem como a manutenção dos ecossistemas e de suas populações naturais, através das relações ecológicas (bióticas e abióticas) e processos evolutivos, necessitam de análises conjuntas entre dados ecológicos e genéticos. Com a interação entre estas duas abordagens, conclusões mais precisas sobre a história natural dos organismos podem ser observadas, assim como a influência da qualidade ambiental no status das comunidades e populações naturais.

Este estudo avaliou a estrutura temporal e espacial das comunidades de *Drosophila* em fragmentos de Floresta de Araucária, e a variação isoenzimática de duas populações naturais de *D. mediopunctata*. A composição e a diversidade destas comunidades, bem como a frequência de classes de espécies bioindicadoras da qualidade ambiental, foram relacionadas com a composição, qualidade e estado de conservação destes fragmentos. Os processos e eventos evolutivos que podem estar ocorrendo nas populações de *D. mediopunctata*, e sua estrutura genética populacional, também foram avaliados.

Os resultados das análises espaciais indicaram que a população natural de *D. mediopunctata* no Parque, apresentou maior variabilidade genética que a do Guairacá. A diversidade, riqueza e abundância das comunidades de *Drosophila* também foram maior no Parque. Mas quando a qualidade da comunidade foi avaliada, o Guairacá apresentou em média maiores proporções de espécies endêmicas e não associadas a ambientes alterados. Entretanto, na comparação entre os anos de coleta, o Guairacá apresentou intensas reduções nestas proporções, indicando uma acentuada queda na qualidade de seu habitat. Para o Parque, esta redução foi

moderada, indicando que a estrutura da comunidade de *Drosophila* foi influenciada por ações antrópicas externas ao fragmento.

Os resultados das análises temporais indicaram que os processos e eventos evolutivos observados para *D. mediopunctata* foram influenciados pela flutuação no tamanho das populações naturais, e por variações nos fatores ambientais. Estas flutuações populacionais também ocorreram na maioria das espécies amostradas para a comunidade de *Drosophila*, podendo assim indicar um padrão semelhante dos processos e eventos evolutivos para estas espécies. Se a variabilidade genética das populações de *Drosophila* nestas áreas estiverem sendo realmente afetadas pela sazonalidade (climática, populacional), os efeitos da degradação ambiental podem intensificar ainda mais a perda da variabilidade genética em períodos de redução populacional. Estas implicações elevariam o risco de extinção em populações locais e reduziriam a biodiversidade dos fragmentos, bem como a diminuição na qualidade ambiental afetaria as imigrações de espécies vindas de outros biomas durante períodos de estresse ambiental.

Além disso, os resultados também indicaram que *D. mediopunctata* é um bom modelo para estudos de conservação, abordando a qualidade ambiental de fragmentos florestais. E que estudos conjuntos de dados isoenzimáticos, seqüências de DNA e morfologia, são possíveis e podem apresentar resultados interessantes. E ainda, que a seleção natural, influenciada por variáveis climáticas, possivelmente deve ser o principal fator a afetar a razão sexual nesta espécie.

Assim, nossos resultados corroboram a necessidade de novas políticas de conservação dos remanescentes florestais, tendo como objetivos a efetiva manutenção das comunidades biológicas e preservação da biodiversidade, bem como a manutenção da variabilidade genética nas populações naturais.

## ANEXOS

**Anexo 1** – Variáveis abióticas obtidas para o período de cada coleta sazonal durante os anos de 2006 e 2008. Dados fornecidos pela Estação Meteorológica do Campus CEDETEG – UNICENTRO.

<b>Estação</b>	<b>Data</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Precipitação (mm)</b>	<b>Luminosidade (cal/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>2006</b>					
<b>Verão</b>	22/02/2006	20,0	72,8	68,8	430
	23/02/2006	20,4	82,5	0	330
	24/02/2006	19,3	89,5	0,2	186
	25/02/2006	15,4	79,4	0	447
	26/02/2006	16,8	81,2	0	430
	<b>Média</b>		<b>18,38</b>	<b>81,08</b>	<b>13,80</b>
<b>Outono</b>	17/05/2006	12,9	70,7	0	282
	18/05/2006	14,0	63,9	0	299
	19/05/2006	14,3	65,4	0	158
	20/05/2006	13,6	96,6	1,8	61
	21/05/2006	14,1	85,1	11,6	168
	<b>Média</b>		<b>13,78</b>	<b>76,34</b>	<b>2,68</b>
<b>Inverno</b>	09/08/2006	18,1	47,7	0	319
	10/08/2006	19,3	57,6	0	234
	11/08/2006	19,9	49,1	0	322
	12/08/2006	20,7	49,5	0	304
	13/08/2006	21,1	53,4	0	297
	<b>Média</b>		<b>19,82</b>	<b>51,46</b>	<b>0</b>
<b>Primavera</b>	01/12/2006	19,0	68,4	0	591
	02/12/2006	20,5	63,2	0	585
	03/12/2006	22,6	69,5	0	464
	04/12/2006	22,8	82,9	0	356
	05/12/2006	22,6	73,5	0,4	357
	<b>Média</b>		<b>21,50</b>	<b>71,50</b>	<b>0,08</b>
<b>2008</b>					
<b>Verão</b>	15/02/2008	20,4	79,0	0	337
	16/02/2008	20,6	74,7	7,0	429
	17/02/2008	21,6	75,5	0	401
	18/02/2008	21,4	78,9	0	511
	19/02/2008	21,8	80,0	7,0	506
	<b>Média</b>		<b>21,20</b>	<b>77,60</b>	<b>2,80</b>

Continua

Continuação

<b>Outono</b>	15/05/2008	11,4	78,6	0	338
	16/05/2008	13,1	69,0	0	277
	17/05/2008	15,2	66,1	0	314
	18/05/2008	16,1	71,4	0	300
	19/05/2008	16,8	71,9	0	291
	<b>Média</b>	<b>14,50</b>	<b>71,40</b>	<b>0</b>	<b>304,0</b>
<b>Inverno</b>	05/08/2008	13,7	91,3	2,2	130
	06/08/2008	16,3	86,9	9,4	155
	07/08/2008	15,2	94,9	19,8	72
	08/08/2008	13,6	85,2	24,2	181
	09/08/2008	11,9	94,1	9,0	49
	<b>Média</b>	<b>14,10</b>	<b>90,50</b>	<b>12,90</b>	<b>117,4</b>
<b>Primavera</b>	26/10/2008	20,6	88,3	0,4	240
	27/10/2008	19,9	94,2	5,8	190
	28/10/2008	20,0	93,6	0	250
	29/10/2008	17,6	95,0	12,4	133
	30/10/2008	17,4	92,7	29,0	257
	<b>Média</b>	<b>19,10</b>	<b>92,80</b>	<b>9,50</b>	<b>214,0</b>

**Anexo 2** – Números absolutos das espécies de *Drosophila* coletadas no fragmento florestal do Parque Municipal das Araucárias (Parque) sazonalmente ao longo dos anos de 2006 e 2008.

Espécie	2006				2008			
	Ver	Out	Inv	Pri	Ver	Out	Inv	Pri
<i>D. busckii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>D. annulimana</i>	3	0	0	0	0	0	0	2
<i>D. arassari</i>	0	1	0	0	0	3	8	0
<i>D. bromelioides</i>	0	0	2	0	5	0	0	0
<i>D. calloptera</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>D. cardini</i>	0	0	0	1	16	18	0	11
<i>D. neocardini</i>	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. polymorpha</i>	10	2	0	83	117	14	10	17
<i>D. coffeata</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>D. fuscolineata</i>	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>D. camargoi</i>	0	1	0	1	2	0	0	0
<i>D. dreyfusi</i>	0	7	0	0	0	0	0	0
<i>D. griseolineata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>D. guaraja</i>	1	0	0	1	0	18	1	0
<i>D. guaru</i>	0	1	0	2	1	2	6	0
<i>D. maculifrons</i>	6	5	0	0	1	9	0	3
<i>D. ornatifrons</i>	2	2	0	0	1	0	20	1
<i>D. immigrans</i>	0	3	0	0	2	0	2	6
<i>D. mesophragmatica</i>	0	0	0	0	8	0	0	0
<i>D. pallidipennis</i>	0	1	0	7	0	1	2	0
<i>D. peruviana</i>	0	0	0	9	0	0	0	0
<i>D. fasciolooides</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>D. hydei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>D. moju</i>	0	1	0	0	0	1	1	0
<i>D. onca</i>	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>D. addisoni</i>	0	5	0	0	0	0	4	0
<i>D. angustibucca</i>	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>D. bandeirantorum</i>	0	6	0	4	3	2	1	2
<i>D. bifilum</i>	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>D. bipunctata</i>	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>D. mediocris</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. medioimprensa</i>	0	4	2	0	0	0	0	0
<i>D. mediopicta</i>	0	4	0	0	12	9	0	5

Continua

Continuação

<i>D. mediopunctata</i>	0	3	0	0	0	18	39	12
<i>D. mediostriata</i>	7	3	1	1	0	0	0	0
<i>D. morena</i>	0	3	0	0	0	0	2	0
<i>D. nigricinta</i>	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>D. paraguayensis</i>	0	16	0	0	0	3	0	0
<i>D. platitarsus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. prosimilis</i>	0	7	0	0	0	2	0	1
<i>D. pruinifacies</i>	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>D. caponei</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>D. tuchaua</i>	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>D. latifasciaeformis</i>	0	1	0	0	4	0	0	0
<i>D. ananassae</i>	0	0	2	1	0	0	0	0
<i>D. montium</i>	2	7	4	39	686	0	6	0
<i>D. simulans</i>	20	28	0	4	30	0	0	0
<i>D. sturtevanti</i>	6	0	1	0	6	0	3	0
<i>D. capricorni</i>	0	8	0	4	4	1	0	0
<i>D. willistoni*</i>	110	31	3	8	45	158	16	28
<b>Abundância Total (M)</b>	170	171	18	165	943	262	124	90
<b>Número de Espécies (S)</b>	11	33	10	14	17	18	17	13

Ver, Verão; Out, Outono; Inv, Inverno; Pri, Primavera.

\* e \*\*, espécies crípticas ou não que foram identificadas somente até o nível de subgrupo\* ou grupo\*\*.

**Anexo 3** – Números absolutos das espécies de *Drosophila* coletadas no fragmento florestal da Fazenda Brandalise (Guairacá) sazonalmente ao longo dos anos de 2006 e 2008.

Espécie	2006				2008			
	Ver	Out	Inv	Pri	Ver	Out	Inv	Pri
<i>D. busckii</i>	1	0	2	0	0	1	0	0
<i>D. annulimana</i>	5	0	0	0	0	0	0	3
<i>D. arassari</i>	0	1	0	0	0	2	3	1
<i>D. bromelioides</i>	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>D. cardini</i>	1	0	0	0	7	8	0	5
<i>D. neocardini</i>	22	0	0	0	1	0	0	0
<i>D. polymorpha</i>	33	1	0	3	57	5	1	20
<i>D. fuscolineata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>D. dreyfusi</i>	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>D. griseolineata</i>	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>D. guaraja</i>	3	3	1	0	1	0	1	0
<i>D. guaru</i>	1	0	1	0	0	1	16	3
<i>D. maculifrons</i>	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. ornatifrons</i>	2	2	2	0	0	0	6	0
<i>D. immigrans</i>	0	1	0	1	1	2	0	1
<i>D. mesophragmatica</i>	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>D. pallidipennis</i>	0	5	0	1	1	0	0	0
<i>D. hydei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. moju</i>	0	0	0	0	2	2	0	0
<i>D. repleta*</i>	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. addisoni</i>	0	2	0	0	0	0	3	0
<i>D. bandeirantum</i>	1	1	3	1	0	0	1	1
<i>D. bifilum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. divisa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>D. medioimpressa</i>	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>D. mediopicta</i>	0	3	0	0	0	2	0	2
<i>D. mediopunctata</i>	0	3	0	0	0	36	13	9
<i>D. mediotriata</i>	7	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. morena</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>D. paraguayensis</i>	0	8	0	0	0	1	0	0
<i>D. prosimilis</i>	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>D. pruinafacies</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. trifilum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. caponei</i>	0	0	0	1	0	0	0	0

Continua

Continuação

<i>D. impudica</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. tuchaua</i>	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>D. latifasciaeformis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>D. montium</i>	37	0	1	1	82	0	0	0
<i>D. simulans</i>	8	1	0	0	1	0	0	0
<i>D. prosaltans</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>D. saltans**</i>	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. sturtevanti</i>	2	0	0	2	2	0	0	0
<i>D. bocainensis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>D. capricorni</i>	0	3	1	2	1	1	0	4
<i>D. willistoni*</i>	926	18	1	0	1	59	2	2
<b>Abundância Total (M)</b>	1062	65	16	12	160	123	48	52
<b>Número de Espécies (S)</b>	19	22	11	8	14	15	11	12

Ver, Verão; Out, Outono; Inv, Inverno; Pri, Primavera.

\* e \*\*, espécies crípticas ou não que foram identificadas somente até o nível de subgrupo\* ou grupo\*\*.