



**Universidade Federal de Pernambuco**

**Centro de Biociências**

**Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Zilpa das Graças Silva de Melo**

**Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta:  
Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis***

**Recife**

**2018**

**Zilpa das Graças Silva de Melo**

**Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

**Orientadora:** Profa. Dra. Rita de Cássia de Moura - UPE

**Coorientadora:** Profa. Dra. Claudia Rohde - UFPE

**Recife**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Melo, Zilpa das Graças Silva de**

**Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis* / Zilpa das Graças Silva de Melo - 2018.**

**211 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Rita de Cássia de Moura**

**Coorientadora: Claudia Rohde**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, Recife, 2018.**

**Inclui referências e anexos.**

**1. Díptero 2. Marcadores genéticos 3. Florestas I. Moura, Rita de Cássia (orient.) II. Rohde, Claudia (coorient.) III. Título**

595.77

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018- 058

**ZILPA DAS GRAÇAS SILVA DE MELO**

**Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Biologia Molecular, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

**Aprovado em: 29/08/2017**

**BANCA AVALIADORA**

---

Dra. Rita de Cássia de Moura  
(Universidade de Pernambuco - UPE)

---

Dr. José Eduardo Garcia  
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

---

Dr. Artur Maia Wanderley  
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

---

Dra. Vilma Loreto da Silva  
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

---

Dra. Anna Carolina S. Almeida  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)

**À minha mãe Graça, e  
meu pai Pedro (*in memoriam*), meus exemplos.**

## Agradecimentos

À Deus, fonte de vida, razão de tudo, minha maior inspiração.

À minha família, em especial à minha mãe, uma mulher guerreira, 'de fibra', que sempre cuidou de mim, me apoiou em todas as minhas escolhas, me aconselhando e ajudando em tudo.

Ao meu pai (*in memoriam*), homem de grande superação, que perdi no primeiro ano do doutorado. Foram dias muito difíceis para mim e minha família.

Ao meu esposo Cristian pelo amor, companheirismo, apoio e barras de chocolates.

À minha filha Giovanna Melissa, o presente mais lindo que a vida me deu! Amor sublime e inexplicável.

À minha orientadora Dra. Rita Moura, por ter aceitado me orientar, pela paciência, pelos ensinamentos, por ter persistido em me orientar mesmo quando eu falei da minha gravidez no início do doutorado e ainda ter permitido eu assumir o concurso da Compesa, no segundo ano do doutorado. Sua postura ética e profissional me motivou a continuar na luta. Minha eterna gratidão por tudo!

À minha co-orientadora Dra. Claudia Rohde, por ter aceitado me orientar desde o mestrado. Por ter me apresentado o universo das drosófilas e por tantos ensinamentos, tanto científicos quanto humanísticos! Foi uma experiência incrível! Não posso deixar de agradecer por ter sido minha motorista durante todos esses anos (risos). Foram muitas caronas e reuniões científicas a bordo do seu 'drosomóvel'. Suas habilidades e coragem me inspiram. Minha eterna gratidão por tudo!

Aos meus colaboradores e co-orientadores por consideração, Dra. Ana Garcia e Dr. Martín Montes, pelos ensinamentos, e pelos 'choques de realidade', que foram importantes para me impulsionar a continuar fazendo um trabalho bem feito.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Genética do CAV- UFPE, vocês foram de extrema importância para a realização deste trabalho de doutorado. O apoio de vocês e os momentos de descontração foram fundamentais para superar meus momentos de pessimismo e dificuldade. Foi um privilégio poder conviver, aprender e fazer amizade com excelentes pessoas: Jorge, Rita, Gleyse, André, Anadeje, Érima, Danubia, Ícaro, Samuel, Jéssica, Phelipe, Rafaela, e outros que passaram pelo laboratório. Às minhas queridas ICs: Jaqueline, Robervânia, Ana Patrícia e Kelly, que embarcaram comigo nesta grande aventura científica. A todos que me ajudaram a preparar meios e repicar aquela estante repleta de linhagens de *Drosophila willistoni*. Eu não teria conseguido sem a ajuda vocês.

Às minhas amigas e colaboradoras: Dra. Geórgia Oliveira, a 'doutora mor' do laboratório (risos) e Msc. Paloma da Silva, 'Palometch a poderosa' (risos). Meninas, foi um prazer enorme trabalhar com vocês. Sou grata pela parceria e amizade. Geo, você para mim foi uma co-orientadora nos temas ecológicos.

Aos colegas do laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos (LBGI) da UPE Ígor, Crislaine e Adriana, foi um prazer ter trabalhado com vocês também. Em especial, Celso que muito me ajudou com os programas de análises de dados moleculares. Sou grata também a Geyner pelos ensinamentos e críticas construtivas ao trabalho, sua ajuda e parceria foram fundamentais.

À minha sogra Cilene por ter cuidado muitas vezes da minha princesa, enquanto eu estava realizando meus experimentos e aulas.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao qual tenho muito orgulho em ser aluna.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e aos professores, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética pelos grupos de estudo e leitura de artigos.

Aos meus amigos que fiz ao longo da minha vida, em especial: Késia, Midiã, Fabíola, Jeneffer, Michele, Stella e Sheila, que me deram incentivo, e compreenderam minha ausência em alguns 'encontrinhos'.

E por fim, à FACEPE pela bolsa de pesquisa recebida em parte deste doutorado, e aos demais Órgãos de Fomento CNPq, CAPES e PROPESQ-UFPE.

**“A ciência é uma ferramenta absolutamente essencial para qualquer sociedade que tenha a esperança de sobreviver bem, neste e nos próximos séculos”**

**Carl Sagan**

## Resumo

Biodiversidade tem sido um tema recorrente e envolve o estudo da diversidade genética intraespecífica e os processos associados à origem, manutenção e distribuição da diversidade. *Drosophila willistoni* é uma das espécies mais abundantes da família Drosophilidae na região neotropical. Neste trabalho foi caracterizada a diversidade genética desta espécie em diferentes biomas do Brasil através de marcadores moleculares, bem como sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis*. Após coleta e identificação taxonômica da espécie, foram estabelecidos cultivos de linhagens isofêmeas durante todo o trabalho. Aqui estão apresentados: i) resultados com o marcador *ISSR* em 156 linhagens, que indicaram significativa diversidade genética, baixa diferenciação populacional e elevado fluxo gênico; ii) caracterização da diversidade genética dos genes mitocondriais *COI* (114 indivíduos) e *COII* (83) e do gene nuclear *HCF* (28 indivíduos), que indicaram eventos recentes de expansão populacional nas amostras do Brasil; iii) resultados da presença do endossimbionte *W. pipientis* em 85 indivíduos de nove populações de *D. willistoni* e a ubiquidade da variante *wWil* em 50 amostras sequenciadas; iv) diversidade ecológica de espécies de drosofilídeos nos fragmentos de floresta úmida estudados. O conjunto dos resultados a partir das linhagens investigadas possibilitou compreender melhor a diversidade genética de *D. willistoni*, cujas populações naturais não apresentam sinais de estruturação genética, apesar da distância geográfica entre as amostras e das diferenças entre os ambientes estudados. Nossos dados reforçam que *D. willistoni* apresenta elevada diversidade genética, possui uma ampla associação com *W. pipientis* e ainda é uma das espécies de Drosophilidae mais abundante em florestas tropicais do Brasil.

**Palavras-chave:** Marcador *ISSR*. Gene mitocondrial. Gene *Host Cell Factor*. *Wolbachia pipientis*.

## Abstract

Biodiversity has been a recurring theme and involves the study of intraspecific genetic diversity and processes associated with the origin, maintenance and distribution of diversity. *Drosophila willistoni* is one of the most abundant species of the family Drosophilidae in the neotropical region. In this work we characterized the genetic diversity of the species in different biomes of Brazil through molecular markers, and its infection by the endosymbionte *Wolbachia pipientis*. After collection and taxonomic identification of the species, cultures of isofines lineages were established throughout the work. In this thesis are presented: i) results with the ISSR marker in 156 lines, which indicated significant genetic diversity, low population differentiation and high gene flow; ii) characterization of the genetic diversity of the mitochondrial *COI* (114 individuals) and *COII* (83) and nuclear *HCF* genes (28 individuals), which indicated recent population expansion events in the Brazilian samples; iii) results of presence of *W. pipientis* endosymbionts in 85 individuals from nine *D. willistoni* populations and the ubiquity of the *wWil* variant in 50 sequenced samples; iv) ecological diversity of drosophilídeos species in the fragments of rainforest studied. The set of results from the lines investigated allowed a better understanding of the genetic diversity of *D. willistoni*, whose natural populations showed no signs of genetic structuring, despite the geographic distance between the samples and the differences between the studied environments. Our data reinforce that *D. willistoni* presents high genetic diversity, has an extensive association with *W. pipientis* and is still one of the most abundant species of Drosophilidae in tropical forests in Brazil.

**Key-words:** ISSR marker. mitochondrial gene. *Host Cell Factor* gene. *Wolbachia pipientis*.

## Lista de Ilustrações

REVISÃO DA LITERATURA	Página
<b>Figura 1.</b> Mapa do Brasil com biomas representados em diferentes cores. (Fonte: IBGE, 2004)	24
<b>Figura 2.</b> Mapa do desmatamento da floresta Amazônica nos Estados brasileiros. (Fonte: INPE, 2013).	24
<b>Figura 3.</b> Mapa parcial do Brasil, com a localização das sub-regiões biogeográficas da Floresta Atlântica ( <i>Brejos Nordestinos, Pernambuco, Diamantina, Bahia e Serra do Mar</i> ), caracterizadas pela presença de espécies endêmicas. As sub-regiões de transição são denominadas <i>São Francisco, Florestas de Interior e Florestas de Araucária</i> . (Fonte: Galindo-Leal e Câmara, 2005).	27
<b>Figura 4.</b> Mapa parcial do Brasil com indicação dos remanescentes da Floresta Atlântica (2013-2014). As áreas em verde escuro no mapa, corresponde a remanescentes florestais; em verde claro, área natural não florestal; em cor laranja, área de Mangue; em marrom, área de Restinga; em vermelho, áreas de desmatamento entre 2013 e 2014; em cor-de-rosa, área urbana; em cor salmão, área que obedece a lei da Floresta Atlântica 11.428/06 (SOS Mata Atlântica, 2015).	28
<b>Figura 5.</b> Mapa do Brasil com destaque para o Cerrado (cor verde oliva) e áreas de transição (demais cores) (Fonte: IBGE, 1997).	30
<b>Figura 6.</b> Imagem do hipândrio da genitália de um representante macho de <i>Drosophila willistoni</i> . (Fonte: neste estudo).	35
<b>Figura 7.</b> Imagens da morfologia externa de uma fêmea (à esquerda) e um macho (à direita) de <i>Drosophila willistoni</i> . Fonte: (Flybase, 2016).	36
<b>Figura 8.</b> Mapa da distribuição neotropical de cada uma das seis espécies do subgrupo <i>willistoni</i> (linhas e símbolos coloridos). A área de distribuição de <i>Drosophila willistoni</i> sobrepõe a das demais espécies crípticas. (Fonte: Zanini <i>et al.</i> , 2015).	37
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Figure 1.</b> Highlight Brazil map, with indications of states and biomes sampled for <i>Drosophila willistoni</i> (red rectangles).	85
<b>Figure 2.</b> Samples of ISSR bands of <i>Drosophila willistoni</i> with primers (CT) <sub>8</sub> RC (columns 1-35). DNA size standards (LAD) are placed on both margins of the gels, and the sizes in base pairs are indicated on the left. BJC (Ecologic Park João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco state), PDI (State Park of Dois Irmãos, Pernambuco state), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Paraíba state).	86

**Figure S1.** Evanno's delta K graph, obtained for each K value in eight populations of *Drosophila willistoni* for ISSR data. The highest peak was K=2 and the lowest was K=7. **88**

**Figure S2.** Ancestry of each *Drosophila willistoni* population (vertical bar) in either of the two groups plotted by the software Structure. Each vertical bar represents 16-20 of 156 individuals analyzed for each population. **88**

**Figure S3.** Fenogram of cluster of individuals (represented by letters and number) of each population of *Drosophila willistoni* based in ISSR data, using the Neighbor-Joining method and *p*-distance model, with 103 replicates of bootstrap. **89**

## CAPÍTULO II

**Figura 1.** Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil. As áreas coloridas no mapa, correspondem aos biomas brasileiros. **106**

**Figura 2.** Filograma de sequências parciais do gene mitochondrial *Citocromo c oxidase I* de *Drosophila willistoni*. **107**

**Figura 3.** Filograma de sequências parciais do gene mitochondrial *Citocromo c oxidase II* de *Drosophila willistoni*. **108**

**Figura 4.** Filograma de sequências parciais do gene nuclear (*Host Cell Factor*) de *Drosophila willistoni*. **109**

**Figura 5.** A. Rede de haplótipos para o gene mitocondrial *Citocromo c oxidase I*; B. Rede de haplótipos para o gene *Citocromo c oxidase II* (B); C. Rede de haplótipos para o gene nuclear *Host Cell Factor*. Os círculos representam diferentes haplótipos para populações de *Drosophila willistoni*, e os diâmetros são proporcionais às suas frequências. **110**

**Figura 6.** Representação gráfica da estrutura populacional, e valores delta K para determinar o número ideal de grupos genéticos presentes em *Drosophila willistoni* de nove locais do Brasil. Foram analisados os genes mitocondriais *COI* (A) e *COII* (B) e o gene nuclear *HCF* (C) através do programa Structure versão 2.3.4, assumindo K=2 e utilizando o método Evanno implementado no programa STRUCTURE HARVESTER. **111**

**Figura 7.** Distribuição *mismatch* das sequências de DNA mitocondrial, gene *COI* (A), *COII* (B) e DNA nuclear, gene *HCF* (C), observada e esperada para populações de *Drosophila willistoni* de nove locais do Brasil. A linha tracejada representa a frequência das diferenças de bases par-a-par e a linha continua mostra os valores esperados pelo modelo de expansão demográfica. **112**

## CAPÍTULO III

**Figure 1.** Agarose 1% gel containing PCR products after amplification of the *wsp* gene (600 bp) in *Drosophila willistoni* isostrains (1 to 6). C<sup>+</sup>, positive control **128**

(*D. willistoni* GdH4); C<sup>-</sup>, negative control (ultrapure water); M, DNA ladder, 1 kb (Invitrogen).

**Figura 2.** Agarose 1% gel containing PCR products after amplification of the *vntr* (~387 bp) in *Drosophila willistoni* isostrains (1 to 4). M, DNA ladder, 1 kb (Invitrogen). **128**

**Figure 3.** Partial map of the Americas showing the locations with positive records of infection with *Wolbachia pipientis* (*wNil*) in *Drosophila willistoni* (32). The green box indicates the natural environments surveyed. The pie charts on the right show the rates of infection with *W. pipientis* (20% to 100%, in blue) in isostrains collected in each site in the present study (1 to 9). **129**

**Figure 4.** Phylogram of the *wsp* gene of *Wolbachia pipientis* *Drosophila willistoni* (*Dwil*) samples analyzed in the present study, and the sequences obtained from Miller and Riegler (2006) (AY6202018.1 to AY6202029.1) and Mateos et al. (2006) (DQ412097.1). **130**

#### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Mapa do Brasil com a indicação dos diferentes biomas que ocorrem no país. Os locais de amostragens de drosofilídeos nas florestas tropicais úmidas estão indicados sobre o mapa. 1. Marituba, Belém, Pará (BEL), 2. Reserva Biológica de Guaribas, Paraíba (GUA), 3. Parque Estadual Dois Irmãos, Pernambuco (PDI), 4. Parque Ecológico João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco (BJC), 5. Reserva Biológica de Saltinho, Pernambuco (SAL), 6. Jiquiriçá, Bahia (JEQ). **149**

**Figura 2.** Estimadores de riqueza ACE, ICE, Chao 1, Chao 2, Jack 1 e Jack 2 para as seis áreas de florestas tropicais úmidas investigadas. Os códigos das localidades são os mesmos indicados na Tabela 1. **150**

**Figura 3.** Dendogramas de similaridade construídos com os índices de Jaccard (Cophcorr = 0,8804) (A) e (B) Morisita (Cophcorr = 0,7341) para as amostragens de drosofilídeos em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil. Os códigos das localidades são os mesmos indicados na Tabela 1. **150**

**Figura 4.** Curvas de rarefação de espécies baseadas na riqueza e abundância da assembleia de drosofilídeos construídas para as amostragens realizadas em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1. **151**

**Figura 5.** Curva de acúmulo de espécies (linha contínua) e intervalo de 95% de confiança (linhas tracejadas) para as amostragens de drosofilídeos realizadas em diferentes florestas úmidas no Brasil. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1. **151**

**Figura 6.** Abundância relativa de drosofilídeos nativos da região neotropical e exóticos nas seis áreas de florestas úmidas investigadas. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1.

## Lista de Tabelas

CAPÍTULO I	Página
<b>Table 1.</b> Nucleotide sequence of ISSR primers and specific annealing temperature, used for natural Brazilian populations of <i>Drosophila willistoni</i> .	81
<b>Table 2.</b> Population diversity produced by six ISSR primers (Table 1) in <i>Drosophila willistoni</i> populations.	82
<b>Table 3.</b> (A) Nei's genetic identity between each population pair based on ISSR markers; (B) geographic distances (km) between each population pair (above diagonal) and coefficient of gene differentiation ( $F_{ST}$ ) (below diagonal); (C) the estimated gene flow ( $Nm$ ) (above diagonal) for all pairwise comparisons between populations of <i>Drosophila willistoni</i> .	83
<b>Table 4.</b> Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for ISSR in <i>Drosophila willistoni</i> .	84
<b>Table 5.</b> Index of neutrality and populational expansion of <i>Drosophila willistoni</i> sampled in Brazilian biomes.	84
<b>Table S1.</b> Polymorphic index tested as criterion to select primers ISSR in this study. The best indices were the first six, with the highest values of PIC, MI and RP.	86
<b>Table S2.</b> Population parameters estimated by the HICKORY for the $f=0$ model to 120 ISSR bands obtained in <i>Drosophila willistoni</i> .	87
CAPÍTULO II	
<b>Tabela 1.</b> Número de linhagens analisadas de <i>Drosophila willistoni</i> , de nove localidades do Brasil, para cada gene mitocondrial ( <i>Citocromo oxidase I</i> , <i>Citocromo oxidase II</i> e nuclear ( <i>Host Cell Factor</i> )).	105
<b>Tabela 2.</b> Variabilidade genética dos genes mitocondriais ( <i>Citocromo c oxidase I</i> e <i>Citocromo c oxidase II</i> ) e do gene nuclear ( <i>Host Cell Factor</i> ) em <i>Drosophila willistoni</i> .	105
<b>Tabela 3.</b> Valores dos testes de neutralidade $D$ de Tajima e $F_s$ de Fu para os genes mitocondriais ( <i>Citocromo c oxidase I</i> e <i>Citocromo c oxidase II</i> ) e gene nuclear ( <i>Host Cell Factor</i> ) de <i>Drosophila willistoni</i> .	105
<b>Tabela 4.</b> AMOVA para os para os genes mitocondriais ( <i>Citocromo c oxidase I</i> e <i>Citocromo c oxidase II</i> ) e gene nuclear ( <i>Host Cell Factor</i> ) de <i>Drosophila willistoni</i> .	106

### **CAPÍTULO III**

<b>Table 1-</b> Origin of the Brazilian samples of <i>Drosophila willistoni</i> investigated for the occurrence of <i>Wolbachia pipientis</i> infection.	<b>127</b>
--	------------

### **CAPÍTULO IV**

<b>Tabela 1.</b> Localidades, códigos, coordenadas geográficas, áreas florestais e anos das amostragens de drosofilídeos nas florestas úmidas investigadas no Brasil.	<b>147</b>
---	------------

<b>Tabela 2.</b> Abundância e índices de diversidade para os drosofilídeos amostrados em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil.	<b>147</b>
--	------------

<b>Tabela 3.</b> Abundância relativa de drosofilídeos exóticos na região Neotropical em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1.	<b>149</b>
---	------------

## Lista de Abreviaturas

<b>Item</b>	<b>Definição</b>
AMOVA	Análise Molecular da Variância
BJC	Parque Municipal João Vasconcelos Sobrinho
BRA	Reserva Biológica IBGE
<i>COI</i>	<i>Gene Citocromo c oxidase subunidade I</i>
<i>COII</i>	<i>Gene Citocromo c oxidase subunidade II</i>
<i>D</i>	Índice de Tajima
<i>F<sub>s</sub></i>	Índice de Fu
GUA	Reserva Biológica de Guaribas
<i>h</i>	Índice de diversidade de Nei
<i>HCF</i>	<i>Gene Host Cell Factor</i>
<i>H<sub>d</sub></i>	Diversidade haplotípica
<i>H<sub>e</sub></i>	Heterozigosidade média esperada
<i>ISSR</i>	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
JEQ	Município de Jiquiriça
PDI	Parque Estadual de Dois Irmãos
RIO	Parque Nacional Serra dos Órgãos
SAL	Reserva Biológica de Saltinho
SER	Serra da Canastra
$\pi$	Diversidade nucleotídica

# Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	21
<b>2 Revisão da Literatura</b> .....	23
2.1 Floresta tropical úmida .....	23
2.2 A Floresta Amazônica .....	23
2.3 A Floresta Atlântica .....	25
2.4 O Cerrado .....	29
2.5 Família Drosophilidae e estudos ecológicos.....	30
2.6 Grupo e subgrupo <i>willistoni</i> .....	34
2.7 <i>Drosophila willistoni</i> .....	35
2.7.1 Aspectos ecológicos de <i>D. willistoni</i> .....	37
2.7.2 Aspectos sobre a variabilidade cromossômica de <i>D. willistoni</i> .....	39
2.8 Importância dos marcadores moleculares para análise da variabilidade genética .....	40
2.8.1 Marcadores moleculares aplicados ao estudo de <i>Drosophila</i> .....	41
2.8.2. Genoma Mitocondrial e marcadores genéticos .....	42
2.8.4 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) .....	46
2.8.5 Associação com o endossimbionte <i>Wolbachia pipientis</i> .....	49
2.9 Medidas e aplicações da diversidade genética e estrutura populacional .....	51
<b>3 Objetivos</b> .....	60
3.1 Objetivo geral .....	60
3.2 Objetivos específicos .....	60
<b>4 Capítulo I</b> .....	61
High genetic diversity and low differentiation in <i>Drosophila willistoni</i> Brazilian populations, inferred by ISSR markers .....	61
<b>5 Capítulo II</b> .....	90
Evidências de expansão populacional em <i>Drosophila willistoni</i> (Diptera: Drosophilidae).....	90
<b>6 Capítulo III</b> .....	113

<i>Wolbachia pipientis</i> in Brazilian populations of <i>Drosophila willistoni</i> (Diptera: Drosophilidae) .....	113
<b>7 Capítulo IV</b> .....	131
Composição de Drosophilidae (Insecta, Diptera) em fragmentos de florestas tropicais úmidas do Brasil .....	131
<b>8 Discussão geral</b> .....	153
<b>9 Conclusões</b> .....	160
<b>Referências</b> .....	161
<b>Anexos</b> .....	182
Anexo 1 .....	182
<i>Bulletin of Entomological Research</i> .....	182
Anexo 2.....	185
<i>G3: Genes, Genomes, Genetics</i> .....	185
Anexo 3.....	186
<i>Genetics and Molecular Biology</i> .....	186
Anexo 4.....	191
<i>Annals of the Entomological Society of America</i> .....	191
<b>Curriculum vitae (Lattes)</b> .....	195

## 1 Introdução

O Brasil possui seis biomas delimitados pelo IBGE e pelo Ministério do Meio Ambiente. Entre eles, as florestas tropicais úmidas são conhecidas por abrigar a maior diversidade biológica, a maior do planeta. As Florestas Amazônica, Atlântica e o Cerrado são exemplos de florestas tropicais úmidas, possuindo elevada biodiversidade e altas taxas de endemismos. A Floresta Amazônica já apresenta uma redução de 15% de sua cobertura florestal original, enquanto que na Floresta Atlântica este percentual é superior a 90%. Os drosofilídeos, componentes da fauna destes biomas, são sensíveis às mudanças sazonais, climáticas e ambientais e, juntamente com outros animais, sofrem com a ação antrópica, e por isso estão sendo cada vez mais estudados como modelos biológicos para análise da qualidade dos ambientes.

A família Drosophilidae possui mais de 4.300 espécies de pequenas moscas, conhecidas popularmente como as “moscas das frutas”, que se encontram distribuídas em 73 gêneros, dos quais *Drosophila* é o mais especioso. As moscas pertencentes ao grupo *willistoni* de *Drosophila*, em conjunto com as do grupo *saltans*, representam a radiação do novo mundo do subgênero *Sophophora*, com distribuição exclusivamente neotropical. Dentre os drosofilídeos, o subgrupo *willistoni* é um complexo de várias espécies crípticas, que contém uma matriz sequencial de estágios evolutivos caracterizados por graus sucessivos de isolamento reprodutivo. Por isso, suas espécies, entre elas *Drosophila willistoni*, podem ser consideradas ideais para vários estudos, como os de variabilidade morfológica, cromossômica, genética e de mecanismos evolutivos, pois proporcionam oportunidades singulares

para entendimento de processos de especiação. Apesar da sua ampla ocorrência em florestas tropicais úmidas, a diversidade e a variabilidade genética entre populações desta espécie ainda é pouco estudada. Ademais, o subgrupo filogenético *willistoni* não é completamente compreendido, e poucos estudos investigaram aspectos relacionados a diferentes marcadores moleculares, entre eles, genes nucleares e mitocondriais.

Dados anteriores relatam que *D. willistoni* é muito diversa em relação a rearranjos cromossômicos, e esta variabilidade genética foi associada as diferentes regiões geográficas de ocorrência da espécie, com uma clara variação latitudinal no sentido norte-sul da sua distribuição. Este estudo, investigou se populações naturais da espécie também se diferenciam ao nível de outros marcadores genético-moleculares, como as regiões de segmentos intercalantes entre microssatélites (*ISSR*), os genes mitocondriais *COI* e *COII* e os genes nucleares presentes no elemento cromossômico F. Foram realizadas amostragens de espécies de drosofilídeos presentes em fragmentos de florestas úmidas da região Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, a fim de obter amostras recentes de *D. willistoni* e dar início a uma ampla investigação da distribuição da diversidade genética em populações naturais desta espécie, bem como compreender sua estrutura genética nas florestas neotropicais.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Floresta tropical úmida

De acordo com o IBGE (2004), o Brasil apresenta seis biomas terrestres e um marinho (Figura 1), e uma responsabilidade global em proteger seus ambientes naturais, considerados *hotspots* de biodiversidade (Rylands e Brandon, 2005).

As florestas tropicais úmidas (Floresta Amazônica e Floresta Atlântica) são florestas localizadas nas zonas intertropicais do planeta, de clima quente e que recebem chuvas durante o ano todo, se destacando por apresentarem as maiores riquezas de espécies do globo (Moore, 1998; Turner e Corlett, 1996; Kozłowski 2002, Turner, 2004).

### 2.2 A Floresta Amazônica

A Floresta Amazônica é a maior reserva de biodiversidade do mundo e o maior bioma do Brasil. Cerca de 60% deste bioma encontra-se no território brasileiro, onde ocupa quase metade (49,29%) do território nacional, cobrindo totalmente cinco estados (Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima), quase totalmente Rondônia (98,8%), e parcialmente Mato Grosso (54%) e Maranhão (34%) (MMA, 2004; IBGE, 2003). Apresenta clima quente e úmido, com temperatura média de 25°C e períodos de chuvas torrenciais bem distribuídas durante o ano e rios com fluxo intenso (MMA, 2004; IBGE, 2003).



Figura 1. Mapa do Brasil com biomas representados em diferentes cores. (Fonte: IBGE, 2004)

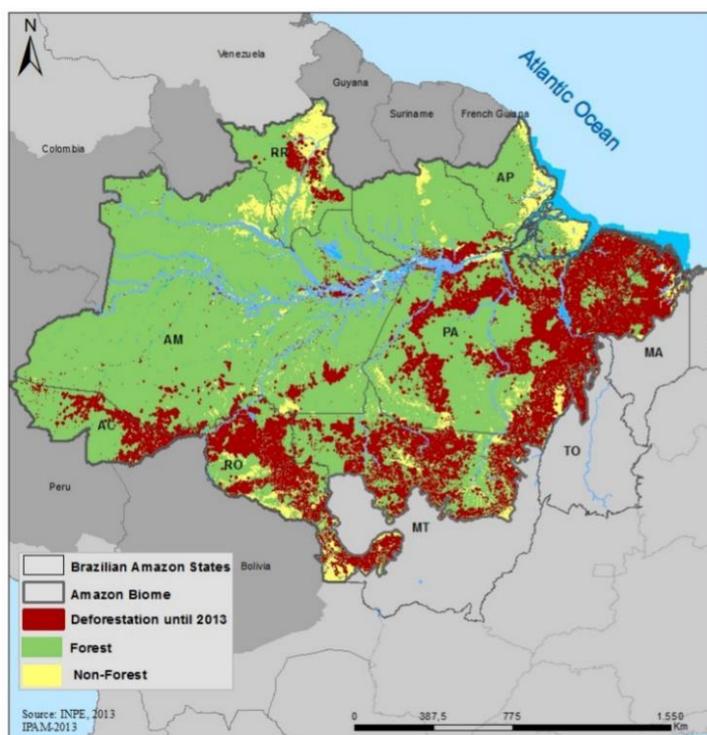


Figura 2. Mapa do desmatamento da floresta Amazônica nos Estados brasileiros. (Fonte: INPE, 2013).

A vegetação característica da Floresta Amazônica é de árvores altas. Nas planícies que acompanham o Rio Amazonas e seus afluentes, encontram-se as matas de várzeas (periodicamente inundadas) e as matas de igapó (permanentemente inundadas). Estima-se que esse bioma abrigue mais da metade de todas as espécies vivas do Brasil (MMA, 2004; IBGE, 2003).

Devido ao desmatamento, a Floresta Amazônica apresenta redução de cerca de 15% de sua cobertura vegetal original (IBGE, 2010) e o aumento da fragmentação florestal ameaça a diversidade e o equilíbrio das espécies nos ambientes naturais devido à perda de habitat (Figura 2). A introdução de espécies invasoras nestes locais altera as relações ecológicas previamente estabelecidas, podendo levar a extinção de espécies nativas (Mack et al., 2000; D' Antonio et al., 2001; Sax et al., 2007; Sampaio e Schmidt, 2014; MMA, 2017).

Apesar do atual desmatamento observado, a Floresta Amazônica ainda é um bioma bastante preservado, onde muitas espécies não foram descritas, especialmente entre os artrópodos, que têm o maior número de espécies, número de indivíduos e biomassa animal. Estima-se que mais de 70% das espécies de artrópodos da Amazônia ainda não possuem nomes científicos (<http://marte.museu-goeldi.br/>).

### **2.3 A Floresta Atlântica**

A Floresta Atlântica é a segunda maior floresta tropical úmida do Brasil. É um complexo ambiental que engloba cadeias de montanhas, vales, planaltos e planícies de toda a faixa continental atlântica leste brasileira, além de avançar sobre o Planalto Meridional até o Rio Grande do Sul (MMA, 2003; IBGE, 2003). Originalmente cobria 15% do território brasileiro, abrangendo 17 estados situados ao longo da costa

Atlântica, do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte, além de parte dos estados de Mato Grosso do Sul e Goiás (Andrade-Lima, 1966).

Esta floresta já foi um dos mais ricos e variados conjuntos florestais pluviais da América do Sul, mas atualmente é reconhecida como o bioma brasileiro mais descaracterizado. Isso porque os primeiros episódios de colonização no Brasil e os ciclos de desenvolvimento do país levaram o homem a ocupar e destruir parte deste espaço (Tabarelli *et al.*, 2010). Atualmente é uma das 25 prioridades mundiais para a conservação da biodiversidade e, de acordo com a fundação SOS Mata Atlântica (2015), é o bioma mais ameaçado do Brasil, reduzido a 8,5% de sua cobertura florestal original. Além disso, o bioma tem um grande número de espécies ameaçadas de extinção, que juntas representam cerca de 10% das espécies de aves e aproximadamente 14% dos mamíferos com risco de desaparecer (Martinelli *et al.*, 2013; Paglia *et al.*, 2015; SOS Mata Atlântica, 2017).

A Floresta Atlântica apresenta uma variedade de formações vegetais, que engloba um diversificado conjunto de ecossistemas com estrutura e composições florísticas bastante diferenciadas, acompanhando as características climáticas da região onde ocorrem (SOS Mata Atlântica, 2015). Além disso, se caracteriza como uma floresta sempre verde, geralmente com folhas largas, devido à umidade que há durante todo o ano. Seu principal tipo de vegetação é a floresta ombrófila densa, normalmente composta por árvores altas e clima quente e úmido (MMA, 2003).

A biota da Floresta Atlântica não se distribui homoganeamente. De acordo com a classificação biogeográfica sintética preliminar (Galindo-Leal e Câmara, 2005), baseada na distribuição de espécies florestais endêmicas, as áreas de endemismo da Floresta Atlântica são compostas pela cadeia de montanhas costeira

(sub-região denominada Serra do Mar) e pelas florestas úmidas do Nordeste (sub-regiões Brejos Nordestinos, Pernambuco, Diamantina e Bahia) (Figura 3).

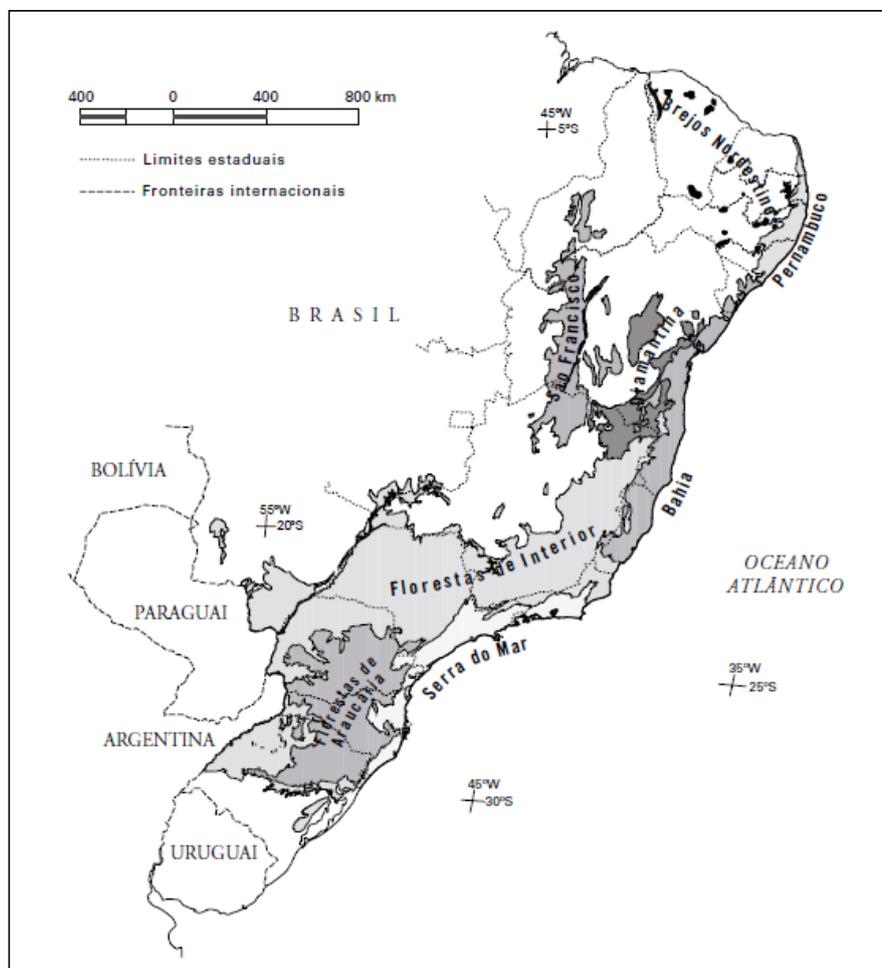


Figura 3. Mapa parcial do Brasil, com a localização das sub-regiões biogeográficas da Floresta Atlântica (*Brejos Nordestinos*, *Pernambuco*, *Diamantina*, *Bahia* e *Serra do Mar*), caracterizadas pela presença de espécies endêmicas. As sub-regiões de transição são denominadas *São Francisco*, *Florestas de Interior* e *Florestas de Araucária* (Fonte: Galindo-Leal e Câmara, 2005).

A maior parte dos remanescentes preservados da floresta está localizada em Unidades de Conservação. Os demais estão sob a pressão da atividade rural ou da expansão urbana (Capobianco, 2001). A intensidade do efeito das relações antrópicas sobre o ambiente tem revelado uma vasta perda de habitat, degradação e fragmentação. Atualmente a fauna e flora nestes locais se encontram bastante

reduzidas (Leme, 1998), sendo a segunda floresta mais ameaçada do mundo (Figura 4) (SOS Mata Atlântica, 2015). Apesar do intenso desmatamento e da fragmentação, este bioma ainda abriga uma elevada quantidade de espécies no Brasil, com altos níveis de endemismo (Galindo-Leal e Câmara, 2005).



Figura 4. Mapa parcial do Brasil com indicação dos remanescentes da Floresta Atlântica (2013-2014). As áreas em verde escuro no mapa, corresponde a remanescentes florestais; em verde claro, área natural não florestal; em cor laranja, área de Mangue; em marrom, área de Restinga; em vermelho, áreas de desmatamento entre 2013 e 2014; em cor-de-rosa, área urbana; em cor salmão, área que obedece a lei da Floresta Atlântica 11.428/06 (SOS Mata Atlântica, 2015).

## 2.4 O Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e ocupa cerca de 22% do território do Brasil (Figura 5), nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (IBGE, 1997). Neste espaço territorial encontram-se as nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata), o que resulta em um elevado potencial aquífero e favorece a sua biodiversidade.

O Cerrado se apresenta como um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 2005), com grande abundância de espécies endêmicas e outras que sofrem com a extrema perda de habitat. Do ponto de vista da diversidade biológica, possui uma grande diversidade de habitats, que determinam uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias (Castro *et al.*, 1998; Mendonça *et al.*, 1998), sendo refúgios de diversos tipos de insetos e outros animais.

O Cerrado, assim como a Floresta Atlântica, sofreu muitas alterações com a ocupação humana e com a abertura de novas áreas para incrementar a produção de carne e expansão da fronteira agrícola brasileira. Além disso, seu material lenhoso é utilizado para produção de carvão. No Brasil, este bioma possui a menor porcentagem de áreas sobre proteção integral com cerca de 8,21% protegido por Unidades de Conservação (MMA, 2017).

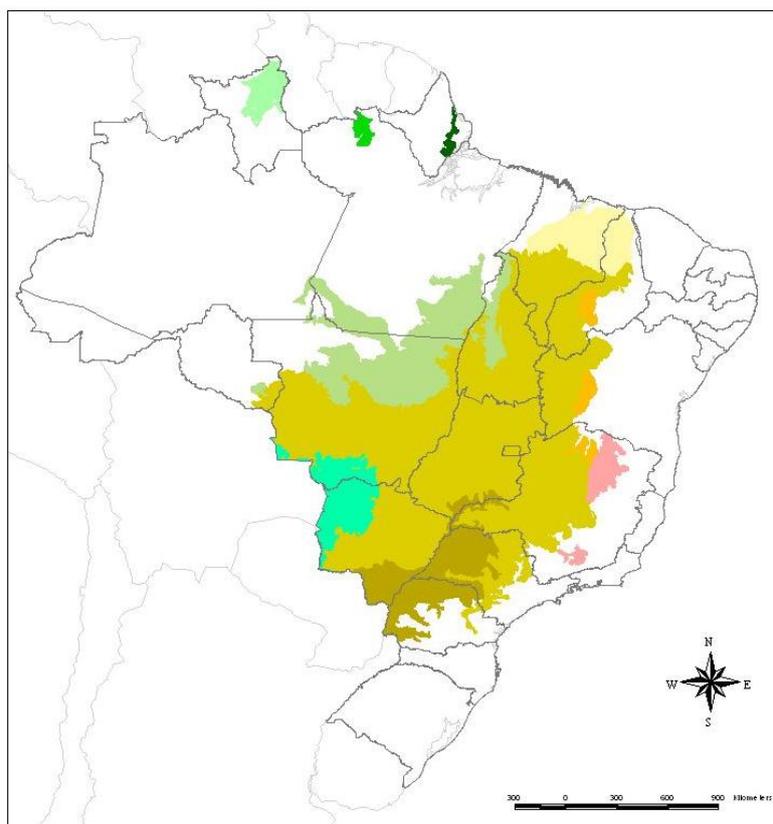


Figura 5: Mapa do Brasil com destaque para o Cerrado (cor verde oliva) e áreas de transição (demais cores) (Fonte: IBGE, 1997).

## 2.5 Família Drosophilidae e estudos ecológicos

A família Drosophilidae (Insecta, Diptera) compreende mais de 4.300 espécies de pequenas moscas distribuídas em 73 gêneros, dos quais *Drosophila* é o mais especioso com 1.188 espécies distribuídas em diversos tipos de ecossistemas (Bächli, 2017). No Brasil, 60% das espécies registradas de Drosophilidae pertencem ao gênero *Drosophila* (Gottschalk *et al.*, 2008).

São conhecidas vulgarmente como *moscas-das-frutas*, embora explorem não só os frutos em estado de decomposição, como também uma variedade de outros substratos, como flores, fungos e carcaças de animais (Carson, 1971). Na natureza os drosofilídeos atuam como decompositores que dependem de fungos,

especialmente leveduras, e também bactérias para quebrar o material vegetal e proporcionar um substrato adequado para a nutrição e desenvolvimento de larvas (Ort *et al.*, 2012). Possuem ciclo de vida curto, o que favorece seu uso como bioindicador, pois esta característica resulta em uma rápida resposta fisiológica às alterações ambientais, possibilitando aos pesquisadores a detecção e o monitoramento de sinais de distúrbios do meio (Da Mata *et al.*, 2010).

Várias coleções foram realizadas em muitos ecossistemas, como a Floresta Amazônica (Santa-Brigida *et al.*, 2017), Atlântica (Mateus *et al.*, 2006; Torres e Madi-ravazzi, 2006; De Toni *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2016; Coutinho-Silva *et al.*, 2017), Manguezais (Schmitz *et al.*, 2007), Cerrado *lato sensu* ou Savana brasileira (Tidon *et al.*, 2003; Tidon, 2006; Mata *et al.*, 2008), Pampa (Poppe *et al.*, 2012, Poppe *et al.*, 2014), Caatinga (Oliveira *et al.*, 2016 a,b) e até ambientes urbanos (Goñi *et al.*, 1997; Ferreira e Tidon, 2005; Silva *et al.*, 2005b; Gottschalk *et al.*, 2007). Estes e outros estudos também demonstraram o possível uso de drosofilídeos como bioindicadores da degradação ambiental (Parsons, 1991; Martins, 2001; Avondet *et al.*, 2003; Ferreira e Tidon, 2005; Silva *et al.*, 2005b; Bizzo *et al.*, 2010).

No Brasil ocorrem cerca de 300 espécies nativas de drosofilídeos da região Neotropical, mas também há registro de 14 espécies exóticas, como *Dettopsomyia formosa*, *De. nigrovittata*, *Drosophila hydei*, *D. ananassae*, *D. busckii*, *D. immigrans*, *D. kikkawai*, *D. malerkotliana*, *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. suzukii*, *D. virilis*, *Scaptodrosophila latifasciaeformis*, *S. lebanonensis* e *Zaprionus indianus* (Gottschalk *et al.*, 2008; Depra *et al.*, 2014).

Espécies exóticas são assim caracterizadas quando encontradas fora de sua distribuição geográfica original, muitas vezes introduzidas nos novos ambientes

através de atividades humanas, de forma intencional ou não (CBD, 2012). Uma espécie exótica passa a ser considerada invasora a partir do momento que, após sua introdução, sofre um processo de naturalização e dispersão, ocupando nichos ecológicos e várias regiões daquele local e ameaçando a diversidade biológica natural (Ziller, 2001).

Entre as espécies exóticas da família Drosophilidae que ocorrem no Brasil, *D. malerkotliana* é uma das mais abundantes ao norte da Floresta Atlântica (Rohde *et al.*, 2010a; Silva *et al.*, 2014; Coutinho-Silva *et al.*, 2017), e a mais abundante e de maior distribuição em regiões alteradas da Floresta Amazônica (Martins, 2001; Santa-Brígida *et al.*, 2017). É de origem asiática e foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1976. Por ser generalista se dispersou por várias regiões do país (Garcia *et al.*, 2005), entre elas a região Nordeste (Coutinho-Silva *et al.*, 2017).

O Brasil tem avançado na caracterização da fauna de drosofilídeos em áreas tropicais. No entanto, a existência de uma grande diversidade de espécies crípticas impôs a necessidade de análises elaboradas para a diferenciação das espécies, e entre as diversas metodologias empregadas (como cruzamentos direcionados, desenvolvimento de larvas, forma de ovos e pupas, estrutura dos cromossomos politênicos e padrão eletroforético de enzimas marcadoras) destaca-se a análise da morfologia interna e externa da terminália do macho (hipândrio) como a mais viável e utilizada nos diversos trabalhos (Tidon, 2006; Schmitz *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2014, Coutinho-Silva *et al.*, 2017).

Durante muito tempo, estudos taxonômicos e ecológicos de drosofilídeos estiveram praticamente restritos à região sul e sudeste do Brasil (Gottschalk *et al.* 2008). Apesar disso, com os estudos realizados até o momento sabe-se que a fauna

brasileira é riquíssima em número de espécies nativas, com pelo menos 181 espécies no Brasil, segundo a revisão de Gottschalk *et al.* (2008), e que há grandes variações regionais e temporais.

Além da riqueza de espécies, os drosofilídeos também reúnem características privilegiadas para investigações ecológicas (Powell 1997), pois possuem ampla diversidade nos padrões de resposta, como no desenvolvimento, morfologia, fisiologia e comportamento, relacionados às mudanças de temperatura, umidade, disponibilidade de recursos tróficos, entre outros, que conferem especialização ao habitat (Martins, 1987; Pearson 1994; Pétavy *et al.*, 2004; David *et al.*, 2005; Tidon, 2006; Coutinho-Silva *et al.*, 2017). Assim, por serem extremamente sensíveis às mudanças do ambiente, os drosofilídeos se constituem em excelentes modelos biológicos, tanto para estudos do impacto da heterogeneidade ambiental sobre a diversidade de espécies (Krijger, 2000, Garcia *et al.*, 2014; Rohde *et al.*, 2014), como de bioindicadores de fragmentação de habitats (Martins 2001), de urbanização (Avondet *et al.* 2003, Gottschalk *et al.* 2007), da ação antrópica (Mata *et al.* 2008), mudanças climáticas globais (Hoffmann, 2010), e até de poluição do ar (Lucchese *et al.* 2002). Alguns estudos apontam que a queda da diversidade de espécies de *Drosophilidae* nativas está ligada diretamente com o nível de urbanização (Ferreira e Tidon, 2005; Gottschalk *et al.*, 2007).

Embora se prestem tão bem para estudos com estas abordagens, alguns ambientes brasileiros ainda são pouco conhecidos quanto à diversidade da fauna de drosofilídeos, como é a Floresta Atlântica da região Nordeste do Brasil (Gottschalk *et al.* 2008). Conhecer a diversidade genética e ecológica dessas moscas é

necessário para entender o quanto que essas entidades dinâmicas são capazes de se adaptar às mudanças ambientais.

## 2.6 Grupo e subgrupo *willistoni*

O grupo *willistoni* de *Drosophila* pertence ao subgênero *Sophophora*, é composto por 24 espécies com distribuição Neotropical. O grupo se divide em dois subgrupos bem distintos: i) o subgrupo *willistoni*, constituído por seis espécies crípticas, ou morfologicamente muito semelhantes, que são: *Drosophila willistoni*, *Drosophila paulistorum*, constituída por várias semiespécies, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana* (Val *et al.*, 1981), sendo *D. willistoni* a espécie de maior distribuição geográfica, seguida pela *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*; e ii) o subgrupo não críptico *alagitans-bocainensis*, constituído por diversas outras espécies não crípticas, sendo as mais estudadas *D. nebulosa*, *D. capricorni*, *D. fumipennis* (Spassky *et al.*, 1971).

Várias técnicas têm sido propostas para a identificação das espécies do subgrupo *willistoni*, tais como cruzamentos direcionados com linhagens conhecidas (Ehrman e Powell, 1982; Cordeiro e Winge, 1995), análise dos cromossomos politênicos (Rohde *et al.*, 2006), frequência do batimento das asas dos machos durante a corte sexual (Ritchie e Gleason, 1995), migração eletroforética da enzima Fosfatase ácida-1 (Garcia *et al.*, 2006), e caracterização do gene mitocondrial *Citocromo c oxidase I (COI)* (Müller *et al.*, 2012, 2013). Porém é a análise detalhada

da genitália externa dos machos (Figura 6) a metodologia mais utilizada para identificação taxonômica (Malogolowkin, 1952; Spassky, 1957; Rohde *et al.*, 2010).

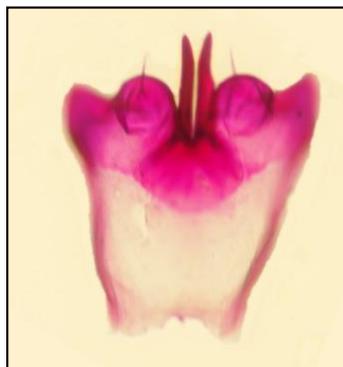


Figura 6. Imagem do hipândrio da genitália de um representante macho de *Drosophila willistoni*. (Fonte: neste estudo).

Alguns trabalhos já foram realizados para determinar a filogenia das espécies crípticas do grupo *willistoni*. Spassky *et al.* (1971) descreveram as relações evolutivas entre as espécies baseadas nas evidências biogeográficas e grau de isolamento reprodutivo. Ayala *et al.* (1974) construíram um dendograma baseado na diferenciação genética em 36 loci de alozimas. Gleason *et al.* (1998) analisaram sequências de dois genes nucleares (*Adh* e *per*) e um fragmento de 495 pb do gene mitocondrial *Citocromo c oxidase I*. No entanto, as relações filogenéticas entre estas espécies ainda não estão completamente esclarecidas, e mais estudos moleculares precisam ser feitos, e com um maior número de sequências analisadas (Gleason *et al.*, 1998).

## **2.7 *Drosophila willistoni***

*Drosophila willistoni* foi a primeira espécie do grupo *willistoni* a ser descrita. Em 1896, Samuel Williston publicou seu trabalho “On the Diptera of St. Vincent (West Indies)” e nele descreveu uma nova espécie denominada *Drosophila pallida*,

desconhecendo que já havia uma espécie com esse nome. Anos mais tarde, o erro foi corrigido e a mosca descrita por Williston passou a ser denominada *Drosophila willistoni* (Sturtevant, 1916) em sua homenagem (Figura 7).

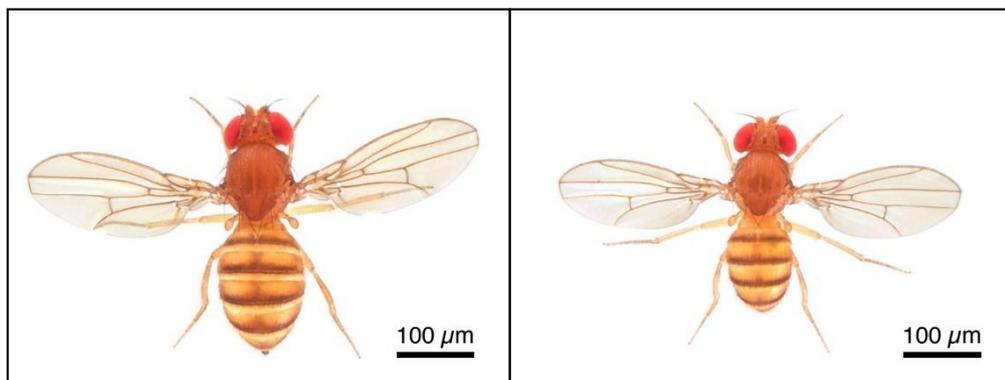


Figura 7. Imagens da morfologia externa de uma fêmea (à esquerda) e um macho (à direita) de *Drosophila willistoni*. Fonte: Flybase, 2016).

*D. willistoni* é espécie do subgrupo *willistoni* de maior distribuição geográfica, com ocorrência desde o sul da Flórida/EUA e centro norte do México, até o sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina (Spassky *et al.*, 1971; Val *et al.*, 1981) (Figura 8), com a maior predominância em florestas quentes úmidas da América Central e da América do Sul (revisão em Zanini *et al.*, 2015).

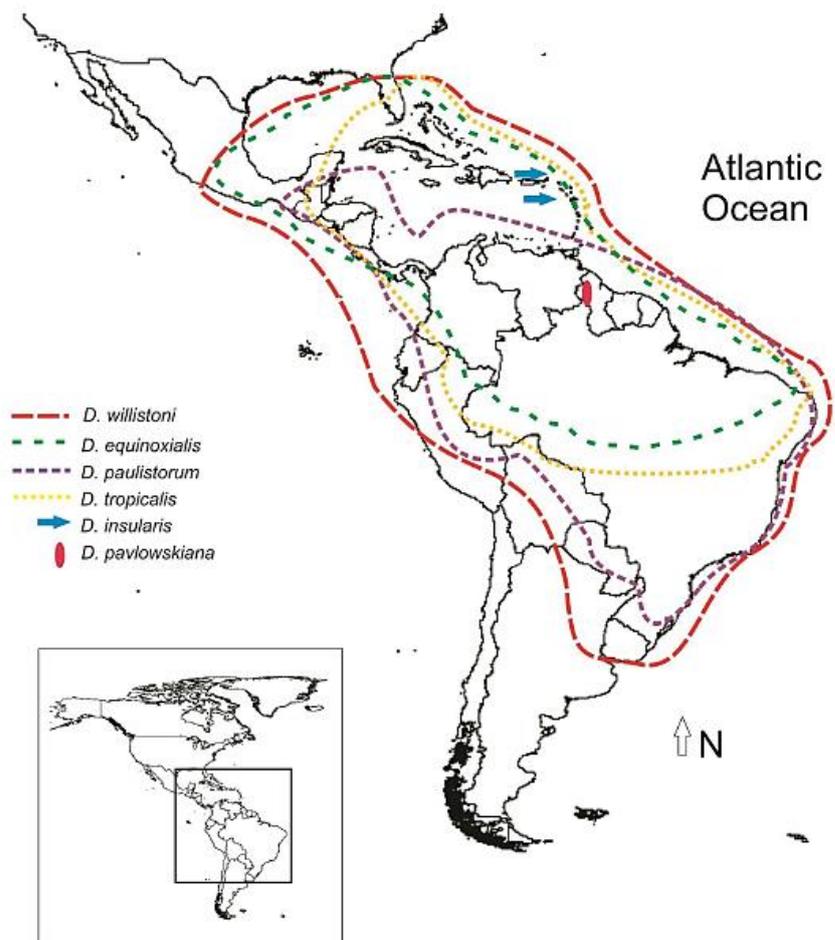


Figura 8. Mapa da distribuição neotropical de cada uma das seis espécies do subgrupo *willistoni* (linhas e símbolos coloridos). A área de distribuição de *Drosophila willistoni* sobrepõe a das demais espécies crípticas (Fonte: Zanini *et al.*, 2015).

### 2.7.1 Aspectos ecológicos de *D. willistoni*

Embora os drosofilídeos tenham sido amostrados com grande abundância e riqueza em diferentes fragmentos de Floresta Atlântica no Brasil (Spassky *et al.*, 1971; Medeiros e Klaczko 2004; Schmitz *et al.*, 2007), há mais trabalhos de investigação nas porções Sul e Sudeste do Brasil (Pavan, 1959; Sene, 1980; Gottschalk *et al.*, 2008). Diante desta carência amostral, um esforço tem sido feito desde 2010 para coletar variadas espécies de Drosophilidae, incluindo *D. willistoni*, em diversos ambientes do Nordeste brasileiro. Na Floresta Atlântica *stricto sensu*,

Brejos de Altitude e manguezais, esta espécie é bastante abundante (Garcia *et al.*, 2014), e na Caatinga, ela aparece mais raramente (Garcia *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016).

Garcia *et al.* (2014) reuniram as informações sobre as amostragens feitas em 24 diferentes locais nos ambientes citados da região Nordeste. Do total dos 39 mil drosofilídeos coletados, metade deles foram classificados como pertencentes ao subgrupo *willistoni*, sendo *D. willistoni* a mais abundante, seguida de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Os autores ainda destacam a clara preferência ecológica de *D. willistoni* por ambientes mais úmidos e pelos meses mais chuvosos do ano.

Santa-Brígida *et al.* (2017) fizeram uma lista com descrição detalhada do material depositado nas coleções entomológicas do Museu Paraense Emílio Goeldi e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, até 2015. No total, foram registradas 122 espécies de Drosophilidae, incluindo 27 novos registros para o estado do Pará e 22 são novos registros para a Amazônia. Este trabalho destaca *D. willistoni* como uma das espécies de maior distribuição em 13 municípios do bioma Amazônico.

Roque *et al.* (2017) reanalisando 2.346 drosofilídeos identificados em um trabalho anterior apenas com o subgrupo *willistoni* (Roque *et al.*, 2013), revelaram a presença de três diferentes espécies crípticas deste subgrupo: *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *D. tropicalis*. As espécies diferem não apenas em abundância, mas também em tolerância ecológica, sendo *D. willistoni* a que apresentou a maior distribuição.

### 2.7.2 Aspectos sobre a variabilidade cromossômica de *D. willistoni*

A espécie *D. willistoni* destaca-se pela grande possibilidade de estudos genéticos e evolutivos (Powell, 1997) e um dos motivos é a presença de uma rica variabilidade para rearranjos nos cromossomos politênicos. Estes cromossomos têm sido estudados desde sua descoberta na espécie *D. melanogaster*, feita por Painter (1931), que desenvolveu a técnica de obtenção deste material a partir das glândulas salivares de larvas de drosófila em terceiro estágio. O autor demonstrou que as bandas destes cromossomos seguiam exatamente a sequência dos genes, conhecidos através da técnica de mapeamento genético de mutantes em *Drosophila* (Lakovaara e Saura, 1972). Os cromossomos politênicos formam-se em núcleos interfásicos e representam o produto final de sucessivos ciclos de replicação (ciclos endomitóticos) sem a consequente separação das cromátides filhas. Resultam em uma grande estrutura que apresenta bandeamento natural, formado pela sinapse precisa dos cromômeros paralelos das cromátides politenizadas (Lakhotia, 1974).

Cada um dos diferentes cromossomos tem uma sequência típica de bandas e de regiões marcadoras e, devido a este padrão ser conservado, são elaborados fotomapas de referência dos cromossomos politênicos para cada espécie. Mapas desenhados ou fotomapas são importantes ferramentas para o mapeamento de genes, para inferir filogenias entre espécies relacionadas ou para a detecção da diversidade genética dentro e entre populações através da presença de inversões (Sturtevant e Dobzhansky, 1936; Dobzhansky e Sturtevant, 1938; Judd *et al.*, 1972; Ashburner e Lemeunier, 1976; Lemeunier e Ashburner, 1976; Rohde *et al.*, 2006, Rohde e Valente 2012).

Dentre os drosofilídeos, *D. willistoni* é considerada a espécie com mais alto nível de polimorfismo cromossômico (Powell, 1997), tendo sido catalogados mais de 50 diferentes rearranjos do tipo inversões paracêntricas e uma inversão pericêntrica (Rohde *et al.*, 2005; Rohde e Valente, 2012). Os estudos confirmam que nenhuma das populações naturais apresentou-se totalmente monomórfica para rearranjos cromossômicos (Da Cunha *et al.*, 1950).

Devido à presença de inversões paracêntricas nos cromossomos politênicos, a taxa de rearranjos no genoma de drosofilídeos é uma das mais altas entre todos os eucariotos (Ranz *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2008). De acordo com Richards *et al.* (2005), a seleção pode favorecer inversões porque mantém combinações epistáticas dentro do segmento invertido, ou pode favorecer a manutenção de genes em *clusters* que não se reorganizam e são herdados como blocos de genes (Roy *et al.*, 2002; Spellman e Rubin, 2002; Lercher *et al.*, 2003).

## **2.8 Importância dos marcadores moleculares para análise da variabilidade genética**

As ferramentas moleculares são os mais modernos e efetivos recursos que têm possibilitado análises genéticas em larga escala, se tornando de uso rotineiro em muitos laboratórios do mundo (Poke *et al.* 2005). Um marcador molecular define-se como qualquer fenótipo molecular oriundo, seja de um gene expresso (como uma isoenzimas) ou de um segmento específico de DNA, que contém polimorfismos ou variabilidade (de sequência ou de comprimento) entre os indivíduos, capaz de diferenciá-los (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

### 2.8.1 Marcadores moleculares aplicados ao estudo de *Drosophila*

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para estimar a diversidade genética em *Drosophila*, como os microssatélites em *D. melanogaster* (Nunes et al., 2008) e em *D. mojavensis* (Roos e Markov, 2006), genes mitocondriais *COI* e *COII* em *D. maculifrons* (De Ré et al., 2014; Gustani et al., 2015); DNA satélite pBuM189 em *D. buzzatii* (Kuhn et al., 2003); regiões de rDNA ITS em *D. melanogaster* (Schlötterer et al., 1994); e aloenzimas em *D. antonietae* e *D. ornatifrons* (Machado et al., 2012).

No entanto, em *D. willistoni* a diversidade genética molecular foi mais bem estudada através de marcadores enzimáticos do tipo aloenzimas. O trabalho pioneiro nesse tipo de estudo para o subgrupo *willistoni* foi o de Ayala et al. (1970), no qual analisaram os padrões eletroforéticos de migração de 14 enzimas em diversas populações de quatro espécies crípticas do subgrupo *willistoni*. Ayala et al. (1971) compararam polimorfismos cromossômicos e aloenzimáticos de populações continentais e insulares de *D. willistoni*, onde foi estudada a variação alélica de 28 loci gênicos ao longo de sua distribuição geográfica. Foi observado neste estudo que são encontrados mais polimorfismos em populações da região central da distribuição da espécie (região Central do Brasil) do que nas populações marginais. Logo depois, Ayala et al. (1972) investigaram 48 populações de *D. willistoni* (do México e da Flórida, através da América Central e da América do Sul tropical, até o sul do Brasil) obtendo 58% do polimorfismo em uma dada população.

Ayala e Tracey (1973) analisaram a variabilidade enzimática e isolamento reprodutivo entre as duas subespécies de *D. willistoni* – *willistoni* e *quechua*, e afirmaram que “evidências disponíveis apresentadas indicam que ocorre uma

substancial diferenciação genética na formação de subespécies”. No mesmo trabalho os autores apresentaram o estudo comparando a diferenciação genética intra e interespecífica em espécies do grupo *willistoni*.

### 2.8.2. Genoma Mitocondrial e marcadores genéticos

O material genético das mitocôndrias é constituído de uma molécula de DNA circular, presente em várias cópias na célula. Existe muita variação no tamanho do DNA mitocondrial (DNAMt) entre os seres vivos, mas seu conteúdo e organização, entre animais, é muito conservado (Matioli, 2001). Em geral, o genoma mitocondrial codifica dois RNAs ribossomais, 13 RNAs mensageiros e 22 RNAs transportadores que se traduzem em enzimas da cadeia respiratória e componentes da membrana interna (Mulder, 2017).

O DNAMt possui ainda várias características distintivas de outros genomas, o que o torna um ótimo marcador molecular para estudos genéticos em animais. Por ser distribuído de forma ubíqua entre os seres, podem ser feitas comparações homólogas entre uma grande variedade de organismos. O DNAMt tem uma estrutura genética simples, ao contrário do DNA repetitivo, elementos transponíveis, pseudogenes e íntrons, e exibe um modo direto de transmissão (herança materna). É ainda fácil de isolar em experimentos e fornece informações de caráter qualitativo inferido por critérios razoáveis de parcimônia, com propósitos para a análise microevolutiva (Avise *et al.*, 1987). Por ter um modo direto de transmissão genética, sem recombinação ou outros rearranjos genéticos, a determinação de seus haplótipos é inequívoca (Wong e Clayton, 1985; Yiang e Wong, 1991). De modo

geral, entre os organismos, o DNAm<sub>t</sub> evolui rapidamente, podendo ser de 5 a 10 vezes mais rápido que a evolução de genes nucleares (Simon *et al.*, 1994).

Entre os mais estudados do DNAm<sub>t</sub>, o gene da *Citocromo c oxidase subunidade I (COI)* possui algumas características que o tornam adequado como marcador genético para estudos evolutivos (Lunt *et al.*, 1996). Primeiramente, *COI* tem sido relativamente bem estudado bioquimicamente e o seu tamanho e estrutura parecem ser conservados em todos os organismos investigados (Saraste, 1990). Além disso, há várias sequências disponíveis e estudos do gene *COI*, já testadas para hipóteses filogenéticas em diversos grupos de organismos e de drosofilídeos, o que confirma sua importância como marcador para o estabelecimento de filogenias (Goto e Kimura, 2001).

Gleason *et al.* (1998), por exemplo, foram os primeiros a avaliar as relações evolutivas no subgrupo *willistoni* e nas semiespécies de *D. paulistorum*, com base no gene mitocondrial *COI*, além de dois genes nucleares. Robe *et al.* (2010) utilizaram sequências de genes mitocondriais *COI* e *Citocromo c oxidase subunidade II (COII)*, além de outros marcadores, para um relevante estudo taxonômico, filogenético e biogeográfico com o subgrupo *willistoni*, reforçando a importância deste marcador para estudos em espécies neotropicais de *Drosophila*.

A análise dessas sequências de evolução rápida, também permite investigar polimorfismos nas populações de uma mesma espécie e eventos demográficos (Avice *et al.*, 1987; Avice, 2009). Estudos populacionais com DNAm<sub>t</sub> foram feitos por De Brito *et al.* (2002), que realizaram uma análise cladística de populações de *Drosophila serido* utilizando sequências *COI*. Os autores verificaram um evento

antigo de fragmentação, que separou as populações da região Central do Brasil, das populações do Nordeste e das populações do Sul do Brasil.

Os genes *COI* e *COII* foram utilizados nos estudos populacionais de *Drosophila ornatifrons* de Gustani *et al.* (2015). Os autores estudaram populações da Floresta Atlântica do Sul do Brasil e verificaram que a estrutura demográfica das populações apresentava sinais de expansão. Estes mesmos genes foram investigados por De Ré *et al.*, (2014) em *Drosophila maculifrons* do Sul e Sudeste do Brasil, também revelando sinais de expansão populacional. Müller *et al.* (2012) foram os primeiros a investigar a variabilidade genética de *COI* em populações naturais de *D. willistoni* do Sul do Brasil, revelando a presença de 15 haplótipos, em sete populações.

### 2.8.3 Genes do elemento cromossômico F

O elemento cromossômico F é um cromossomo pontual chamado de 'dot', livre e não recombinante dentro de boa parte das espécies do gênero *Drosophila* (Müller, 1940). No entanto, em algumas espécies este elemento F se fusionou a outro elemento cromossômico, como em *D. willistoni* (fusão E+F) formando o atual cromossomo III da espécie (Papaceit e Juan 1998; Pitta *et al.*, 2014). Este evento de fusão foi possível devido a grandes reorganizações cromossômicas que alteraram a posição de blocos gênicos, assim como a presença de elementos transponíveis. Este fato motivou vários estudos para verificar a posição de genes e mapeamento citogenético.

O elemento F apresenta propriedades distintas quando comparado com outros cromossomos autossomos (Leung *et al.*, 2015), como sua composição nucleotídica e alta densidade de elementos repetitivos (Riddle *et al.*, 2009; Leung *et*

*al.*, 2010). A densidade média de repetições nas regiões eucromáticas dos braços do elemento F é aproximadamente cinco vezes maior que nos cromossomos autossômicos (Slawson *et al.*, 2006). Leung *et al.* (2010) avaliaram o comportamento de movimentação de genes do elemento F em dois subgêneros de *Drosophila* (*Sophophora* e *Drosophila*) e concluíram que os genes apresentam diferenças na taxa de recombinação.

Com o intuito de verificar a variabilidade genética de genes do elemento F em *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis* e em uma espécie não críptica (*Drosophila nebulosa*), Melo (2012) realizou diversas análises no genoma de *D. willistoni* e desenhou *primers* para 6 genes do 'dot' (*PlexinB*, *Ankyrin*, *Host Cell Factor*, *Zinc Finger Homeodomain-2*, *Bent* e *Shaven*). Com base nesta informação, Nascimento (2013), Monteiro (2014); Silva (2016) e Oliveira (2016), produziram e analisaram sequências de nucleotídeos de dois genes do elemento F (*Ankyrin* e *PlexinB*) para populações de *D. paulistorum*, *D. willistoni*, *D. equinoxialis* e *D. nebulosa*. As autoras verificaram que, para esses dois genes, *D. paulistorum* foi quem apresentou maior variabilidade, seguida de *D. equinoxialis* e *D. nebulosa*. *D. willistoni* não apresentou qualquer variação para estes dois genes, nas amostras estudadas de diversas regiões do Brasil, e da América Central (GdH4 usada no sequenciamento genômico da espécie, *Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007).

Em 2016, Oliveira testou a variabilidade genética de *ZFH2* e *HCF* em populações de *D. nebulosa*, observando padrões distintos de variação dentro das populações (Oliveira, 2016). No mesmo ano, Silva (2016) hibridizou três genes do elemento F (*PlexB*, *ZFH-2* e *HCF*) e mapeou suas citolocalizações em cromossomos politênicos, ampliando para seis o número de genes mapeados neste braço

cromossômico. Dentre estes genes, *HCF* apresenta função de regulador da acetilação da histona (Flybase, 2016). Ele foi localizado na seção 78D do elemento F, sendo o gene mais próximo ao ponto de fusão E+F (Silva, 2016).

Este cenário da variabilidade dos genes nucleares no subgrupo *willistoni* instigou a ampliação dos estudos em *D. willistoni* com outros marcadores moleculares, sobretudo aqueles que apresentam taxas de evolução mais rápidas para caracterizar a diversidade genética da espécie, tal como o de sequências repetitivas genômicas, como o *ISSR* (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Esselman et al., 1999; Shen et al., 2006) e os genes *COI* e *COII*.

#### 2.8.4 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

A técnica molecular conhecida como *Inter Simple Sequence Repeat* (*ISSR*) se baseia na amplificação de DNA via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo necessário apenas um único oligonucleotídeo para amplificação da sequência repetitiva do DNA nuclear, podendo ser usado também com combinações de mais de um *primer*. Estes primers podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases, podendo ser degeneradas ou não. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando à sequência repetida ou têm uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições. Os polimorfismos ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microssatélite, e o tamanho (em pares de bases) das sequências amplificadas constitui o marcador *Inter Simple Sequence Repeat* (*ISSR*) (Zietkiewick et al., 1994). Embora *ISSR* sejam marcadores dominantes, têm a vantagem de analisar loci múltiplos em uma única reação (Goulão e Oliveira, 2001).

*ISSRs* são marcadores estáveis e se mostram eficientes na produção de padrões polimórficos intraespecíficos e interespecíficos. Os *ISSR-PCR primers* amplificam regiões que se encontram entre dois blocos de microssatélites (Gupta *et al.*, 1994, Avise, 2004), gerando sequências com alto grau de polimorfismo (Borner e Bramchard, 2001).

A presença de banda no gel correspondente ao fenótipo dominante (homozigoto ou heterozigoto) e a ausência de banda corresponde ao fenótipo recessivo. Embora esta seja uma clara desvantagem da metodologia *ISSR*, porque impede uma estimativa direta de alguns parâmetros populacionais (por exemplo, heterozigosidade observada e, assim, índices  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  de Wright), eles têm certas vantagens, entre elas, a facilidade de gerar um grande número de marcadores, sem necessidade de nenhuma informação genômica prévia. Também apresentam reprodutibilidade e a possibilidade de visualização facilitada em géis de agarose convencionais (Nagaoka e Ogihara, 1997).

Marcadores *ISSRs* foram utilizados para uma variedade de estudos genéticos e para a genética de populações de plantas, tais como a caracterização de diferentes variedades de milho (Kantety *et al.*, 1995), trigo (Nagaoka e Ogihara, 1997), de cevada (Fernandez *et al.*, 2002) entre outros. Em menor escala, *ISSRs* também têm sido usados para a caracterização genética de outros organismos (Cano *et al.*, 2005), para a análise de diversidade genética (Lu *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006), para a identificação de genes associados com resistência a doenças (Ratnaparkhe *et al.*, 1998), para análises filogenéticas (Datwylwe e Wolf, 2004) e para genes de mapeamento (Kogima *et al.*, 1998).

Em insetos, marcadores ISSR têm sido empregados para caracterizar diferentes linhagens de *Bombyx mori* (Pradeep et al., 2005), de *Antheraea mylitta* (Kar et al., 2005), de *Culex quinquefasciatus* (Mendki et al., 2011), além disso, em estudos de hibridação (Hundsdoerfer et al., 2005), diversidade genética (Phillips et al., 2002; De Leon e Jones, 2005; Roux et al., 2007), e de conservação genética (Vijayan et al., 2006).

Nos últimos anos, a técnica de ISSR tem sido bastante utilizada visando estimar a diversidade genética e estrutura genética de diferentes espécies de animais como o peixe *Brycon orbignyanus*, *B. hilarii*, *B. cf. pesu*, *B. cephalus*, *B. falcatus*, e *B. gouldingi* (Antunes et al., 2010) e *Epinephelus itajara* (Benevides et al., 2014), assim como em insetos como coleópteros *Zabrotes subfasciatus* (Souza et al., 2008) e *Canthon (Peltecanthon) staigi* (Ferreira-Neto et al., 2017), em mosquito *Aedes aegypti* (Soliani et al., 2010), em borboletas *Antheraea assamensis* (Singh et al., 2012), em gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Manrique-Poyato et al., 2013), em *Chrysoperla externa* (Barbosa et al., 2014), e em lepidópteros *Chrysodeixis includens* (Palma et al., 2015) e *Plutella xylostella* (Yang et al., 2015).

Em *Drosophila* este marcador tem sido pouco utilizado, com apenas alguns trabalhos para verificar relações filogenéticas no subgrupo *nasuta* de *Drosophila* (Nagaraja e Ranganath, 2004), para verificar introgressão genômica em raças híbridas do complexo *nasuta-albicans* e variabilidade genética (Bijaya e Ramachandra, 2010; Thongatabam e Ramachandra, 2012) e para entender a dinâmica temporal de variação genômica em populações de *D. melanogaster* (Vaulin e Zakharov, 2008).

Sabendo-se que este marcador genético tem se mostrado eficiente para investigar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de insetos, este foi aplicado, pela primeira vez, como marcador para caracterizar a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *D. willistoni*.

#### 2.8.5 Associação com o endossimbionte *Wolbachia pipientis*

Animais e plantas vivem em estreita associação com bactérias simbiotes, que frequentemente, causam fortes mudanças fenotípicas em seus hospedeiros (Moran *et al.*, 2008). As interações simbióticas estão entre os mais variados táxons (Parecer e Ahmadjian, 2000), dentre os quais *W. pipientis* destaca-se por sua ampla distribuição, variedade de hospedeiros, e por ter sido amplamente estudada (Riegler e O'Neill, 2006; Frydman, 2007; Hamm *et al.*, 2014). É um endossimbionte obrigatório, que infecta acima de dois terços de todas as espécies de insetos (Jeyaprakash e Hoy, 2000; Hilgenboecker *et al.*, 2008), transmitido, predominantemente, através de herança materna e pode desencadear inúmeras alterações reprodutivas, dentre elas a incompatibilidade citoplasmática (CI) (O'Neill, 1990), que é o efeito mais comum, além da indução de partenogênese (Stouthamer *et al.*, 1990), feminização e morte de machos (Rousset *et al.*, 1992).

Diversos tipos de infecções foram observados em uma variedade de espécies de insetos, pois os indivíduos infectados com diferentes linhagens de *W. pipientis* não são compatíveis com o acasalamento (Sinkins 2004). A superinfecção, definida por infecção com duas ou mais cepas desta bactéria, permite a troca genética, aumentando assim a diversidade de bactérias (Werren *et al.*, 1995, Jiggins *et al.*, 2001).

O ponto chave deste processo é a possibilidade do estabelecimento de isolamento reprodutivo entre populações da mesma espécie, que previne o fluxo gênico ineficiente e a produção de híbridos potencialmente inferiores (Otte e Endler, 1989). Por tudo isso, e mesmo que ainda existam poucos modelos naturais disponíveis, foi proposto que *W. pipientis* pode promover especiação do hospedeiro sob certas condições ambientais específicas na natureza (Telschow *et al.*, 2005, 2007; Miller *et al.*, 2010).

Enquanto alguns trabalhos sugerem que em *D. willistoni* a infecção por *W. pipientis* ocorreu recentemente (Ballard, 2004; Miller e Riegler, 2006), sua espécie críptica *D. paulistorum* tem sido descrita como um exemplo de um longo processo de Coevolução e interferência na escolha das fêmeas durante o acasalamento. De acordo com Miller *et al.* (2010) as semiespécies de *D. paulistorum* apresentam entre si variantes de *W. pipientis* estreitamente relacionadas, porém incompatíveis. Assim, existe uma forte pressão seletiva a favor das fêmeas que possuem determinadas linhagens de *W. pipientis* compatíveis entre si. As interações simbióticas, neste caso, são fontes de inovações evolutivas e direcionamento dos processos de especiação (Almerão, 2009, Miller *et al.* 2010).

Embora a infecção por *Wolbachia* tenha ampla ocorrência em diversos insetos, incluindo *Drosophila*, novos estudos precisam ser realizados em populações naturais, a fim de compreender melhor a relação endossimbiótica e suas implicações na adaptação das espécies hospedeiras ao seu habitat.

## 2.9 Medidas e aplicações da diversidade genética e estrutura populacional

A manutenção da variabilidade genética em populações é a base da conservação de espécies (Yeoh et al., 1996). De acordo com Kageyama (1987), a diversidade genética ou variabilidade, devida a diferenças nos alelos pode ocorrer nos seguintes níveis: a) de espécies dentro de ecossistemas, b) de populações dentro de espécies e c) de indivíduos dentro de populações da espécie.

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações pode ser efetuada a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores genéticos e a análise dos dados genéticos deve ser baseada em alguma teoria ou modelo (Weir, 1996). O modelo clássico de uma população infinita, de cruzamento aleatório, na ausência de mutação, migração e seleção (Teorema de Hardy-Weinberg) permite que sejam feitas inferências estatísticas. Quando ocorrem desvios das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, significa que alguma das pressuposições do modelo foi violada e, então, são propostos modelos alternativos para a verificação das possíveis causas do desvio. As principais alterações nas frequências alélicas nas populações naturais podem ser causadas por processos sistemáticos como mutação, fluxo gênico (migração) e seleção natural ou processo dispersivo, como a deriva genética (Falconer e Mackay, 1996). Outra questão importante em relação à diversidade genética refere-se à maneira pela qual a variabilidade genética é distribuída, organizada e mantida entre e dentro de populações naturais, ou seja, o nível de estruturação genética das populações (Hamrick, 1982). A estrutura genética, portanto, refere-se à distribuição heterogênea dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas (Brown, 1978).

Algumas medidas de diversidade genética e estrutura populacional estão descritas a seguir:

*Porcentagem de locos polimórficos (P)*: Um loco é chamado de polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é igual ou inferior a 0,95 ou 0,99. Esta medida expressa, em termos numéricos, a quantidade de polimorfismo e é dada pela razão entre os locos polimórficos e o total de locos da amostra (Torggler et al., 1995). Conforme Nei (1987), a porcentagem de locos polimórficos não é uma boa medida da variação genética, porém, quando um grande número de indivíduos e locos são analisados, ela pode fornecer um aspecto importante dessa variação dentro de populações.

*Heterozigosidade média esperada (He)*: A medida mais completa de variabilidade genética intrapopulacional é o grau de heterozigosidade esperada, pois sumariza a variação genética de uma população em uma única estatística (Berg e Hamrick, 1997). Nei (1987) considera que, por não depender da definição arbitrária de polimorfismo, a heterozigosidade média é uma medida mais apropriada de variação genética.

*Índice de diversidade de Nei (h)*: Dentre os fatores evolutivos, a mutação e a migração aumentam a variabilidade genética, enquanto que a seleção natural e a deriva genética geralmente diminuem a variabilidade dentro das populações (Hartl e Clark, 2010; Templeton, 2011). Espécies que apresentam ampla distribuição geográfica, gerações longas, longo tempo de fecundidade, geralmente, tendem a manter maiores níveis de variabilidade genética.

*Índice de informação de Shannon (I)*: O índice de Shannon, inicialmente utilizado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área, foi introduzido

em 1972 por Lewontin (Lewontin, 1972) nos estudos de genética de populações. A utilização desse índice como medida de diversidade populacional é bastante interessante, pois seu uso possibilita contornar o problema da não detecção dos genótipos heterozigotos, já que o índice de Shannon não se baseia na heterozigosidade da população e, sim, na frequência fenotípica da banda (fragmento amplificado) na população (Yeh et. al., 1995). O índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera-se que, quanto mais próximo de um, mais alta é a diversidade.

*Diversidade haplotípica ( $H_d$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ):* A diversidade haplotípica ( $H_d$ ) representa a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso de uma amostra possuam haplótipos distintos. Já o número de diferenças entre haplótipos, que se baseia na divergência média entre sequências, constitui o cálculo da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987).

*Índice de identidade de Nei ( $\hat{I}$ ):* Este índice de identidade genética baseia-se em frequências alélicas de locos homólogos nas diferentes populações NEI (1972). É a probabilidade de identidade de um gene da população x e um gene da população y, serem idênticos.

*Estatística F (Wright):* Para quantificar a estrutura genética das populações três metodologias são empregadas: estatística F (Wright, 1951), diversidade gênica (Nei, 1973) e análise da variância das frequências gênicas (Cockerham, 1969). As três metodologias se complementam em relação ao significado biológico das estimativas obtidas, especialmente se os marcadores forem neutros, a amostragem for aleatória e as populações forem originadas de uma única população ancestral. Desta forma, as estatísticas F permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ), que se refere à probabilidade de se amostrar dois alelos

de uma população e eles serem idênticos por descendência, utilizando o conjunto de populações como referência; dos níveis médios de endogamia ao nível populacional ( $F_{IS}$ ) e da endogamia total ( $F_{IT}$ ). Já os coeficientes de coancestria ( $\theta$ ) permitem a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia.

O  $F_{ST}$  é considerado uma importante ferramenta em análises populacionais, com aplicações em diversas áreas, como conservação e biologia evolutiva (Meirmans e Hedrick, 2011). O valor de  $F_{ST}$  varia de 0 a 1.  $F_{ST}=1$  indica subpopulações completamente homozigotas com a fixação de alelos distintos entre elas.  $F_{ST}=0$  indica subpopulações com frequências alélicas idênticas, ou seja, não existe diferença genética entre as subpopulações (Holsinger e Weir, 2009).

Hartl e Clark (2010) sugeriram as seguintes orientações qualitativas para interpretação do  $F_{ST}$ : 0–0,05 (pequena diferenciação genética); 0,05–0,15 (diferenciação genética moderada); 0,15–0,25 (grande diferenciação genética); >0,25 (diferenciação genética muito grande).

Coeficiente de endogamia ( $f$ ): O coeficiente de endogamia mede a redução fracionária na heterozigosidade, em relação a uma população que se reproduz por panmixia, com as mesmas frequências alélicas da população sob análise. Quando  $f=0$  tem-se panmixia, ou seja, não existe endogamia e a população tem frequências gênicas e genóticas de acordo com aquelas que são esperadas na condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando  $f=1$  tem-se endogamia total e a população só apresentará genótipos homozigóticos para cada um dos seus alelos. Qualquer outro valor de  $f$  indica a presença de algum fator genético ou estocástico alterando as

frequências genotípicas esperadas pela condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Templeton, 2006).

*Análise de Variância Molecular (AMOVA)*: Para contornar o problema da dominância de alguns marcadores, (como é o caso do *ISSR*) em 1992, Excoffier et al. introduziram uma nova alternativa para a análise dos dados obtidos por esses marcadores. Uma análise de variância que incorpora as informações sobre a divergência de DNA provenientes de dados de haplótipos, derivada de uma matriz de distâncias quadradas em todos os pares de haplótipos, é a denominada análise de variância molecular (AMOVA). A AMOVA estima os componentes de variância análogos às estatísticas F, denominada estatística  $\phi$ , refletindo a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. A significância dos componentes de variância e das estatísticas  $\phi$  é testada por meio de permutações. A base dessa análise de variância molecular é que ela trata as distâncias genéticas como desvios da média de um grupo e usa os quadrados dos desvios como variâncias, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações analisadas.

*Fluxo gênico*: É a mudança evolutiva na frequência dos alelos causada pelo movimento de gametas entre populações de uma mesma espécie (Slatkin, 1985, 1987). Sua estimativa não depende somente do processo de dispersão, mas também do sucesso reprodutivo do indivíduo migrante e do tamanho da população que recebe o migrante (Ennos, 1994). Teoricamente, o padrão de fluxo gênico existente em um conjunto de populações pode ser descrito por diversos modelos. Futuyma (1992) descreve os seguintes modelos: modelo continente-ilha: existe, efetivamente, um movimento unidirecional de uma subpopulação grande para uma menor, quase

isolada; modelo de ilhas: a migração ocorre ao acaso dentre um grupo de pequenas subpopulações; modelo de alpondras (stepping-stone): cada subpopulação recebe migrantes somente das subpopulações vizinhas; modelo de isolamento por distância: o fluxo gênico ocorre preferencialmente entre indivíduos mais próximos espacialmente, em subpopulações de distribuição contínua.

Uma das formas de estimar os valores de fluxo gênico indiretamente está baseada nas estatísticas  $F$  de Wright que através do valor do  $F_{ST}$  consegue medir a quantidade de indivíduos migrantes por geração ( $Nm$ ). Segundo Hartl e Clark (2010), o produto  $Nm$  pode ser interpretado como o número absoluto de indivíduos migrantes que entram em cada subpopulação a cada nova geração. Os autores discutem também o quão pequeno o nível de fluxo gênico pode ser para que as populações se mantenham como uma única unidade evolutiva e demonstram que um único migrante por geração é suficiente para anular parcialmente o efeito divergente da deriva genética. Na condição de equilíbrio de fluxo gênico-deriva, o valor de  $F_{ST}$  diminui, quando o número de migrantes aumenta, mostrando claramente que, o fluxo gênico diminui a divergência genética entre as populações. A redução dos valores de  $F_{ST}$  com o acréscimo de  $Nm$  é extremamente rápido, como mostra o exemplo abaixo de Hartl e Clark (2010):  $Nm=0,25$  (um migrante a cada quatro gerações)  $\Rightarrow F_{ST} = 0,50$ ;  $Nm = 0,50$  (um migrante a cada duas gerações)  $\Rightarrow F_{ST} = 0,33$ ;  $Nm = 1,00$  (um migrante por geração)  $\Rightarrow F_{ST} = 0,20$ ;  $Nm = 2,00$  (dois migrantes por geração)  $\Rightarrow F_{ST} = 0,11$ .

*Testes de neutralidade:* Os testes de neutralidade são capazes de constatar se os dados observados são significativamente diferentes que os esperados, assumindo

assim o modelo de Wright-Fisher, onde as mutações são neutras (Fisher, 1930; Wright, 1931).

O índice  $D$  de Tajima tem seu cálculo baseado na distribuição de sítios segregantes e na diversidade nucleotídica. Valores superiores a zero sugerem que a população tenha sido submetida à seleção balanceadora ou um recente gargalo populacional. Valores inferiores a zero indicam expansão populacional ou seleção purificadora (Tajima, 1989).

O índice  $F_s$  de Fu é calculado a partir da distribuição haplotípica, e figura entre os mais apropriados para identificar crescimento populacional (Ramos e Rozas, 2002). Valores positivos de  $F_s$  resultam de poucos alelos, e indicam retração populacional, como em casos de gargalos evolutivos. Já os valores negativos de  $F_s$  são evidências de excesso de alelos, como se espera em casos de expansão populacional recente ou efeito carona (Fu, 1997).

As medidas de diversidade genética e estrutura populacional descritas acima são aplicadas em várias abordagens dentro dos estudos populacionais. De acordo com Da Cunha *et al.* (1954) a variabilidade presente em uma população está positivamente ligada ao número de nichos ecológicos explorados pela espécie, e quantificar esta variação pode ajudar a entender a capacidade de adaptação das populações em meios distintos. Esta abordagem é preponderante para entender a evolução de uma espécie, ainda mais quando se considera as grandes e rápidas mudanças ambientais que o planeta vêm passando. Assim, quanto maior for o repertório de diferentes alelos de uma população, maiores serão suas chances de sobreviver às alterações do meio (Mateus e Sene, 2003).

Outra abordagem fundamental em genética, com muitas implicações em trabalhos mais recentes, é a *distribuição do efeito fitness* (DEF) de novas mutações, que podem ser desvantajosas, neutras ou vantajosas (Eyre-Walker e Keightley, 2007). Um dos métodos para investigar DEF é coletar mutações espontâneas, em amostras naturais e analisar as sequências de DNA dentro e entre populações. Analisando a natureza das mutações é possível verificar seus efeitos deletérios sobre o valor adaptativo dos indivíduos (*fitness*), sendo menos provável que estas mutações se espalhem na população e se tornem fixadas, no caso de um efeito negativo no *fitness*. Logo, a probabilidade de uma mutação se espalhar e se fixar nos genomas depende da força da seleção, positiva ou negativa, atuando sobre ela (Eyre-Walker e Keightley, 2010).

Diante de tantas possibilidades de uso de marcadores, de índices para quantificar a diversidade genética de populações e entender sua estrutura demográfica de populações de drosofilídeos em diferentes ambientes, a melhor opção é utilizar diferentes marcadores em um mesmo estudo. E assim, evitar qualquer viés na análise, nos testes de diferentes hipóteses e na confirmação de resultados.

Neste sentido, um dos marcadores utilizados neste trabalho, o *ISSR*, apresenta alta taxa de polimorfismo, com a vantagem de detectar variações dentro da parte não codificante do genoma, e verificar a coancestralidade da distribuição dessas variações nas diferentes populações, além de estruturação genética.

Foram também analisados dois genes mitocondriais *COI* e *COII* para obter informações sobre a ocorrência e distribuição dos haplótipos nas diferentes populações, sobre o efeito demográfico dessa distribuição, entender melhor

possíveis eventos evolutivos modeladores da variabilidade genética de *D. willistoni*. Foi analisado também o gene autossômico (*HCF*), localizado no elemento F, para verificar o nível de seleção sobre o genoma nuclear, principalmente verificar se a taxa de mutação neste elemento está associada à sua localização. Comparar com base na literatura se as diferenças na taxa de seleção deste elemento e outros elementos dentro da mesma espécie. Por fim, foi investigada a presença do endossimbionte *W. pipientis* em *D. willistoni*, para verificar a dimensão da infecção na espécie, verificar a coexistência de outras estirpes desta protobactéria e associar a importância e contribuição deste endossimbionte para manutenção das populações de *D. willistoni* na natureza, dada as características benéficas desta associação para o efeito *fitness*.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional de *Drosophila willistoni* e sua associação ao endossimbionte *Wolbachia pipientis*, bem como a diversidade ecológica da família Drosophilidae.

### 3.2 Objetivos específicos

- a) caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional de *D. willistoni* através do marcador genético ISSR, dois genes mitocondriais e um gene nuclear;
- b) analisar a presença e a variabilidade do endossimbionte *W. pipientis* em diferentes populações de *D. willistoni*;
- c) avaliar a diversidade ecológica de Drosophilidae em ambientes de Floresta úmida do Norte e Nordeste do Brasil.

## 4 Capítulo I

### Artigo 1

Submetido à revista *Bulletin of Entomological Research*

ISSN: 0007-4853 (Print), 1475-2670 (Online)

Fator de impacto 2016: 1.758 (B2 – CBI)

Normas para submissão estão no Anexo 1



### **High genetic diversity and low differentiation in *Drosophila willistoni* Brazilian populations, inferred by ISSR markers**

Z.G.S. Melo<sup>1</sup>, C. Rohde<sup>2\*</sup>, G.A.S. Cruz<sup>3</sup>, J.A.N. Mendonça<sup>2</sup>, R.M. Oliveira<sup>2</sup>, A.C.L. Garcia<sup>2</sup>, M.A. Montes<sup>4</sup> and R.C. Moura<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil: <sup>2</sup> Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brazil: <sup>3</sup> Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brazil: <sup>4</sup> Laboratório de Bioquímica, Genética e Sequenciamento, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil.

\* Author for correspondence

Phone: +55 (81) 3114 4100

Fax: +55 (81) 3114 4100

E-mail: claudia.rohde@yahoo.com.br

Keywords: dispersion, gene flow, population genetics, Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), *willistoni* subgroup.

## Abstract

The neotropical *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) is one of the most abundant drosophilids, especially in Brazil where it can be found in almost all biomes. Apart from its ecological representation and importance in genetic research, few studies have been focus on their intrinsic genetic diversity. This may be due, in part, to the difficulty in accurately identifying *D. willistoni* once it is a member of a restricted subgroup. To provide new insight into genetic diversity and population structure of this species, 156 flies from eight Brazilian regions (Amazon, Atlantic Forest and Cerrado) were assessed using ISSR. The variability was high, with 95.2 % of loci being polymorphic. The gene diversity ( $H_t$ ) was 0.3325 and gene diversity within strain ( $H_s$ ) was 0.3078. A low level of genetic differentiation ( $F_{ST}=0.0602$ ) was observed at the same time as high levels (94%) of molecular variance and gene flow ( $Nm=11.48$ ) among the populations. The Isolation by Distance was not significant, and the patterns of variation based on neutrality tests were not consistent with population expansion. We surmise that *D. willistoni* has demographic stability, with high rates of gene flow that is probably not affected by environmental factors, or actual habitat fragmentation.

## Introduction

*Drosophila willistoni* Sturtevant belongs to the Drosophilidae family (Insecta, Diptera) and *willistoni* group of the *Drosophila* genus. Together with *Drosophila paulistorum*, Dobzhansky and Pavan, *Drosophila equinoxialis* Dobzhansky, *Drosophila tropicalis* Burla and Da Cunha, *Drosophila insularis* Dobzhansky and *Drosophila pavlovskiana* Katritsis and Dobzhansky, *D. willistoni* form the *willistoni* subgroup of sibling species. *D. willistoni* presents great geographical representability in the forests of neotropical region (Spassky *et al.*, 1971; Ehrman & Powell, 1982; Gottschalk *et al.*, 2008; Zanini *et al.*, 2015a), especially in Brazil, where this species along with *D. paulistorum*, represent almost half of all drosophilids collected in the Atlantic Forest (Medeiros & Klaczko, 2004; Garcia *et al.*, 2014), Pampa (Pope *et al.*, 2012) or Cerrado (Roque *et al.*, 2017).

Regarding genetic variability among populations few works have been published in regard to *D. willistoni*, and the difficulties that exist when trying to accurately distinguish this species from it siblings is certainly a major factor. This task

demands meticulous methods, such as analysis of the male terminalia (Malogolowkin, 1952; Spassky, 1957; Rohde *et al.*, 2010; Zanini *et al.*, 2015b); polytene chromosomes (Rohde *et al.*, 2006); courtship songs (Ritchie & Gleason, 1995); isozymes (Garcia *et al.*, 2006); directional strain intercrossing (Ehrman & Powell 1982; Cordeiro & Winge, 1995; Mardiros *et al.*, 2016); and morphological structures of the pre-adult stages (Zanini *et al.*, 2016). Recent studies have overcome these difficulties and have contributed new taxonomic inventories of *D. willistoni* (Garcia *et al.*, 2014; Roque *et al.*, 2017; Santa-Brígida *et al.*, 2017), a big first step towards a deeper understanding of genetic variability in populations.

Genetic diversity has been defined as the variety of alleles and genotypes present in a population, a reflection of morphological, physiological and behavioral differences among individuals (Frankham *et al.*, 2002). According to Toro & Caballero (2005), genetic diversity is the basis of the evolutionary potential of a species to respond to environmental changes. This is because genetic factors can affect the risk of extinction if the populations of species are small and/or declining. In such populations, inbreeding and loss of genetic diversity are often unavoidable (Frankham *et al.*, 2002) and affect the ability of populations to adapt and evolve in a changing environment (Frankham *et al.*, 2005).

Rohde & Valente (2012) studied genetic variability at the chromosomal level in 30 geographic populations of *D. willistoni*, from Florida to Uruguay. After analyzing the frequencies of 50 different polytene chromosomal inversions, the authors presented evidence of a south to north cline. By combining all inversion frequencies, a dendrogram was generated illustrating different regional groups. These results triggered questions about other genetic markers and whether or not they would follow the same cline rule, and if the majority of polymorphic populations of chromosomal inversions (located in Central Brazil) are polymorphic for other DNA markers.

Nowadays, there exist a large number of different molecular markers available for the study of population genetics. These markers are capable of showing a large range of allelic diversities, from SNPs, which are essentially biallelics, to microsatellites that can have many alleles at a single locus structure (Meirmans & Hedrick, 2011). Inter-simple sequence repeat (ISSR) is a suitable tool for studying population genetic, to provide a virtually unlimited number of dominant DNA markers

(Zietkiewicz *et al.*, 1994; Ng & Tan, 2015). This reflects segments of genomic DNA located between two identical repeat regions of microsatellites, which are highly variable and ubiquitously distributed across the genome. These segments derived from primers that are anchored within the elements themselves, rather than in flanking regions (Zietkiewicz *et al.*, 1994). The low cost, speed, efficiency, robustness and ease of replication of ISSR markers allow for easily estimating different parameters in population genetics (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Nagaoka & Ogiwara, 1997).

As such, ISSR has been successfully employed in studies of polymorphism and evolutionary relationships in plants (Kantety *et al.*, 1995; Nagaoka & Ogiwara, 1997; Wolfe & Liston, 1998; Bornet *et al.*, 2001, 2002; Reddy *et al.*, 2002; Archibald *et al.*, 2006; Roy & Chakraborty, 2009; Dantas *et al.*, 2015; Trieu *et al.*, 2016). In insects, ISSR markers have been characterized into different groups of species, such as aphids (Aboot, 2001), silkworms (Reddy *et al.*, 1999; Kar *et al.*, 2005; Pradeep *et al.*, 2011), moths (Luque *et al.*, 2002), mosquitoes (Soliani *et al.*, 2010; Mendki *et al.*, 2011), grasshoppers (Manrique-Poyato *et al.*, 2013), lepidoptera (Singh *et al.*, 2012; Palma *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015) and the dung beetle (Ferreira-Neto *et al.*, 2017). In drosophilids, on the other hand, ISSR markers has been rarely applied, with only descriptive studies done about phylogenetic relationships in the *Drosophila nasuta* Lamb subgroup (Nagaraja *et al.*, 2004); in temporal characterization of *Drosophila melanogaster* Meigen populations from Russia (Vaulin & Zakharov, 2008); and in a study of genomic introgression in the hybrids of the *nasuta*- *albomicans* complex (Bijaya & Ramachandra, 2010). Here we present our comparative genetic analysis of this marker in *D. willistoni* populations to better understand its genetic diversity, differentiation and population genetics.

## **Material and Methods**

### **Sampling**

*Drosophila willistoni* from eight locations, representing three different biomes throughout Brazil, were investigated (fig. 1). The adult collections were done between January 2015 and July 2015. One population (BEL) was from the Amazon biome, which is composed mainly of rainforest, and which occupies 49% of the country

(IBGE, 2004). The Amazon region is considered the most biologically diverse region in the world. Two populations (BRA and SER) were from Cerrado, considered the second largest biome of the country (24%), and composed of low savannah trees, surrounded by formations of open grassland (IBGE, 2004). The other five populations (GUA, PDI, BJC, SAL, JEQ) were from the northern part of the Atlantic Forest, a biome that, in Brazil, extends along the coast encompassing 17 states (13% of the country), with an extraordinarily rich biodiversity as well (IBGE, 2004).

At each collection site, adult flies were captured with 20 traps containing banana baits (Tidon & Sene, 1988), distributed linearly, suspended at 1.5 m from the ground and placed apart 20 m from each other. The traps remained in place for 48 hours and at the end of this time, the captured adults were taken to the laboratory for taxonomic identification. Individuals of the *willistoni* subgroup were identified by analyzing their external morphology. After that, each female was transferred to a new vial to start a new strain (isofemale line). To identify species of the subgroup *willistoni*, the terminalia of male descendants were treated with 10% KOH (Bächli *et al.*, 2004), dissected in glycerol, and mounted properly on a slide. The hypandrium photo was documented using a Nikon Eclipse 80i microscope and was finally compared to descriptions from Malogolowkin (1952) and Rohde *et al.* (2010).

### **Molecular analyses**

Initially, thirteen Inter-simple sequence repeat (ISSR) primers, developed by the Biotechnology Laboratory at the University of British Columbia, were tested on a few samples of *Drosophila willistoni* populations. The six primers found to be the most polymorphic (table 1) were used for genotyping, and were all compatible with indices of desired polymorphisms such as PIC (Polymorphism Information Content), MI (Marker Index) and RP (Resolving Power) (table S1, supplementary material). The Pearson's correlation analysis was performed.

#### *DNA extraction and amplification of ISSR*

DNA from 158 aleatory males was isolated, representing eight populations of *D. willistoni* (16-20 males per population), using a Puregene *kit* (QIAGEN, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The polymerase chain reaction

(PCR) was carried out on a MasterCycler pro S (Eppendorf, Germany) in a total volume of 20  $\mu$ L, containing 30 ng template DNA, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.25 mM each dNTPs, 0.5  $\mu$ M of primer (Invitrogen, USA), 1,0 U of *Taq* DNA polymerase recombinant (Invitrogen, in 1x reaction buffer), and ultrapure water. The PCR cycle followed was: one initial cycle of denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, annealing specific temperature (Table 1) for 45 s, extension at 72 °C for 2 min, and finally extension at 72 °C for 7 min. A negative control, in which template DNA was absent, was included in PCR protocols for testing non-contaminations.

The PCR products were analyzed in 1.8 % agarose gel in 1x TBE buffer (Tris-Boric acid-EDTA), stained with fluorescent nucleic acid dye GelRed™ (Biotium, USA) and diluted 1:250. After an electrophoresis run of 100 V during 4h30min, the ISSR bands were made visible through use of a UV transiluminador coupled to a gel documentation system UVP (VisionWorks Image Acquisition and Analysis Software). The band size was estimated with Gel Analyzer 2010 software (Lazar Software, developed by Dr. Istvan Lazar, Debrecen, Hungary). Regarding the reproducibility, at least two independent PCRs were analyzed per sample and only the consistent, clear and reproducible bands were considered. The bands were scored in a binary mode (1 to present, or 0 to absent). The level of polymorphism for each primer was represented by the percentage of polymorphic bands relative to all the bands analyzed.

#### *Analysis of genetic diversity, gene flow and population structure*

The analysis of genetic diversity was performed on the ISSR fragments amplified for each of the six primers. The percentage of polymorphic bands per population, and expected heterozygosity ( $H_e$ ) was calculated using Arlequin software, version 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010), as well as the genetic differentiation index ( $F_{ST}$ ) (Meyer, 1996), a suitable measure for understanding the influence of demographic processes, such as genetic drift and migration, on genetic population structure (Meirmans & Hedrick, 2011). The Nei's Index of diversity ( $h$ ) (Nei, 1978) and Shannon's Information index ( $I$ ) (Bussel, 1999) were calculated using POPGENE software, version 1.32 (Yeh & Boyle, 1997), considering the dominant nature of the marker. In the POPGENE were also calculated: the pairwise of Nei's

genetic identity, the total observed genetic diversity ( $Ht$ ) and the mean genetic diversity of the populations ( $Hs$ ) (estimated according to Nei, 1978).

Gene flow among populations was estimated using the mean number of migrants ( $Nm$ ), calculated, in POPGENE software, version 1.32, and applying the equation  $Nm=0.5(1-G_{ST})G_{ST}^{-1}$ , where  $G_{ST}$  is the average genetic divergence among populations.

The analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), was calculated using Arlequin software, version 3.5.1.3, based on 1023 permutations, and with partition on two levels (among and within populations). The AMOVA was conducted considering each population separately.

The genetic clustering was tested by Structure software, version 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Twenty independent runs were carried out for each value of K (K from 1 to 8) using the admixture model with correlated allele frequencies (Evanno *et al.*, 2005). For each run, 1,000,000 iterations were carried out after a burn-in period of 100,000 iterations. The best K was determined in Structure Harvester software, version 2.3.4 (Evanno *et al.*, 2005).

#### *Analysis of genetic distances and neutrality*

A tree based on the Neighbor-Joining method and  $p$ -distance model with  $10^3$  replicates of bootstrap was generated with MEGA software, version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). The Isolation by Distance was analyzed using Arlequin software, version 3.5 (Excoffier & Lisher, 2010) based on a potential correlation between the genetic and geographic (km) distances throughout the Mantel test (Sokal & Rohlf, 1995). The neutrality tests  $D$  of Tajima (Tajima, 1989) and  $F_s$  (Fu, 1997) were generated after 1000 simulations to increase the confidence of the results related to population expansion, using Arlequin software, version 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). The deviation of neutral balance occurs when the values are significantly higher or lower than zero.

#### *Population model test*

Because ISSR are dominant markers, the data was tested by Bayesian methods using HICKORY software, version 1.1 (Holsinger & Lewis, 2003). Four models were evaluated: i) the *full* model, which defines different values of zero for the

population differentiation (theta  $\theta$ , analogous to the Wright parameter  $F_{ST}$ ) and for inbreeding ( $f$  analogous to  $F_{IS}$ ); ii) the  $f=0$  model, which does not assume any inbreeding within the populations; iii) the  $theta=0$  model, which is based on the absence of population differentiation; and iv) the  $f$  free model, when the values of  $f$  are randomly chosen for data analysis, regardless of previous information. The choice of the model was based on the Deviance Information Criterion (DIC) parameter, analogous to Akaike's Information Criterion (AIC) during the selection of the Bayesian model and the parameter  $D_{bar}$ , a measure of how well the model fits the data (smaller values are those chosen).

## Results

In this first report, applied to eight natural populations of a *D. willistoni*, results were gathered, and included from six different ISSR primers. Because each primer produced a great number of bands (fig. 2), high variation between individuals of the same population were observed. The six primers employed yielded a total of 120 ISSR markers total for the eight populations, with 95.2 % of the loci being polymorphic.

In general, all populations showed similar numbers of amplified loci and high genetic diversity, especially JEQ population, from the state of Bahia (table 2). The Nei's genetic identity (table 3A) was very similar and high between populations. Comparisons between SAL and BJC and between SAL and JEQ or BRA were the highest of the results. In accordance with the high genetic identity between populations, they also presented low genetic differentiation (table 3B), and the highest pairwise  $F_{ST}$  value obtained was between GUA and BEL. Moreover, the results of gene flow (table 3C) showed high numbers of migrants between populations.

The mean estimates of genetic variability for *D. willistoni* species were high for  $Ht$  (0.3325) and for  $Hs$  (0.3078), and were low for  $F_{ST}$  (0.0602). The mean value of  $Nm$  for the species was very high (11.48 migrants). The AMOVA showed that the molecular variance is higher within rather than among populations of *D. willistoni* (table 4).

During the neutrality test, Tajima's mean value obtained was not significant in the populations ( $p > 0.05$ ) (table 5). This suggests that the populations are in balance,

and not suffering interference in evolutionary processes such as natural selection or genetic drift. However, the FS Fu test presented significant results in the cases of BEL and SER populations ( $p < 0.05$ ), whose negative values may suggest directional selection and recent population expansion.

The Mantel test applied to the results shown in table 3 (between  $F_{ST}$  and geographic distance in km) showed a positive, but non-significant correlation ( $r=0.359955$ ,  $p=0.078000$ ) among the populations studied. However, when only the five most distant populations were looked at (BEL, GUA, JEQ, BRA and SER) the tests were significant ( $p < 0.05$ ) with a positive correlation between genetic and geographical distances ( $r=0.587216$  and  $p=0.047000$ ).

Additionally, no consistent genetic structuration was found for *D. willistoni* populations, using 120 polymorphic bands generated by six primers ISSR. Simulations were performed using Structure software, version 2.3.4 that consistently identified  $K=2$  (fig. S1, supplementary material), for individuals from all populations grouped in the same cluster, with the same admixed ancestry. Note that  $h_s$  values are estimates of genetic diversity (panmitic or expected heterozygosity) for each population sample,  $H_s$  is the mean of the  $h_s$  values for all samples of the population, and  $H_t$  is the heterozygosity that would be observed if all samples from the population came from a single population. Therefore, the percentage of ancestry inference showed that individuals from each population had the same proportions of ancestry for two genetic groups (fig. S2, supplementary material).

The topology of the non-rooted phenetic tree generated with ISSR markers (fig. S3, supplementary material) showed that most of the clusters were collapsed regardless of the origin of the different populations. Low bootstrap values, mainly at the basal nodes, suggest no genetic distance among populations.

The population model tests revealed that the smaller values of DIC and Dbar parameters were observed for the *full* model and  $f=0$ . However, the biological features of the *D. willistoni* (such as abundance of individuals and broad geographical distribution), allow us to selected the  $f=0$  model as the most suitable (table S2, supplementary material), considering the absence of inbreeding level (or very low level), the low differentiation index found in Wright statistic ( $F_{ST}$ ) and the expected heterozygosity.

## Discussion

According to Toro & Caballero (2005), the descriptive genetic information can be investigated through DNA sequences, individual genes, chromosomes or quantitative genetic variation. However, most of the drosophilids studies are still restricted to the cosmopolitans species *D. melanogaster* and *D. simulans* Sturtevant, considered the central models system for molecular population genetics (Kern & Begun 2005). In this sense, it is surprising that there is only one reference on the variability of ISSR sequences in *D. melanogaster* (Vaulin & Zakharov, 2008), and just two others on species of *D. nasuta* subgroup (Nagaraja *et al.*, 2004; Bijaya & Ramachandra, 2010). Therefore, the results here presented in *D. willistoni* are important records of the variability of the ISSR marker in a Neotropical species, and a contribution to population studies.

In general, the analysis here performed pointed to a species with high genetic variability but low genetic differentiation. These results reinforce other investigations at populational levels of *D. willistoni* (Ayala *et al.*, 1970; 1972; 1974; Ayala & Tracey, 1973; Saavedra *et al.*, 1995). For example, Ayala *et al.* (1972), based on allozymes variability of 28 selected gene loci, have discovered a great deal of genetic variation. The authors investigated 70 *D. willistoni* populations (from Mexico and Florida, through Central and South America) to characterize the genetic variation in the species. On the average, 58% of loci were polymorphic in a given population. In this case, a locus was considered polymorphic when the frequency of the most common allele was no greater than 0.95.

The high variability of ISSR within the populations agree, to a certain extent, with previous chromosomal analysis (Da Cunha *et al.*, 1950; 1959; Da Cunha & Dobzhansky, 1954; Dobzhansky, 1957; Valente & Araújo, 1985, 1986; Valente *et al.*, 1993; 2001; 2003; Rohde & Valente, 2012) that indicate high chromosomal polymorphism for paracentric inversions in natural populations. Da Cunha *et al.* (1950) for example, found 32 chromosomal inversions occurring in three Brazilian populations, and considered the results as an unprecedented arrangement of gene. Rohde & Valente (2012) also confirm the high chromosomal polymorphism of *D. willistoni*, following the analysis of 30 populations, from Florida (U.S.A) to Uruguay.

Detailed registration of 50 chromosomal rearrangements allowed the authors to identify a clear south to north latitudinal cline, especially associated with the rearrangements on X chromosomes. A dendrogram of all *D. willistoni* samples organized the 30 populations into five geographic clusters. These results might indirectly support the idea that these geographic population clusters could be also recognized using other genetic markers. However, according to our results, this presumption was not supported by ISSR analysis. It is important to note that we chose to collect and study samples of *D. willistoni* populations for ISSR data in the same geographic regions investigated by Rohde & Valente (2012).

According to Pavan *et al.* (1951), the amount of concealed variability in Brazilian *D. willistoni* populations, investigated at the time with presence of recessive lethals, semilethals, sterility genes and modifiers to the development rate in their autosomes, was great. According to the authors, in natural populations, virtually every chromosome of *D. willistoni* contains at least one deleterious recessive gene. Moreover, as our results with ISSR marker did, the results of Pavan *et al.* (1951) showed that natural Brazilian populations of *D. willistoni* were relatively uniform. According to authors, this relative uniformity certainly cannot be ascribed to any uniformity of the distinct environments in which these populations live, because the regions of Brazil from which the samples came are bioclimatically quite different. Our results are also in accordance with Pavan & Knapp (1954) whose early work comparing the allelism rate of lethal chromosomes suggested that the populations of *D. willistoni* may be treated as indistinguishable from theoretical infinites ones.

According our ISSR analysis, the populations were not able to group in at least three expected geographical clusters (Amazon Forest, Atlantic Forest, and Cerrado), as was observed in the analysis of chromosomal inversions of Rohde & Valente (2012). It was possible to observe that the DNA sequences analyzed in the genome, correspondent to those regions flanked by microsatellite sequences, did not differ regionally, in the same way as the chromosomal regions represented by paracentric inversions (Rohde & Valente, 2012). Most likely, the DNA sequences did not change, but their positions did, which are reflected in the differentiated gene expression in each rearrangement, or combination of them, in populations of ecologically distinct

environments. Therefore, comparing ISSR results and chromosomal polymorphism, seems evident that the last genetic measure is the best to differentiate populations.

The results demonstrate high gene flow, high genetic variability and low  $F_{ST}$  differentiation in *D. willistoni* populations, triggering discussions about important general concepts (Ayala *et al.*, 1972; Mallet, 2001; Yu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015). For example, what are the biological processes responsible for the considerable genetic variability present in this flying insect? Are there *D. willistoni* levels of genetic variability capable of ensuring its survival in the face of increasing habitat fragmentation? The results indicate that the high concentration of variability into the populations comes in conjunction with the lack or restrictions of gene flow among individuals, from different localities. The results also indicate that geographic distance did not limit the genetic flow since there was no association between differentiation and distance, during the Mantel test. Considering that a certain amount of migration occurs between neighboring populations, *D. willistoni* may effectively approximate to a single panmitic population with low or absence of inbreeding.

All contribution made by different authors about the genetic diversity of *D. willistoni* until now allow us to conclude that there is a complex demographic history on populations related to effective migration, high genetic diversity and the heterogeneity of environments. Together these characteristics contribute to a better understanding of the ecological versatility of *D. willistoni*, one of the most numerous species of Drosophilidae in several phytogeographic formations in Brazil.

### **Acknowledgments**

The authors are thankful to Brazilian agencies Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Pernambuco (PROPESQ-UFPE), for financial supports. And to Georgia F. Oliveira, Rita D. Coutinho-Silva, Celso A. Ferreira Neto, Paloma da Silva, Wedja K. Melo, Ana P. Costa, Danubia G. Silva and José Eduardo Garcia for technical support and helpful comments.

### **References**

- Abbot, P.** (2001) Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science* **1**, 8-10.
- Archibald, J.K., Crawford, D.J, Santos-Guerra, A, & Mort, A.M.E.** (2006) The utility of automated analysis of inter-simple sequence repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the Canary Island species of *Tolpis* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **93**(8), 1154-1162.
- Ayala, F.J. & Tracey, M.L.** (1973) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. VIII. Genetic differentiation and reproductive isolation between two subspecies. *Journal of Heredity* **64**, 120-124.
- Ayala, F.J., Mourão, C.A., Perez-Salas, S., Richmond, R. & Dobzhansky, T.** (1970) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group, I. Genetic differentiation among sibling species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **67**(1), 225-232.
- Ayala, F.J., Powell, J.R., Tracey, M.L., Mourão, C.A. & Perez-Salas, S.** (1972) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* **70**, 113-139.
- Ayala, F.J., Tracey, M.L., Barr, L.G., McDonald, J.F. & Perez-Salas, S.** (1974) Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics* **77**, 342-384.
- Bächli, G., Vilela, C.R., Escher, S.A. & Saura, A.** (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* **39**, 362 p.
- Bijaya, T. & Ramachandra, N.B.** (2010) Genetic variability assessed by competitive ability and ISSR markers in the members of the *nasuta-albomicans* complex of *Drosophila*. *Natural Science* **8**(12), 29-42.
- Bornet, B. & Branchard, M.** (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**, 209-215.
- Bornet, B., Müller, C., Paulus, F. & Branchard, M.** (2002) Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and

tetranucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleraceae* var. botrytis L.). *Genome* **45**, 890-896.

- Bussell, J.D.** (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* **8**, 775-789.
- Cordeiro, A.R. & Winge, H.** (1995) Genetics of Natural Populations. New York: Columbia University Press; c1995. Chapter 19, Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species; p. 262-280.
- Da Cunha, A.B. & Dobzhansky, T.** (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* **8**, 119-134.
- Da Cunha, A.B., Burla, H. & Dobzhansky, T.** (1950) Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* **4**, 212-235.
- Da Cunha, A.B., Dobzhansky, T., Pavlovski, O. & Spassky, B.** (1959) Genetics of natural populations. XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in relation to its environment. *Evolution* **13**, 389-404.
- Dantas, L.G., Esposito, T., Sousa, A.C.B., Félix, L., Amorim, L.L.B., Benko-Iseppon, A.M., Batalha-Filho, H. & Pedrosa-Harand, A.** (2015) Low genetic diversity and high differentiation among relict populations of the neotropical gymnosperm *Podocarpus sellowii* (Klotz.) in the Atlantic Forest. *Genetica* **143**, 21-30.
- Dobzhansky, T.** (1957) Chromosomal variability in Islands and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution* **11**, 280-293.
- Ehrman, L. & Powell, J.R.** (1982) *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN Jr. (eds). The Genetics and Biology of *Drosophila*. 3b. Academic Press; London, pp. 193–225.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J.** (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L.** (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M.** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**(2), 479-491.
- Ferreira-Neto, C.A., Cruz, G.A.S., Amorim, I.C., Balbino, V.Q. & Moura, R.C.** (2017) Effects of fragmentation and anthropic pressure on the genetic structure of *Canthon* (*Peltecanthon*) *staigi* (Coleoptera: Scarabaeidae) populations in the Atlantic Forest domain. *Journal of Insect Conservation* **21**(2), 267-276.
- Frankham, R.** (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126**, 131-140.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A.** (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fu, Y.X.** (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**(2), 915-925.
- Garcia, A.C.L., Rohde, C., Audino, G.F., Valente, V.L.S. & Valiati, V.H.** (2006) Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretic mobility of acid phosphatase-1. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **44**, 212-216.
- Garcia, A.C.L., Silva, D.M.I.O., Monteiro, A.G.F., Oliveira, G.F., Montes, M.A. & Rohde, C.** (2014) Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. *Annals of the Entomological Society of America* **107**(5), 975-982.
- Gottschalk, M.S., Hofmann, P.R.P. & Valente, V.L.S.** (2008) Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* **4**, 485-518.
- Holsinger, K.E. & Lewis, P.O.** (2003) Hickory: A package for analysis of population genetic data. Department of Ecology and Evolutionary Biology, U-3043, University of Connecticut, CT, USA.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)** (2004) Mapa de biomas do Brasil. Brasília: MMA; IBAMA, 2004. Escala 1: 5.000.000 <available in:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>  
 Accessed in may 2017.

- Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L. & Zehr, B.E.** (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* **1**, 365-373.
- Kar, P.K., Vijayan, K., Mohandas, T.P., Nair, C.V., Saratchandra, B. & Thangavelu, K.** (2005) Genetic variability and genetic structure of wild and semi-domestic populations of tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) ecorace Daba as revealed through ISSR markers. *Genetica* **125**, 173-183.
- Kern, A.D. & Begun, D.J.** (2005) patterns of polymorphism and divergence from noncoding sequences of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: evidence for nonequilibrium processes. *Molecular Biology and Evolution* **22**(1), 51-62.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K.** (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**(7), 1870-1874.
- Liu, M., Compton, S.G., Peng, F.E., Zhang, J. & Chen, X.Y.** (2015) Movements of genes between populations: are pollinators more effective at transferring their own or plant genetic markers? *Proceedings of the Royal Society B* **282**, 20150290.
- Luque, C., Legal, L., Staudter, H., Gers, C. & Wink, M.** (2002) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* **136**(3), 251-253.
- Machkour-M'Rabet, S., Hénaut, Y., Calmé, S. & Legal, L.** (2012) When landscape modification is advantageous for protected species. The case of a synanthropic tarantula, *Brachypelma vagans*. *Journal of Insect Conservation* **16**, 479-488.
- Mallet, J.** (2001) Gene flow. In: *Insect Movement: Mechanisms and Consequence* (Eds Woiwod IP, Reynolds DR, Thomas CD). pp. 337-360. CABI Publishing, CAB International, Oxon, UK.
- Malogolowkin, C.** (1952) Sobre a genitália dos Drosophilidae (Diptera) III. Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Revista Brasileira de Biologia* **12**, 79-96.

- Manrique-Poyato, M.I., Lopez-Leo, M.D., Gomez, R., Perfectti, F. & Camacho, J.P.M.** (2013) Population genetic structure of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. *PloS One* **8**(3), e59041.
- Mardiros, X.B., Park, R., Clifton, B., Grewal, G., Khizar, A.K., Markow, T.A., Ranz, J.M. & Civetta, A.** (2016) Postmating reproductive isolation between strains of *Drosophila willistoni*. *Fly* **10**(4), 162-171.
- Medeiros, H.F. & Klaczko, L.B.** (2004) How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forests of São Paulo, Brazil? Species lists of three forest remnants. *Biota Neotropical* **4**(1), 1-12.
- Meirmans, P.G. & Hedrick, P.W.** (2011) Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. *Molecular Ecology Resources* **11**, 5-18.
- Mendki, M.J., Sharma, A.K., Veer, V., Agrawal, O.P., Prakash, S. & Parashar, B.D.** (2011) Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4**(5), 357-362.
- Meyer, D.** (1996) Árvores evolutivas humanas – uma discussão sobre inferência filogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Série Monografias no. 3, Ribeirão Preto, p. 1-162
- Nagaoka, T. & Ogiwara, Y.** (1997) Applicability of Inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **94**(5), 597-602.
- Nagaraja, G., Nagaraju, J. & Ranganath, H.A.** (2004) Molecular phylogeny of the *nasuta* subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and Col mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms. *Genes & Genetic Systems* **79**(5), 293-299.
- Nei, M.** (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Ng, W.L. & Tan, S.G.** (2015) Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we going it right? *ASM Science Journal* **9**(1), 30-39.
- Palma, J., Maebe, K., Guedes, J.V.C. & Smagghe, G.** (2015) Molecular variability and genetic structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an important soybean defoliator in Brazil. *PloS One* **10**(3), e0121260.

- Pavan, C. & Knapp, E.P.** (1954) The genetic population structure of Brazilian *Drosophila willistoni*. *Evolution* **8**(4), 303-313.
- Pavan, C., Cordeiro, A.R., Dobzhansky, T., Malogolowkin, C., Spassky, B. & Wedel, M.** (1951) Concealed genic variability in Brazilian populations of *Drosophila willistoni*. *Genetic* **36**, 13-30.
- Poppe, J.L., Valente, V.L.S. & Schmitz, H.J.** (2012) Structure of Drosophilidae assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa biome (São Luiz Gonzaga, RS). *Papéis Avulsos de Zoologia* **52**, 185-195.
- Pradeep, A.R., Jingade, A.H., Singh, C.K. et al** (2011) Genetic analysis of scattered populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Donovan: Differentiation of subpopulations. *Genetic and Molecular Biology* **34**(3), 502-510.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P.** (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Reddy, A.P., Sarla, N. & Siddiq, E.A.** (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**, 9-17.
- Reddy, K.D., Nagaraju, J. & Abraham, E.G.** (1999) Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity* **83**, 681-687.
- Ritchie, M.G. & Gleason, J.M.** (1995) Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *Journal of Evolutionary Biology* **8**, 463-479.
- Rohde, C. & Valente, V.L.S.** (2012) Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifty different rearrangements. *Genetic and Molecular Biology* **35**(4), 966-979.
- Rohde, C., Garcia, A.C.L., Valiati, V.H. & Valente, V.L.S.** (2006) Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Müller's element B). *Genetica* **126**, 77-88.
- Rohde, C., Monteiro, A.G.F., Cabral, W.B.M., Silva, D.M.I.O., Oliveira, G.F.M., Montes, M.A. & Garcia, A.C.L.** (2010) The importance of identification of the *willistoni* subgroup of *Drosophila* at the species level: the first evidence of *D. equinoxialis* in the Northeast region of Brazil. *Drosophila Information Service* **93**, 118-122.

- Roque, F., Leão, B.F.D. & Tidon, R.** (2017) Spatio-temporal distribution of the cryptic flies of the *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae) subgroup in a Neotropical forest. *Annals of the Entomological Society of America* **110**(4), 398-402.
- Roy, S.C. & Chakraborty, B.N.** (2009) Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis*) cultivars as revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. *Indian Journal of Biotechnology* **8**, 370-376.
- Saavedra, C.C.R., Valente, V.L.S. & Napp, M.** (1995) An ecological/genetic approach to the study of enzymatic polymorphisms in *Drosophila maculifrons*. *Revista Brasileira de Genética* **18**, 147-164.
- Santa-Brígida, R., Schmitz, H.J. & Martins, M.B.** (2017) Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the state of Pará (Brazil). *Biota Neotropica* **17**(1), e20160179.
- Singh, Y.T., Mazumdar-Leighton, S., Saikia, M. et al** (2012) Genetic variation within native populations of endemic silkmoth *Antheraea assamensis* (Helfer) from Northeast India indicates need for *in situ* conservation. *PloS One* **7**(11), e49972.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.** (1995) Biometry, 3rd edn. Freeman, New York, p 813-819.
- Soliani, C., Rondan, J., Chiappero, D.S.M.B., Martinez, M., Da Rosa, E.G. & Gardenal, C.N.** (2010) Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* from Uruguay and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data. *Medical and Veterinary Entomology* **24**, 316-323.
- Spassky, B.** (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *University of Texas Publications* **5721**, 48-61.
- Spassky, B., Richmond, R.C., Pérez-Salas, S., Pavlovsky, O., Mourão, C.A., Hunter, A.S., Hoenigsberg, H., Dobzhansky, T. & Ayala, F.J.** (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni* and the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* **25**, 129-143.
- Tajima, F.** (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Tidon, R. & Sene, F.M.** (1988) A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Information Service* **67**, 90.

- Toro, M.A. & Caballero, A.** (2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**, 1367-1378.
- Trieu, L.N., Mien, N.T., Tien, T.V., Ket, N.V. & Duy, N.V.** (2016) Genetic diversity of *Panax stipuleanatus* Tsai in North Vietnam detected by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **30**(3), 506-511.
- Valente, V.L.S. & Araújo, A.M.** (1985) Observations on the chromosomal polymorphism of natural populations of *Drosophila willistoni* and its association with the choice of feeding and breeding sites. *Revista Brasileira de Genética* **8**, 167-173.
- Valente, V.L.S. & Araújo, A.M.** (1986) Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in Southern Brazil. *Heredity* **57**(2), 149-160.
- Valente, V.L.S., Goni, B., Valiati, V.H., Rohde, C. & Morales, N.B.** (2003) Chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* populations from Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* **26**(2), 163-173.
- Valente, V.L.S., Rohde, C., Valiati, V.H., Morales, N.B. & Goni, B.** (2001) Chromosome inversion occurring in Uruguayan populations of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* **84**, 55-59.
- Valente, V.L.S., Ruzsczyk, A. & Santos, R.A.** (1993) Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Revista Brasileira de Genética* **16**(2), 307-319.
- Vaulin, O.V. & Zakharov, I.K.** (2008) Temporal dynamics and variation of multilocus ISSR-PCR DNA markers in the Uman' Population of *Drosophila melanogaster* over two decades (1984–2004). *Russian Journal of Genetics* **44**(3), 359–365.
- Wolfe, A.D. & Liston, A.** (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Plant Molecular Systematics II* (eds Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ), pp. 43-86. Chapman Hall, New York.
- Yang, J., Tian, L., Baoyun, X. et al** (2015) Insight into the migration routes of *Plutella xylostella* in China using mtCOI and ISSR markers. *PloS One* **10**(6), e0130905.
- Yeh, F.C. & Boyle, T.J.B.** (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* **129**, 157-163.

- Yu, H., Nason, J.D., Ge, X. & Zeng, J.** (2010) Slatkin's paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*. *Molecular Ecology* **19**: 4441-4453.
- Zanini, R., Deprá, M. & Valente, V.L.S.** (2015a) On the geographic distribution of the *Drosophila willistoni* group (Diptera, Drosophilidae) - updated geographic distribution of the Neotropical willistoni subgroup. *Drosophila Information Service* **98**, 39-43.
- Zanini, R., Deprá, M. & Valente, V.L.S.** (2015b) Can sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup be recognized through combined microscopy techniques? *Revista Brasileira de Entomologia* **59**, 323–331.
- Zanini, R., Deprá, M. & Valente, V.L.S.** (2016) Ultrastructural characterization of the pre-adult stages of *Drosophila willistoni* species group (Diptera, Drosophilidae). *Trends in Entomology* **12**, 43-50.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D.** (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**, 176-183.

### Tables and Figures

Table 1. Nucleotide sequence of ISSR primers and specific annealing temperature, used for natural Brazilian populations of *Drosophila willistoni*.

Primer	Primer abbreviation (5'-3')	T (°C) of PCR annealing
807	(AG) <sub>8</sub> T	50.4
808	(AG) <sub>8</sub> C	52.8
842	(GA) <sub>8</sub> YG	54.0
844	(CT) <sub>8</sub> RC	52.8
868	(GAA) <sub>6</sub>	49.7
873	(GACA) <sub>4</sub>	52.0

R = (nucleotides A or G); Y = (nucleotides C or T).

Table 2. Population diversity produced by six ISSR primers (Table 1) in *Drosophila willistoni* populations (Figure 1).

Biome	Population Code	Number of polymorphic bands	Percentage polymorphic bands (%)	Expected heterozygosity ( $H_e$ )	Nei's Index of diversity ( $h$ )	Shannon's Information index ( $I$ )
Amazon Forest						
	BEL	111	92.5	0.40 (0.13)	0.2882 (0.1568)	0.4419 (0.2068)
Atlantic Forest						
	GUA	118	98.3	0.42 (0.11)	0.3087 (0.1236)	0.4764 (0.1542)
	PDI	114	95.0	0.40 (0.12)	0.3042 (0.1478)	0.4645 (0.1917)
	BJC	114	95.0	0.39 (0.14)	0.3110 (0.1572)	0.4581 (0.2055)
	SAL	114	95.0	0.41 (0.12)	0.3118 (0.1525)	0.4728 (0.1962)
	JEQ	116	96.7	0.42 (0.12)	0.3295 (0.1424)	0.4961 (0.1826)
Cerrado						
	BRA	115	95.8	0.41 (0.12)	0.3184 (0.1413)	0.4834 (0.1808)
	SER	112	93.0	0.40 (0.13)	0.3003 (0.1564)	0.4566 (0.2063)
Mean		114.25	95.2	0.41	0.3090125	0.468725

BEL (Marituba, Pará state), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Paraíba state), PDI (State Park of Dois Irmãos, Pernambuco state), BJC (Ecological Park João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco state), SAL (Biological Reserve of Saltinho, Pernambuco state), JEQ (Jiquiriçá Municipality, Bahia state), BRA (Biological Reserve of IBGE, Distrito Federal), SER (Serra da Canastra, Minas Gerais state). Standard deviations are indicated between parentheses.

Table 3. (A) Nei's genetic identity between each population pair based on ISSR markers; (B) geographic distances (km) between each population pair (above diagonal) and coefficient of gene differentiation ( $F_{ST}$ ) (below diagonal); (C) the estimated gene flow ( $Nm$ ) (above diagonal) for all pairwise comparisons between populations of *Drosophila willistoni*.

	Amazon Forest	Atlantic Forest					Cerrado	
	BEL	GUA	PDI	BJC	SAL	JEQ	BRA	SER
(A)								
BEL	****							
GUA	0.9367	****						
PDI	0.9545	0.9552	****					
BJC	0.9569	0.9670	0.9657	****				
SAL	0.9684	0.9574	0.9680	0.9746	****			
JEQ	0.9598	0.9568	0.9687	0.9622	0.9703	****		
BRA	0.9550	0.9407	0.9532	0.9679	0.9703	0.9517	****	
SER	0.9469	0.9538	0.9571	0.9661	0.9687	0.9531	0.9546	****
(B)								
BEL	****	1570	1651	1563	1662	1627	1612	2106
GUA	0.1095	****	144	204	222	870	1719	1940
PDI	0.0696	0.0770	****	125	83	772	1650	1847
BJC	0.0755	0.0444	0.0554	****	103	667	1528	1740
SAL	0.0469	0.0659	0.0339	0.0334	****	696	1587	510
JEQ	0.0657	0.0558	0.0303	0.0540	0.0361	****	940	1075
BRA	0.0723	0.0883	0.0642	0.0432	0.0379	0.0729	****	510
SER	0.0893	0.0801	0.0583	0.0516	0.0327	0.0675	0.0652	****
(C)								
BEL	****							
GUA	6.72	****						
PDI	9.23	9.86	****					
BJC	9.68	13.30	12.64	****				
SAL	13.51	10.55	13.91	17.39	****			
JEQ	10.99	10.82	14.76	12.129	15.829	****		
BRA	9.62	7.70	9.65	13.939	15.489	9.91	****	
SER	7.85	9.48	10.09	12.689	14.079	9.75	9.84	****

BEL (Marituba, Pará state), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Paraíba state), PDI (State Park of Dois Irmãos, Pernambuco state), BJC (Ecological Park João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco state), SAL (Biological Reserve of Saltinho, Pernambuco state), JEQ (Jiquiriçá Municipality, Bahia state), BRA (Biological Reserve of IBGE, Distrito Federal), SER (Serra da Canastra, Minas Gerais state).

Table 4. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for ISSR in *Drosophila willistoni*.

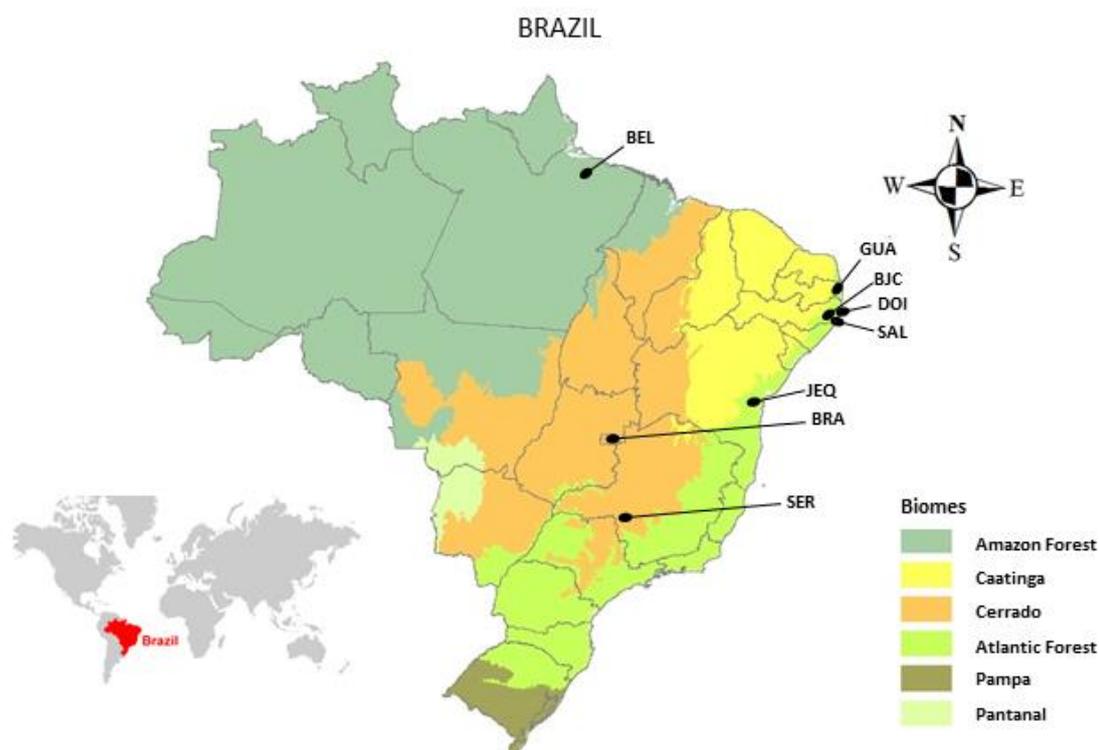
Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	364.408	1.48848	6.02
Within populations	3416.005	23.23813	93.98
Total	3780.413	24.72660	100
$F_{ST}$	0.0620		

Table 5. Index of neutrality and populational expansion of *Drosophila willistoni* sampled in Brazilian biomes.

Samples	Tajima's D		FS Fu	
	D	p	Fs	p
Amazon Forest				
BEL	1.64021	0.92500	-3.78904	0.04300*
Atlantic Forest				
GUA	2.00520	0.96900	-3.38522	0.08400
PDI	1.78091	0.96900	-3.61748	0.05000
BJC	1.57804	0.94300	-3.33151	0.06300
SAL	1.83759	0.95900	-3.58578	0.06900
JEQ	2.05513	0.98200	-3.41338	0.06000
Cerrado				
BRA	1.62866	0.95000	-2.17210	0.13600
SER	1.70029	0.94800	-3.72296	0.04200*
Mean	1.77825	0.95425	-3.37718	0.06838

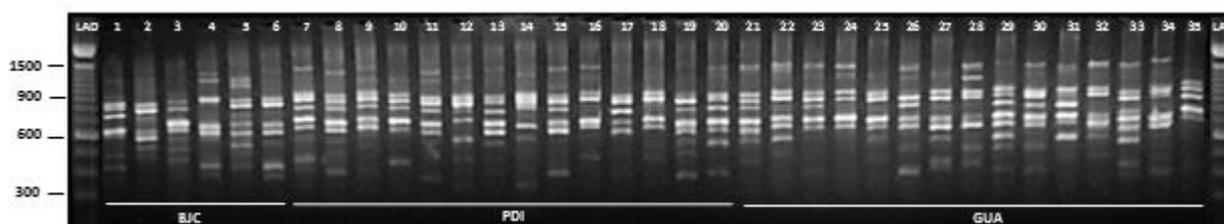
D=Tajima's D-test (Tajima, 1989); Fs=Fu's FS-test (Fu, 1997); \* significant value ( $p < 0.05$ ). BEL (Marituba, Pará state), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Paraíba state), PDI (State Park of Dois Irmãos, Pernambuco state), BJC (Ecological Park João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco state), SAL (Biological Reserve of Saltinho, Pernambuco state), JEQ (Jiquiriçá Municipality, Bahia state), BRA (Biological Reserve of IBGE, Distrito Federal), SER (Serra da Canastra, Minas Gerais state).

Fig. 1. Highlight Brazil map, with indications of states and biomes sampled for *Drosophila willistoni* in rectangles.



BEL (Marituba municipality, Pará state, 1°25'59.6"S, 48°19'22.2"W), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Mamanguape, Paraíba state, 6°44'30.0"S, 35°08'32.7"W), DOI (State Park of Dois Irmãos, Recife, Pernambuco state, 8°00'30.9"S, 34°56'47.1"W), BJC (Ecologic Park João Vasconcelos Sobrinho, Caruaru, Pernambuco state, 8°22'01.2"S, 36°01'26.5"W), SAL (Biological Reserve of Saltinho, Tamandaré, Pernambuco state, 8°43'57.8"S, 35°10'21.0"W), JEQ (Jiquiriçá Municipality, Bahia state, 13°14'58.6"S, 39°34'60.0"W), BRA (Ecological Reserve of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), Brasília, Distrito Federal, 15°55'47.0"S, 47°52'16.6"W), SER (Serra da Canastra, São Roque de Minas, Minas Gerais state, 20°20'01.5"S, 46°28'07.7"W).

Fig. 2. Samples of ISSR bands of *Drosophila willistoni* with primers (CT)<sub>8</sub>RC (columns 1-35). DNA size standards (LAD) are placed on both margins of the gels, and the sizes in base pairs are indicated on the left. BJC (Ecologic Park João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco state), PDI (State Park of Dois Irmãos, Pernambuco state), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Paraíba state).



### Supplementary material

Table S1. Polymorphic index tested as criterion to select primers ISSR in this study. The best indices were the first six, with the highest values of PIC, MI and RP.

Primers ISSR	Total ISSR bands	Polymorphic bands	Monomorphic bands	Polymorphism frequency (%)	PIC	MI	RP
807	13	13	0	1	0.41	3.437692	8.500000
868	12	11	1	0.916667	0.40	3.072667	7.700000
842	9	9	0	1	0.42	3.519600	0.660000
808	9	9	0	1	0.40	3.352000	0.640000
844	12	12	0	1	0.38	3.184400	0.580000
873	11	11	0	1	0.30	2.514000	0.470000
809	8	7	1	0.875	0.34	2.493050	4.200000
848	9	9	0	1	0.32	2.681600	0.460000
847	4	4	0	1	0.32	2.681600	0.420000
840	10	8	2	0.8	0.21	1.407840	0.260000
850	9	8	1	0.888889	0.24	1.787733	0.320000
851	7	4	3	0.571429	0.23	1.101371	0.360000
876	8	4	4	0.5	0.19	0.796100	0.300000
Total	121	109	12	0.888614	0.32	2.463820	1.913077

PIC = Polymorphism Information Content; MI= Marker Index; RP= Resolving Power.

Table S2. Population parameters estimated by the HICKORY for the  $f=0$  model to 120 ISSR bands obtained in *Drosophila willistoni*.

Parameters	Mean	sd	2.5%	50%	97.5%
<i>Theta-I</i>	0.138	0.012	0.115	0.137	0.166
<i>Theta-II</i>	0.039	0.003	0.032	0.038	0.046
<i>Theta-III</i>	0.033	0.002	0.028	0.033	0.038
<i>Theta-Y</i>	0.104	0.013	0.081	0.102	0.131
<i>rho</i>	0.747	0.031	0.683	0.748	0.806
<i>hs</i> [BEL]	0.315	0.005	0.306	0.315	0.325
<i>hs</i> [GUA]	0.325	0.005	0.315	0.325	0.335
<i>hs</i> [PDI]	0.323	0.005	0.313	0.323	0.333
<i>hs</i> [BJC]	0.316	0.005	0.306	0.316	0.325
<i>hs</i> [SAL]	0.324	0.005	0.314	0.324	0.333
<i>hs</i> [JEQ]	0.336	0.005	0.326	0.336	0.345
<i>hs</i> [BRA]	0.330	0.005	0.319	0.329	0.339
<i>hs</i> [SER]	0.319	0.005	0.309	0.319	0.328
<i>Hs</i>	0.323	0.002	0.319	0.323	0.328
<i>Ht</i>	0.335	0.002	0.331	0.335	0.339
<i>Gst-B</i>	0.034	0.002	0.029	0.034	0.040
Dbar	3900.29				
Dhat	3352.44				
pD	547.85				
DIC	4448.14				

sd = standard deviation; 2.5%, 50% e 97.5% are the percent of significance. BEL (Marituba, Pará state), GUA (Biological Reserve of Guaribas, Paraíba state), PDI (State Park of Dois Irmãos, Pernambuco state), BJC (Ecological Park João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco state), SAL (Biological Reserve of Saltinho, Pernambuco state), JEQ (Jiquiriçá Municipality, Bahia state), BRA (Biological Reserve of IBGE, Distrito Federal), SER (Serra da Canastra, Minas Gerais state).

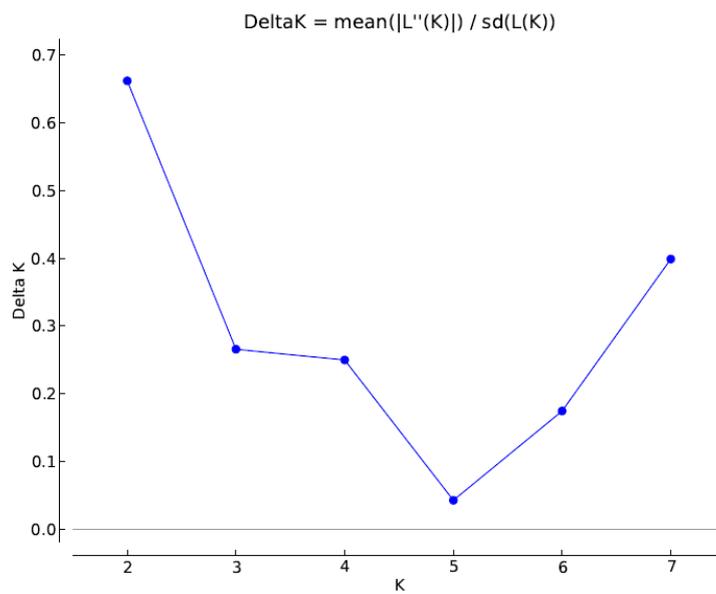


Fig. S1. Evanno's delta K graph, obtained for each K value in eight populations of *Drosophila willistoni* for ISSR data. The highest peak was K=2 and other, lowest K=7.

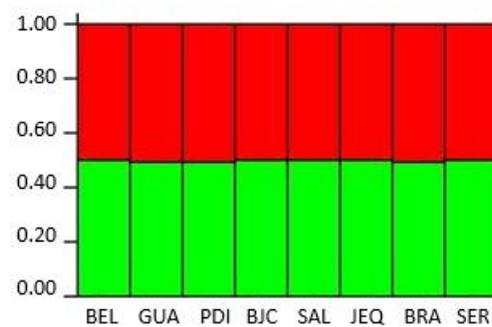


Fig. S2. Ancestry of each *Drosophila willistoni* population (vertical bar) in either of the two groups plotted by the software Structure. Each vertical bar represents 16-20 of 156 individuals analyzed for each population.

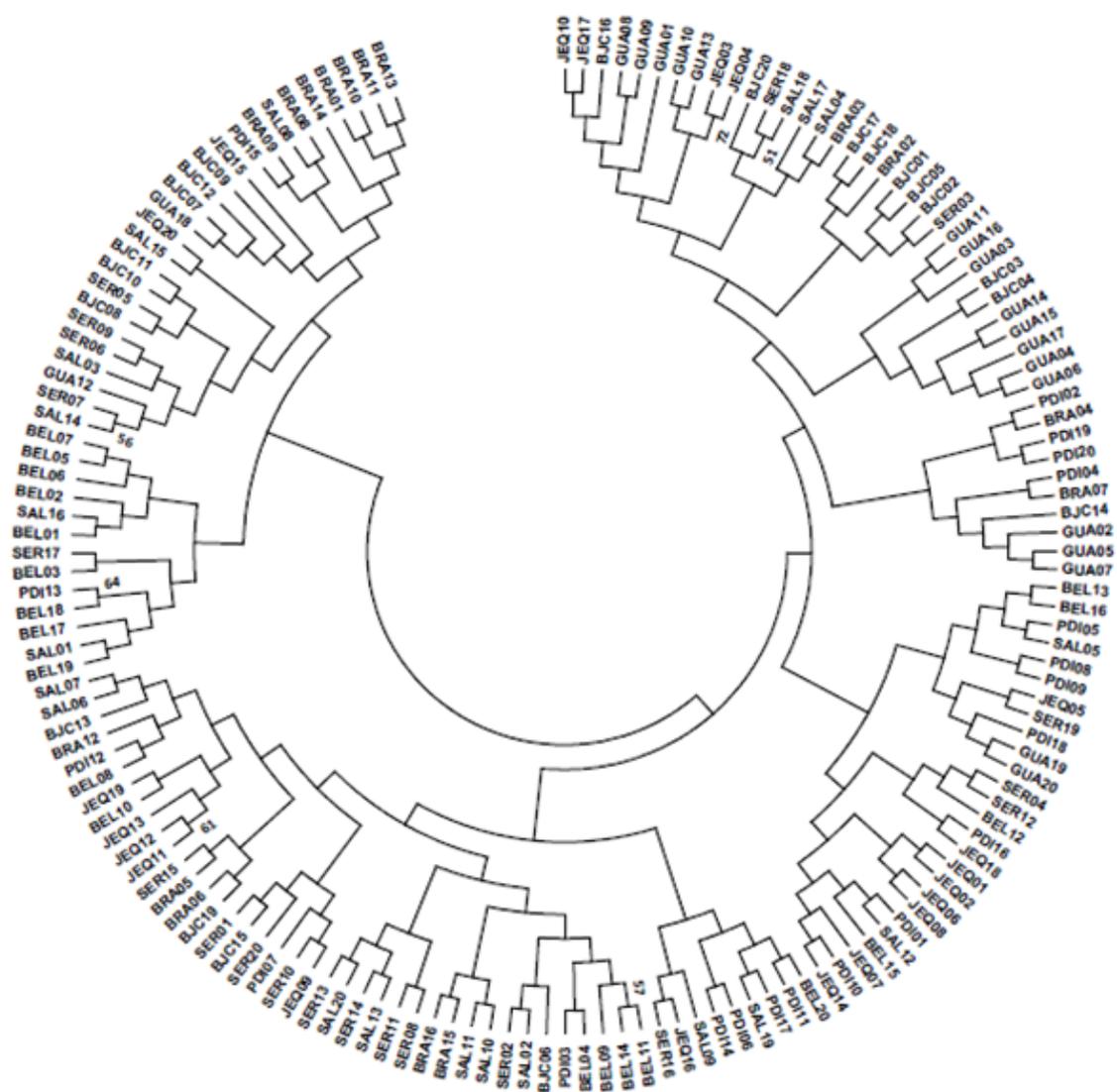


Fig. S3. Fenogram of cluster of individuals (represented by letters and number) of each population of *Drosophila willistoni* based in ISSR data, using the Neighbor-Joining method and  $p$ -distance model, with 103 replicates of bootstrap.

## 5 Capítulo II

### Artigo 2



Artigo a ser submetido à revista *G3: Genes, Genomes, Genetics*

ISSN: 2160-1836

Fator de impacto 2016: 3.37 (B1 – CBI)

Normas para submissão estão no Anexo 2

### **Evidências de expansão populacional em *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae)**

Zilpa das Graças Silva de Melo<sup>1</sup>, Martín Alejandro Montes<sup>2</sup>, Paloma da Silva<sup>3</sup>,  
Jaqueline Alves Nery de Mendonça<sup>3</sup>, Geórgia Fernanda Oliveira<sup>3</sup>, Ana Cristina Lauer  
Garcia<sup>3</sup>, Rita de Cassia de Moura<sup>4</sup>, Claudia Rohde<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Bioquímica, Genética e Sequenciamento, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil.

\* Correspondência para Claudia Rohde, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. E-mail: claudia.rohde@yahoo.com.br

Palavras-chave: diversidade genética, estrutura demográfica, DNA mitocondrial, DNA nuclear, gene *HCF*.

## Resumo

*Drosophila willistoni* é uma das espécies mais abundantes de *Drosophila* na região neotropical. É considerada uma das espécies mais polimórficas cromossomicamente e diversa enzimaticamente. A diversidade genética é importante para a aptidão dos indivíduos e populações na natureza, ao longo do tempo. Portanto, a distribuição da diversidade genética pode contribuir para a compreensão das tendências demográficas da espécie. Neste trabalho, utilizamos sequências das subunidades I e II do gene mitocondrial *Cytochrome c oxidase* (*COI* e *COII*) e do gene nuclear *Host Cell Factor* (*HCF*), analisando *D. willistoni* de nove localidades do Brasil. Em um total de 225 sequências, 70 haplótipos foram revelados para *COI*, 30 para *COII* e 9 para *HCF*, caracterizando elevada diversidade nucleotídica e haplotípica, considerando as diferenças de pares de bases entre os haplótipos. As relações entre os haplótipos não apontaram estruturação geográfica da diversidade genética. A análise de variância molecular e os valores da estatística  $F_{ST}$  ( $F_{ST}=0,0507$ ,  $F_{ST}=0,0510$  e  $F_{ST}=0,1529$ , respectivamente) revelaram que a maior parte da variação genética em *D. willistoni* está contida no nível intrapopulacional (94,93%, 94,89% e 84,70%, respectivamente), e apenas uma fração sutil entre os grupos de populações (5,07%, 5,10% e 15,29%, respectivamente). A análise em rede de haplótipos e os valores de  $F_s$  de Fu e  $D$  de Tajima, que revelaram-se negativos e significativos, indicaram que as populações de *D. willistoni* sofreram eventos de expansão populacional recente. Este cenário também foi confirmado através da análise de distribuição *mismatch*, na qual distribuições unimodais foram encontradas para todas as populações, contribuindo para um melhor entendimento sobre aspectos genético-populacionais de *D. willistoni*.

## Introdução

A variação genética é a base do processo evolutivo, fundamental para a seleção natural e para a adaptação das espécies. A genética populacional trata de descrever e explicar como as forças evolutivas controlam a variação genética, dentro

e entre as populações (Lewontin, 1974, 2002). Populações naturais são consideradas dinâmicas, pois variam de tamanho, densidade e localização espacial e/ou temporal no ambiente, podendo, inclusive, se fragmentarem em muitas subpopulações, ou fundirem-se em outras (Hey e Machado, 2003).

O estudo genético de populações de uma espécie, associado aos ambientes naturais de sua ocorrência, são aspectos que se complementam, pois quanto maior a variabilidade genética ou número de alelos de uma população, maior a capacidade de adaptação e suas chances de sobreviver às alterações ambientais (Powell, 1997; Mateus e Sene, 2003; Eyre-Walker, 2006; Tidon, 2006; Markow e O'Grady, 2007; Hales et al., 2015; Markow, 2015). Espécies e populações do gênero *Drosophila* tem servido como modelos experimentais por excelência para inspirar e testar teorias da genética de populações (Powell, 1997; Brito et al., 2000a,b).

Dentro de *Drosophila* (subgênero *Sophophora*) está o grupo *willistoni*, composto por 24 espécies com distribuição neotropical (Spassky et al., 1971), e dividido em dois principais subgrupos, o subgrupo não críptico *alagitans-bocainensis*, constituído por 18 espécies, sendo as mais estudadas *Drosophila nebulosa*, *D. capricorni* e *D. fumipennis*; e o subgrupo *willistoni*, constituído por seis espécies crípticas, ou morfologicamente muito semelhantes, que são: *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* (constituída por seis semiespécies), *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana* (Val et al., 1981).

*Drosophila willistoni* destaca-se dentro de *Drosophila* por ser uma das espécies de Drosophilidae mais abundantes (Martins, 1987; Silva et al., 2005; Gottschalk et al., 2007; Bizzo et al., 2010; Poppe et al., 2012; Garcia et al., 2014; Monteiro et al., 2016; Coutinho-Silva et al., 2017), encontrada em uma vasta zona da região neotropical, que vai desde o México, ao Uruguai e Argentina (Spassky et al., 1971; Ehrmann e Powell, 1982). Também apresenta grande polimorfismo para inversões paracêntricas nos cromossomos politênicos (Rohde e Valente, 2012).

Apesar destas características, populações naturais de *D. willistoni* são pouco exploradas para a análise da variabilidade genética baseada principalmente em genes nucleares, mas também para genes mitocondriais. Isso porque os trabalhos ou analisaram poucas amostras da espécie (Powell et al., 2011) ou usaram

marcadores mitocondriais para estudos com enfoque filogenético, e não voltados a filogeografia (Gleason et al., 1998; Powell et al., 2003; Robe et al., 2010). Avaliar padrões populacionais do ponto de vista genético, utilizando simultaneamente sequências parciais de genes mitocondriais e nucleares é fundamental para obter medidas preditivas da história populacional (Emerson et al., 2001).

As subunidades I e II do gene mitocondrial *citocromo c oxidase* se apresentam como alvos ricos de informações sobre a história evolutiva de diversos organismos (Avisé et al., 1987), e por isto têm sido utilizadas tanto em estudos filogenéticos, quanto em estudos populacionais e de filogeografia em diferentes espécies de *Drosophila* (Brito et al., 2002a,b; Hurtado et al., 2004; Mirol et al., 2007; Pfeiler et al., 2007; Richmond et al., 2013, De Ré et al., 2014; Gustani et al., 2015).

Neste trabalho foram investigados aspectos genéticos associados a eventos demográficos de *D. willistoni* a partir da análise da variabilidade genética e da estrutura populacional de sequências nucleotídicas dos genes *COI* e *COII*, e do gene nuclear *Host Cell Factor (HCF)*.

## **Material e Métodos**

### **Coleta e identificação taxonômica de *D. willistoni***

Adultos de *D. willistoni* foram coletados entre 2013 e 2015, em nove localidades do Brasil, incluindo os biomas Floresta Atlântica, Floresta Amazônica e Cerrado (Figura 1). As nove coletas foram realizadas com armadilhas feitas de garrafas plásticas e banana fermentada como isca (10 armadilhas por local). Por pertencer a um grupo de espécies crípticas, fêmeas de *D. willistoni*, oriundas da natureza, foram identificadas taxonomicamente e indiretamente pela análise da genitália dos machos de sua prole.

### **Extração do DNA e análise das sequências**

Cerca de 10 indivíduos de cada isolinhagem foram submetidos ao processo de extração do DNA total, através da maceração manual das moscas em tubos eppendorf 1,5mL com auxílio de estilete de plástico. O protocolo utilizado, assim como os reagentes da extração foram da Gentra Puregene Cell (QIAGEN). A

amplificação do gene mitocondrial *Citocromo oxidase I* foi realizada com *primers* desenhados por Miller, W. (comunicação pessoal) (*Forward*: 5'ATTCAGAATAACTAT GTTCAG3' e *Reverse*: 5'-TTTAATTTTACCTGGATTTGG-3') e o *Citocromo oxidase II* foi amplificado de acordo com Liu e Beckenbach (1992) (*Forward*: tLEU 5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3' e *Reverse*: tLYS 5'-GTTTAAGGGACCAGTACTTG-3').

As reações de PCR para os genes mitocondriais foram realizadas em 20 µL de volume, contendo 10 µL de água, 3,0 µL de tampão da enzima (10x), 3,0 µL de cloreto de magnésio (25 mM), 0,6 µL de solução de dNTP (10 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 µM), 0,4 µL de *Taq* polimerase (2,0 U) (*kit* Invitrogen), e 1 µL de DNA (50-100 ng). A amplificação foi realizada a partir de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

A amplificação do gene nuclear *Host Cell Factor (HCF)* foi realizada utilizando um par de *primers* (*forward*: 5'CAGTGGTATGTGCCGGTGTGAAGG3'; *reverse*: 5'GTACACTTCCACTCGCGTTTCAGTGG-3') desenhado *in silico*, utilizando a ferramenta Oligo Analyzer 3.1 disponível em ([www.idtdna.com/calc/analyzer](http://www.idtdna.com/calc/analyzer)) e dados do genoma de *D. willistoni* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

As reações de PCR para o gene nuclear *HCF* foram realizadas em 20 µL de volume, contendo 14 µL de água, 2,0 µL de tampão da enzima (10x), 0,4 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 0,6 µL de solução de DNTP (10 mM), 0,8 µL de cada *primer* (10 µM), 0,4 µL de *Taq* polimerase (2,0 U) (*kit* Invitrogen), e 1 µL de DNA (50-100 ng). As condições de amplificação utilizadas foram: pré-desnaturação de 5 min a 94°C (1 ciclo); desnaturação de 1 min a 94°C (35 ciclos); anelamento do *primers* de 1 min a 56,3°C (35 ciclos); extensão de 1 min a 72°C (35 ciclos); extensão final de 5 min a 72°C (1 ciclo).

Para conferência do sucesso da amplificação, os fragmentos de DNA amplificados dos genes mitocondriais e do nuclear foram corados com GelRed (diluição 1:500) e visualizados sob luz UV em gel de agarose (1,0%) preparado em tampão TBE 1x (Tris-Base 0,89 M; Boric Acid 0,89 M; EDTA 0,5 M pH 8,0).

Os fragmentos foram purificados e sequenciados em ambos os sentidos pela empresa MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul). Para a análise da qualidade dos cromatogramas foi utilizado o programa *Ape A Plasmid Editor* versão 2.0.30 (M. Wayne Davis). As edições e alinhamentos das sequências foram feitos no programa *Geneious* versão 6.1.4 (Biomatters). A identidade das sequências foi conferida com o genoma sequenciado de *D. willistoni* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007) por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **Análise da diversidade genética**

A análise de polimorfismo foi realizada individualmente para cada um dos dois genes mitocondriais (*COI* e *COII*) e nuclear (*HCF*) utilizando o programa DnaSP 5.10.01 (Librado e Rozas, 2009), onde foram calculados a diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ), número de haplótipos ( $h$ ), diversidade de haplótipos ( $Hd$ ) e número de sítios polimórficos ( $P$ ).

Filogramas foram gerados a partir da análise de máxima parcimônia no programa PAUP versão 4.0 (Swofford, 2002) para determinar as relações filogenéticas dos haplótipos dos genes mitocondriais (*COI* e *COII*) e nuclear (*HCF*), e os locais de origem das amostras. Como *outgroup* para cada gene, foram utilizadas sequências de *Drosophila melanogaster*, disponíveis no GenBank.

### **Análise demográfica**

A análise da estrutura demográfica de *D. willistoni* foi realizada através do índice de diferenciação genética  $F_{ST}$  (Wright, 1978) e Análise de Variação Molecular (AMOVA), no programa Arlequin versão 3.5.1.3 (Excoffier e Lischer 2010). O índice  $F_{ST}$  foi interpretado de acordo Hartl e Clark (1997), que considera  $F_{ST} < 0.05$  como baixo nível de diferenciação genética,  $0,05 \leq F_{ST} < 0.15$  como nível médio de diferenciação genética,  $0,15 \leq F_{ST} \leq 0,25$  como nível alto de diferenciação genética, e  $F_{ST} > 0.25$ , como nível muito alto de diferenciação genética. Para verificar a presença de subpopulações na espécie *D. willistoni*, a partir de diferenças na frequência de alelos, com base em probabilidades, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard et al. 2000).

Para verificar desvios em relação à neutralidade, as amostras para cada gene foram submetidas aos testes  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997) no programa Arlequim versão 3.5.1.3. Para verificar a relação parcimoniosa entre os haplótipos, uma rede de haplótipos foi construída no programa Network (Bandlet et al., 1999), com base em uma matriz de distância entre pares.

A distribuição *pair-wise* das diferenças de nucleotídeos (distribuição *mismatch*) foram calculadas como um teste adicional para expansão demográfica (Rogers e Harpending, 1992), usando DnaSP 5.10.01.

## Resultados

### Diversidade genética

No total foram analisadas 225 sequências parciais de genes de *D. willistoni* de nove locais do Brasil. O número de sequências obtidas por gene, e por local, está indicado na Tabela 1. A quantidade de sequências analisadas por gene variou devido a dificuldades na amplificação ou na qualidade dos sequenciamentos. Os tamanhos sequenciados foram: 756 pb para *COI*, 772 pb para *COII* e 641 para *HCF*.

De acordo com as análises da diversidade genética apresentadas na Tabela 2, o gene *COI* apresentou o maior número de sítios polimórficos ( $P$ ) e a maior diversidade haplotípica ( $Hd$ ), seguido pelo gene *COII*. Por outro lado, o gene *HCF* apresentou um baixo número de sítios polimórficos e uma baixa diversidade haplotípica. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) encontrada variou de moderada a alta entre os genes, sendo maior em *COI* e menor em *HCF*.

Os filogramas construídos com base na estatística de máxima verossimilhança para os genes *COI* (Figura 2), *COII* (Figura 3) e *HCF* (Figura 4), não apresentaram partição das amostras de *D. willistoni*, e esta falta de agrupamentos indicam que as amostras não apresentaram homogeneidade dentro das populações, ao mesmo tempo diferenças entre elas capazes de distingui-las. As análises de rede de haplótipos estão apresentadas na Figura 5. O haplótipo mais frequente para *COI* (Figura 5A) apareceu 14 vezes (Tabela 2), o mais frequente para *COII* (Figura 5B) apareceu 38 vezes (Tabela 2), e o mais frequente para *HCF* (Figura 5C) apareceu 19 vezes (Tabela 2), justificando os aspectos de estrela. Os haplótipos menos

frequentes apareceram de duas a cinco vezes, enquanto que os raros apareceram apenas uma vez e foram exclusivos para cada população.

O índice  $F_{ST}$  variou de baixa a moderada diferenciação genética entre os três genes, conforme indicado na Tabela 3. Os resultados foram confirmados pela AMOVA, que mostrou uma maior variação dentro das populações e menor entre elas, para estes genes. A diferenciação genética encontrada, não foi suficiente para revelar agrupamentos correspondentes às populações investigadas (Figura 6). O valor de Delta K foi maior para K=2 (Figura 6).

### **Análise demográfica**

Ambos os testes  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu tiveram valores negativos com forte significância (para os genes mitocondriais, e gene nuclear (Tabela 4), evidenciando expansão populacional em *D. willistoni*. Apoiando estes resultados, as amostras estudadas apresentaram padrões unimodais das curvas de distribuição *mismatch*, conforme esperado nos casos de expansão populacional (Figura 7 A, B e C).

### **Discussão**

As sequências de DNA contêm variações nucleotídicas, a partir das quais, é possível fazer inferências sobre a frequência, o modo e a força da seleção natural atuando no genoma (Markow, 2015). Neste estudo, os genes mitocondriais *COI* e *COII* de *D. willistoni* se mostraram variáveis, com 16,8% e 12,7% de polimorfismo, respectivamente, enquanto que o gene *HCF* mostrou variação de 2%. Estas diferenças entre os genes correspondem ao esperado, visto que genes mitocondriais costumam apresentar uma taxa de mutação mais elevada, em comparação aos genes nucleares, que são mais conservados (Simon et al., 1994).

Os resultados de diversidade para *COI* em nove populações de *D. willistoni* ( $Hd=0,976$ ,  $\pi=0,00868$ ) revelaram valores superiores aos obtidos por Müller et al. (2012) para o mesmo gene ( $Hd=0,700$ ,  $\pi=0,00204$ ), em amostras de *D. willistoni* do Sul do Brasil. Embora a região gênica aqui estudada seja distinta da região investigada por Müller et al. (2012), que incluiu a região barcode do gene *COI*, uma maior diversidade era esperada em nossos estudos visto que as amostras de

populações estudadas são, geograficamente, mais distantes entre si, além de oriundas de biomas bastante distintos. Da mesma forma, os resultados de  $Hd$  e  $\pi$  encontrados neste trabalho foram altos, considerando os obtidos para  $COI$  por Mardiros et al. (2016) para populações de *D. willistoni* da região da América Central ( $Hd=0,571$ ,  $\pi=0,00190$ ) estudada pelos autores, e foram mais similares aos da região da América do Sul ( $Hd=0,984$ ,  $\pi=0,00450$ ). Conforme indicado, a medida de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi muito superior em nosso estudo, comparando com resultados de Muller et al (2012) e Mardiros et al. (2016). Da mesma forma que Müller et al. (2012), a região gênica estudada por Mardiros et al. (2016) foi a região barcode, diferente da região deste estudo.

Os valores de  $\pi$  obtidos neste estudo também foram maiores do que os valores obtidos em outras espécies de *Drosophila* (Brito et al., 2000a; Hurtado et al., 2004; Mirol et al., 2008; Richmond et al., 2013; Franco e Manfrin, 2013; De Ré et al., 2014; Gustani et al., 2015). No entanto, Franco e Manfrin (2013) encontraram valores maiores de  $\pi$  no gene  $COI$  em *Drosophila seriema* e *Drosophila gouveai*; e Moraes et al. (2009) encontrou valor maior em *D. gouveai*.

A diversidade haplotípica e nucleotídica encontrada neste trabalho para o gene  $HCF$  foi de moderada a alta ( $Hd=0,600$ ,  $\pi=0,00209$ ), se comparada a outros genes do elemento F estudados por Powell et al. (2011) em duas populações geograficamente distantes de *D. willistoni*, do Equador (América do Sul) e da Ilha de Santa Lucia, nas Antilhas. Os valores de diversidade obtidos foram: para o gene *Cubitus interruptus* ( $Hd=0,440$ ,  $\pi=0,0008$ ), para *Ankyrin* ( $Hd=0,059$ ,  $\pi=0,0002$ ), para *Toy* ( $Hd=0,455$ ,  $\pi=0,0019$ ) e para *Eyeless* ( $Hd=0,767$ ,  $\pi=0,0036$ ).

É possível que a diversidade haplotípica e nucleotídica aumente nos genes mais próximos ao ponto de fusão E+F, uma região que passou por grandes rearranjos cariotípicos ao longo da história evolutiva das espécies do subgrupo *willistoni* (Papaceit e Juan 1998; Powell et al. 2011; Pita et al., 2014). Este é o caso do gene  $HCF$ , cuja localização *in situ* no cromossomo foi definida por Silva (2016) como a mais próxima da fusão com o elemento E. O segundo gene conhecido mais próximo deste ponto, é o gene *Eyeless* (Papaceit e Juan, 1998, Pitta et al., 2014). De acordo com Begun e Aquadro, (1992) há evidências consistentes da relação entre níveis de polimorfismos e taxas de recombinação cromossômica, com uma relação

direta entre os dois fenômenos. Em *D. willistoni*, esta hipótese poderá ser melhor discutida com a continuidade dos estudos de variabilidade genética em outros genes do elemento F e análise conjunta com mais resultados.

Vários fatores têm sido sugeridos como modeladores da variabilidade e estrutura genética de populações naturais (Ellegren e Galtier, 2016), entre elas, as varreduras seletivas no DNAm. Para o gene *COI*, o sucesso da infecção pela bactéria *Wolbachia pipientis* (herdada verticalmente pela via materna), pode estar também disseminando haplótipos mitocondriais específicos (Shoemaker et al., 2004).

Esta hipótese já foi testada por Müller et al (2012) entre linhagens infectadas e não infectadas de *D. willistoni*, sem resultados conclusivos da ocorrência do fenômeno de varredura seletiva no DNAm. Entretanto, esta hipótese é plausível e poderá ser testada no futuro com mais amostras, visto que *D. willistoni* é reconhecida como infectada por *W. pipientis* (Miller e Riegler, 2006, Müller et al., 2012, 2013) e este endossimbionte pode agir de modo a aumentar ou reduzir a variabilidade genética do DNAm.

Os genes mitocondriais *COI* e *COII* revelaram baixa diferenciação genética e baixa estruturação populacional para *D. willistoni*. Já o gene nuclear *HCF* apresentou uma moderada diferenciação genética, mas não agrupamentos entre as populações. Esta baixa estruturação está de acordo com resultados obtidos através de dados de ISSR (dados não mostrados) e parece estar relacionado ao alto fluxo gênico encontrado para a espécie.

Por fim, os resultados encontrados aqui sugerem que as populações naturais de *D. willistoni* estão em processo de expansão, que foi evidenciada pela baixa diferenciação genética entre as populações, pelo alto grau de politomia dos filogramas (Figuras 2 a 4), pelos resultados dos testes de  $D$  Tajima e  $F_s$  de Fu, pela análise da frequência de haplótipos em rede e pelo gráfico de distribuição *mismatch*. Dois outros trabalhos também sugerem expansão em *D. willistoni*, como Powell et al. (2011) em análises nos genes do elemento E+F, e Müller et al. (2012), com o gene *COI*. Expansão populacional também foi sugerida em outras espécies de *Drosophila* do Sul do Brasil, com marcadores mitocondriais em *Drosophila*

*maculifrons* (De Ré et al., 2014) e *D. ornatifrons* (Gustani et al., 2015). Segundo estes autores, a expansão populacional nestas espécies ocorreu após mudanças biogeográficas dos ambientes, influenciadas pelo paleoclima, associados a eventos recentes de fragmentação dos ambientes por ação antrópica (De Ré et al., 2014; Gustani et al., 2015). Modificações históricas dos ambientes podem, da mesma forma, terem sido as responsáveis pela expansão observada em *D. willistoni*, quando as florestas Atlântica, Amazônica e o Cerrado eram menos fragmentados e mais conectados entre si, representando mais recursos ecológicos a serem explorados, e viabilizando o processo de expansão.

### Agradecimentos

Os autores agradecem às Agências Financiadoras (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Pernambuco (PROPESQ-UFPE).

### Referências

- Avise JC, Arnold J, Bale RM, Bermingham E, Lamb T, Neigell JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489-522.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Begun DJ, Aquadro CF (1992) Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in *D. melanogaster*. *Nature* 356:519-520.
- Brito RA, Manfrin MH, Sene FM (2002a) Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet. Mol. Biol.* 25:161-171.
- Brito RA, Manfrin MH, Sene FM (2002b) Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. *Mol Phylogenet Evol* 22:131-143.
- Chakraborty R, Hopfe HD (1991) Analysis of population structure: a comparative study of different estimators of Wright's fixation indices. In: Rao C. R. and Chakraborty, R. (eds) *Handbook of Statistics*, vol. 8, pp. 203—254. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- Coutinho-Silva, Montes MA, Oliveira GF, Carvalho-Neto FG, Rohde C, Garcia ACL, (2017) Effects of seasonality on drosophilids (Insecta, Diptera) in the northern part of the Atlantic Forest, Brazil R.D. *Bull Entomol Res* 2:1-11.
- De Ré CFC, Gustani EC, Oliveira APF, Machado LPB, Mateus RP, Loreto ELS, Robe LJ (2014) Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera, Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. *Biol J Linnean Soc* 112(1):55-66.
- Drosophila* 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-218.
- Ehrman L, Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr JN (eds). London/New York, Academic Press v. 2 p. 193-225.
- Ellegren H, Galtier N (2016) Determinants of genetic diversity. *Nat Rev Genet.* 17(7):422-33.
- Emerson BC, Paradis E, Thébaud C (2001) Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends Ecol Evol* 16(12):707-716.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567.
- Eyre-Walker A (2006) The genomic rate of adaptive evolution. *Trends Ecol. Evol.* 21: 569-575.
- Franco FF, Manfrin MH (2013) Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. *J Biogeogr* 40:142-154.
- Fu Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Garcia ACL, Silva DMIO, Monteiro AGF, Oliveira GF, Montes MA and Rohde C (2014) Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. *Ann Entomol Soc Am* 107(5):975-982.
- Gleason JM, Griffith EC, Powell JR (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concept? *Evolution* 52:1093-1103.
- Gottschalk MS, De Toni DC, Hofmann PRP, Valente VLS (2007) Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. *Neotrop Entomol* 36:848-862.

- Gustani EC, Oliveira APF, Santos MH, Machado LP, Mateus RP (2015) Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from Atlantic Forest of Southern Brazil. *Zool Sci* 32(2):141-150.
- Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM, Roberts DM (2015) Genetics on the Fly: a primer on the *Drosophila* model system. *Genetics* 201(3):815-842.
- Hey J, Machado CA (2003) The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews* 4: 535-543.
- Hurtado LA, Erez TS, Castrezana TA (2004) Contrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric sonoran desert cactophilic *Drosophila*. *Mol Ecol* 13:1365-1375.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-1874.
- Lewontin RC (1974) *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia University Press.
- Lewontin RC (2002) Directions in evolutionary biology. *Annu Rev Genet.* 36:1-18.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Liu H, Beckenbach AT (1992) Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molec Phylog Evol* 1(1):41-52.
- Mardiros XB, Park R, Clifton B, Grewal G, KhizarAK, Markow TA, Ranz JM, Civetta A (2016) Postmating reproductive isolation between strains of *Drosophila willistoni*. *Fly* 10(4):162-171.
- Markow TA (2015) The Natural History of Model Organisms: The secret lives of *Drosophila* flies. *Elife* 4:e06793.
- Markow TA, O'Grady PM (2007) *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics* 177: 1269-1276.
- Martins M (1987) Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 3:195-218.
- Mateus RP, Sene FM (2003) Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). *Biochemical Genetics.* 41:219-233.
- Mirol PM, Routtu J, Hoikkala A, Butlin RK (2008) Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. *BMC Evol. Biol* 8:59.

- Monteiro LS, Garcia ACL, Oliveira GF, Rohde C (2016) High diversity of Drosophilidae in High-Altitude wet forests in Northeastern Brazil. *Neotrop Entomol* 45(3):265-273.
- Müller MJ, Von Mühlen C, Valiati VH, Valente VLS (2012) *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. *J. Invert. Pathol* 109: 152–155.
- Papaceit M, Juan E (1998) Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 6:49-54.
- Pfeiler E, Erez T, Hurtado LA, Markow TA (2007) Genetic differentiation and demographic history in *Drosophila pachea* from the Sonoran Desert. *Hereditas* 144(2):63-74.
- Pita S, Panzera Y, Valente VLS, Silva ZG, Garcia CF, Garcia ACL, Montes MA, Rohde C (2014) Cytogenetic mapping of Muller F element genes in the *willistoni* species group. *Genetica* 142:397-403.
- Poppe JL, Valente VLS, Schmitz HJ (2012) Structure of Drosophilidae assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa biome (São Luiz Gonzaga, RS). *Pap Avulsos Zool* 52(16):185-195.
- Powell JR (1997) *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila model*, 1st ed. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Powell JR, Dion K, Papaceit M, et al. (2011) Nonrecombining genes in a recombination environment: The *Drosophila* “dot” chromosome. *Mol Biol Evol* 28:825-833.
- Powell JR, Sezzi E, Moriyama EN, Gleason JM, Caccone A (2003) Analysis of a shift in codon usage in *Drosophila*. *J Mol Evol* 57(1):S214-S225.
- Prichmond MP, Johnson S, Haselkorn TS, Lam M, Reed LK, Markow TA (2013) Genetic differentiation of island populations: geographical barrier or a host switch? *Biological Journal of the Linnean Society*, v.108: p. 68–78.
- Richmond MP, Johnson S, Haselkorn TS, Lam M, Reed LK, Markow TA (2013) Genetic differentiation of island populations: geographical barrier or a host switch? *Biol J Linn Soc Lond*, 108:68-78.
- Robe LJ, Valente VLS, Loreto ELS (2010) Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 138: 725–735.
- Rohde C, Valente VLS (2012) Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifty different rearrangements. *Gen Mol Biol* 35(4):966-979.

- Shoemaker DD, Dyer KA, Ahrens M, McAbee K, Jaenike J. 2004. Molecular evolutionary effects of *Wolbachia* infections: decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA. *Genetics* 168: 2049–2058.
- Silva NM, Fantinel CD, Valente VL, Valiati VH (2005) Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. *Neotrop Entomol* 34(3): 363-374.
- Silva P (2016) Variabilidade e mapeamento de genes do elemento cromossômico F de Müller no subgrupo da *Drosophila willistoni*. Dissertação (Mestrado Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade de Pernambuco.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial genes sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87:651-701.
- Solé-Cava A (2004) Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R. (eds). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto. Holos: p.171-192.
- Spassky B, Richmond RC, Perez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T, Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution*, 25: 129-143.
- Swofford DL (2002) PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Sunderland, MA.
- Tajima F (1989) *Statistical* methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tidon R (2006) Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linnean Soc* 87(2): 233-247.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago.

## Tabelas e Figuras

Tabela 1. Número de linhagens analisadas de *Drosophila willistoni*, de nove localidades do Brasil, para cada gene mitocondrial (*Citocromo oxidase I*, *Citocromo oxidase II* e nuclear *Host Cell Factor*).

Local amostrado	Isolinhas analisadas		
	<i>COI</i>	<i>COII</i>	<i>HCF</i>
Marituba, Pará	12	9	2
Reserva Biológica de Guaribas, Paraíba	14	8	3
Parque Estadual de Dois Irmãos, Pernambuco	21	13	5
Parque Municipal João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco	20	11	2
Reserva Biológica de Saltinho, Pernambuco	13	11	5
Jiquiriçá, Bahia	9	8	3
Reserva Biológica do IBGE, Brasília-DF	11	10	3
Serra da Canastra, Minas Gerais	9	9	2
Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro	5	4	3
Total	114	83	28

Tabela 2. Variabilidade genética dos genes mitocondriais (*Citocromo c oxidase I* e *Citocromo c oxidase II*) e do gene nuclear (*Host Cell Factor*) em *Drosophila willistoni*.

Genes	N	<i>h</i>	Haplótipos (frequência absoluta)	<i>P</i> (%)	<i>Hd</i>	$\pi$
<i>COI</i>	114	70	H22 (14), H17 (6), H28 (6), H9 (5)	127 (16,8)	0.976	0.00868
<i>COII</i>	83	30	H3 (38), H2 (11), H4 (6)	98 (12,7)	0.817	0.00551
<i>HCF</i>	28	9	H3 (19), H4 (3)	13 (2,0)	0.600	0.00209

N. Número de sequências analisadas; *h*. Número de haplótipos; *P*. Sítios polimórficos; *Hd*. Diversidade haplotípica;  $\pi$ . Diversidade nucleotídica.

Tabela 3. Valores dos testes de neutralidade *D* de Tajima e *F<sub>s</sub>* de Fu para os genes mitocondriais (*Citocromo c oxidase I* e *Citocromo c oxidase II*) e gene nuclear (*Host Cell Factor*) de *Drosophila willistoni*.

Teste	Genes mitocondriais		Gene nuclear
	<i>COI</i>	<i>COII</i>	<i>HCF</i>
<i>D</i>	-2.50750 (< 0,001)	-2.67505 (< 0,001)	-2.07369 (<0,05)
<i>F<sub>s</sub></i>	-5.95643 (< 0,02)	-4.53102 (< 0,02)	-3.05546 (<0,05)

Entre parêntesis os valores de *p*.

Tabela 4. AMOVA para os genes mitocondriais (*Citocromo c oxidase I* e *Citocromo c oxidase II*) e gene nuclear (*Host Cell Factor*) de *Drosophila willistoni*.

Fonte de variação	COI	COII	HCF
Dentro populações (%)	94,93	94,89	84,70
Entre populações (%)	5,07	5,10	15,29
$F_{ST}$	0,0507	0,0510	0,1529

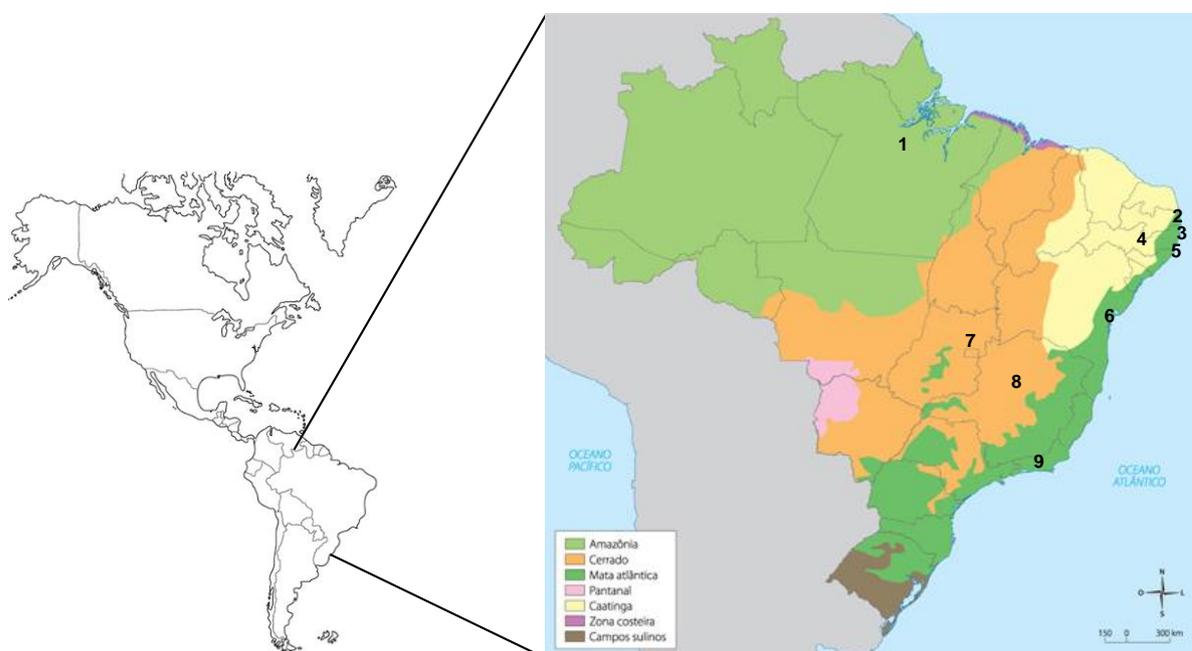


Figura 1. Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil. As áreas coloridas no mapa, correspondem aos biomas brasileiros. 1-BEL: Marituba-Pará (1°25'59.6"S/48°19'22.2"W); 2- GUA: Reserva Biológica de Guaribas, Paraíba (6°44'30.0"S, 35°08'32.7"W); 3- PDI: Parque Estadual de Dois Irmãos, Pernambuco (8°00'30.9"S, 34°56'47.1"W); 4-BJC: Parque Municipal João Vasconcelos Sobrinho (8°22'01.2"S, 36°01'26.5"W); 5-SAL: Reserva Biológica de Saltinho (8°43'57.8"S, 35°10'21.0"W); 6-JEQ: Jiquiriçá, Bahia (13°14'58.6"S, 39°34'60.0"W); 7-BRA: Reserva Biológica do IBGE, Brasília-DF (15°56'47.0"S, 47°52'16.6"W); 8-SER: Serra da Canastra, Minas Gerais (20°20'01.5"S, 46°28'07.7"W); 9- RIO: Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro (22°29'35"S, 43°4'24"W).



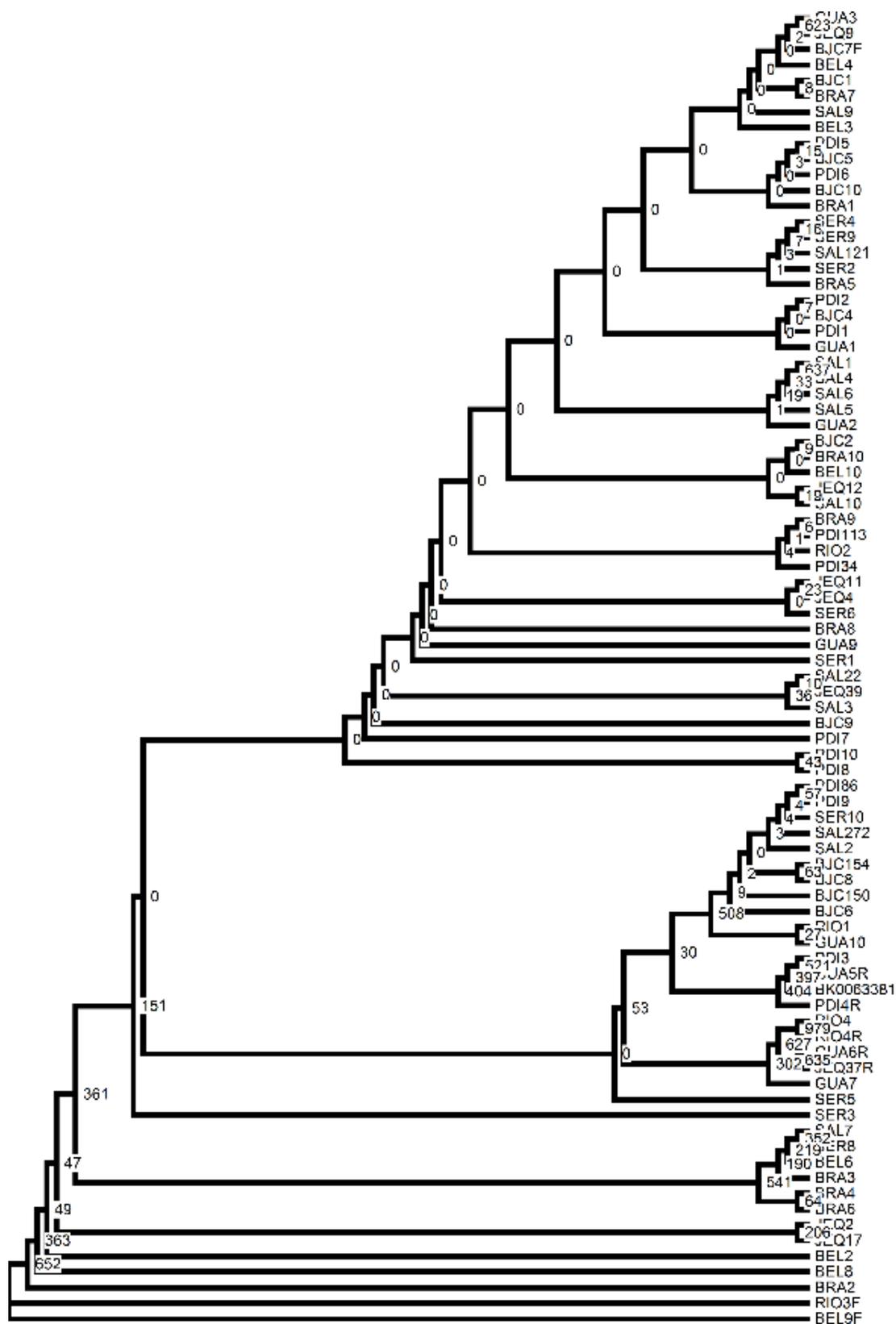


Figura 3. Filograma de seqüências parciais do gene mitocondrial *Citocromo c oxidase II* de *Drosophila willistoni*.

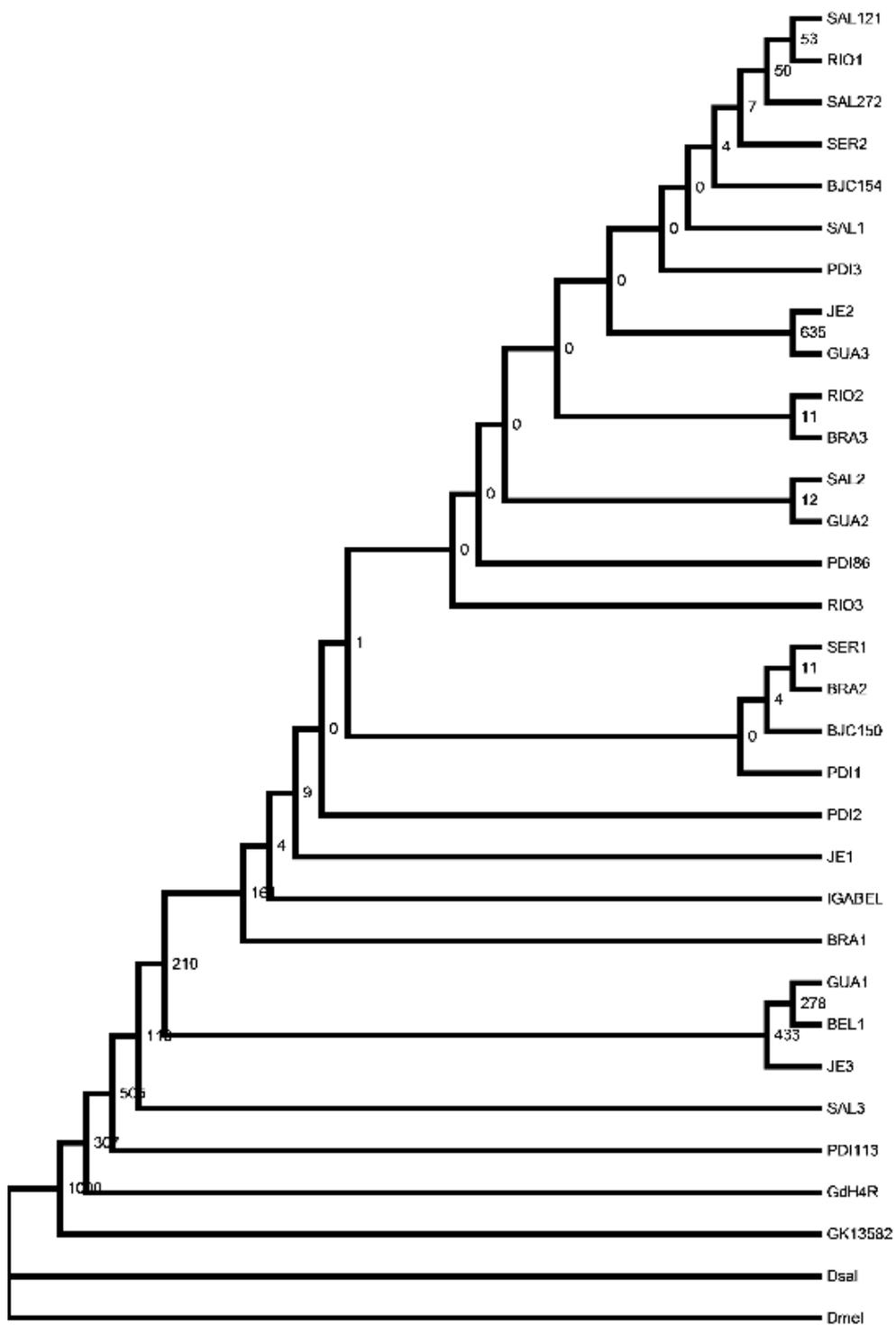


Figura 4. Filograma de seqüências parciais do gene nuclear (*Host Cell Factor*) de *Drosophila willistoni*.

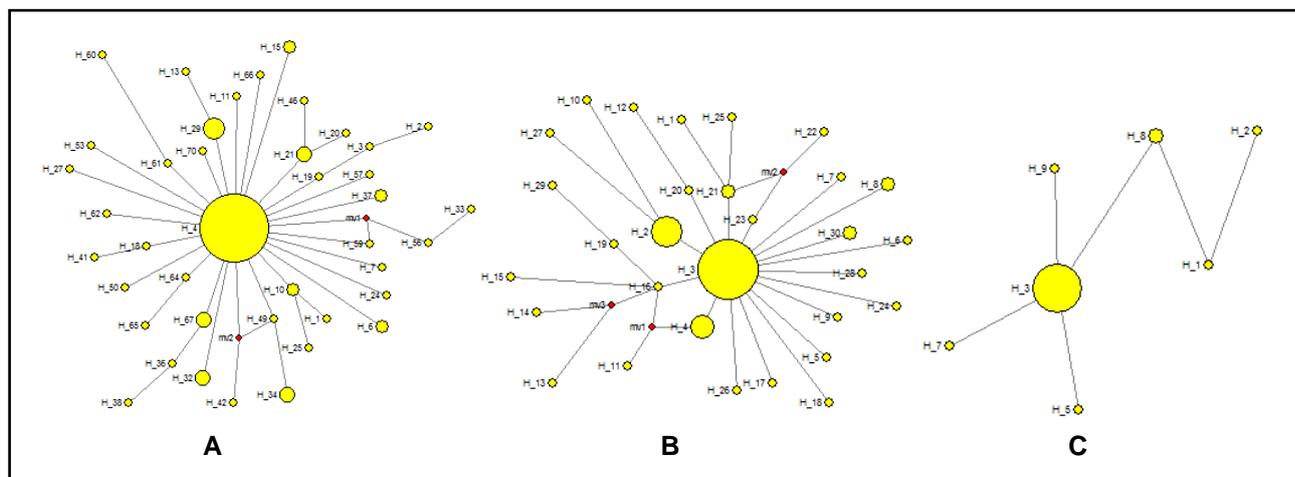


Figura 5. A. Rede de haplótipos para o gene mitocondrial *Citocromo c oxidase I*; B. Rede de haplótipos para o gene *Citocromo c oxidase II* (B); C. Rede de haplótipos para o gene gene nuclear *Host Cell Factor*. Os círculos representam diferentes haplótipos para populações de *Drosophila willistoni*, e os diâmetros são proporcionais às suas frequências.

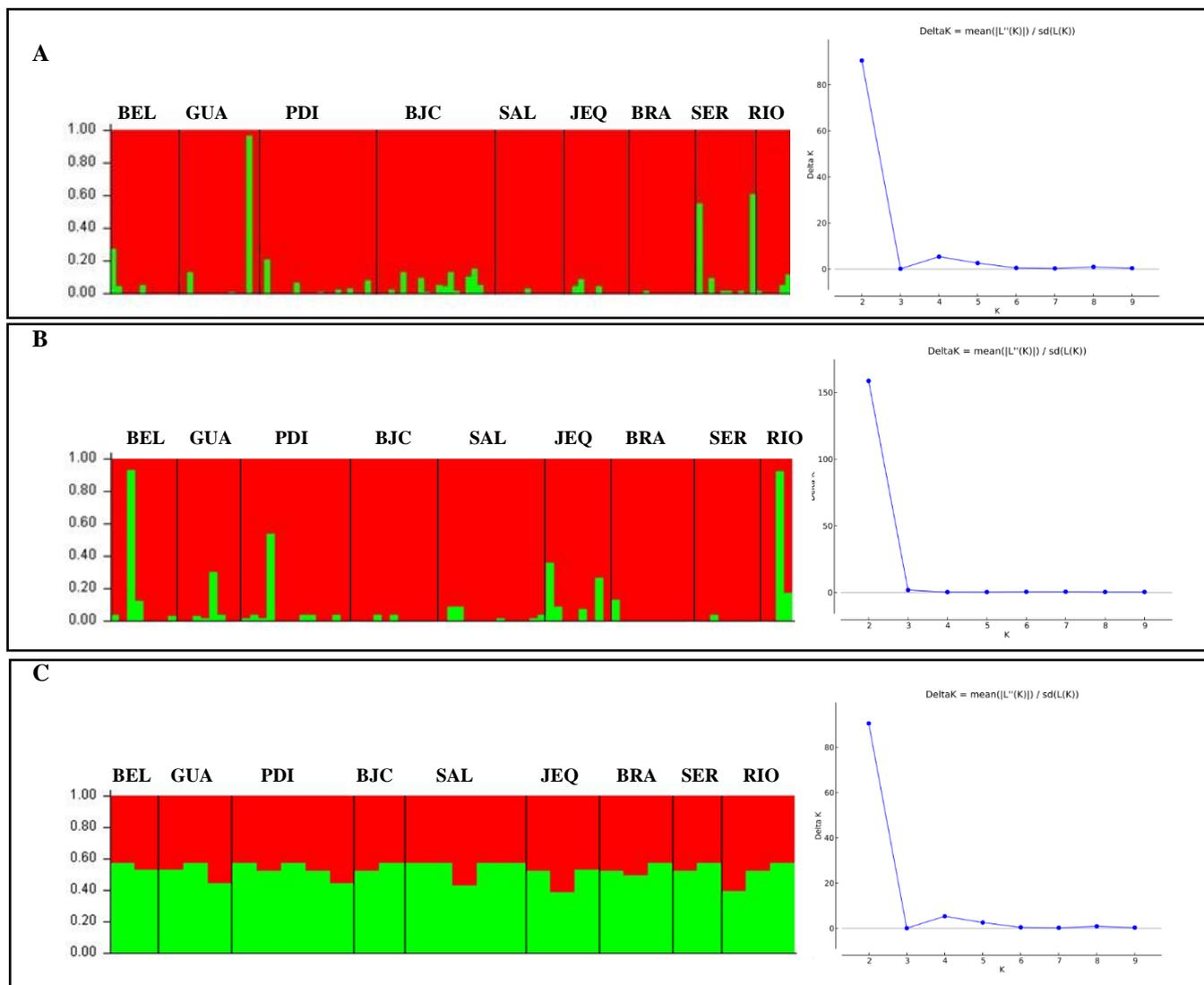


Figura 6. Representação gráfica da estrutura populacional, e valores delta K para determinar o número ideal de grupos genéticos presentes em *Drosophila willistoni* de nove locais do Brasil. Foram analisados os genes mitocondriais *COI* (A) e *COII* (B) e o gene nuclear *HCF* (C) através do programa Structure versão 2.3.4, assumindo  $K=2$  e utilizando o método Evanno implementado no programa STRUCTURE HARVESTER.

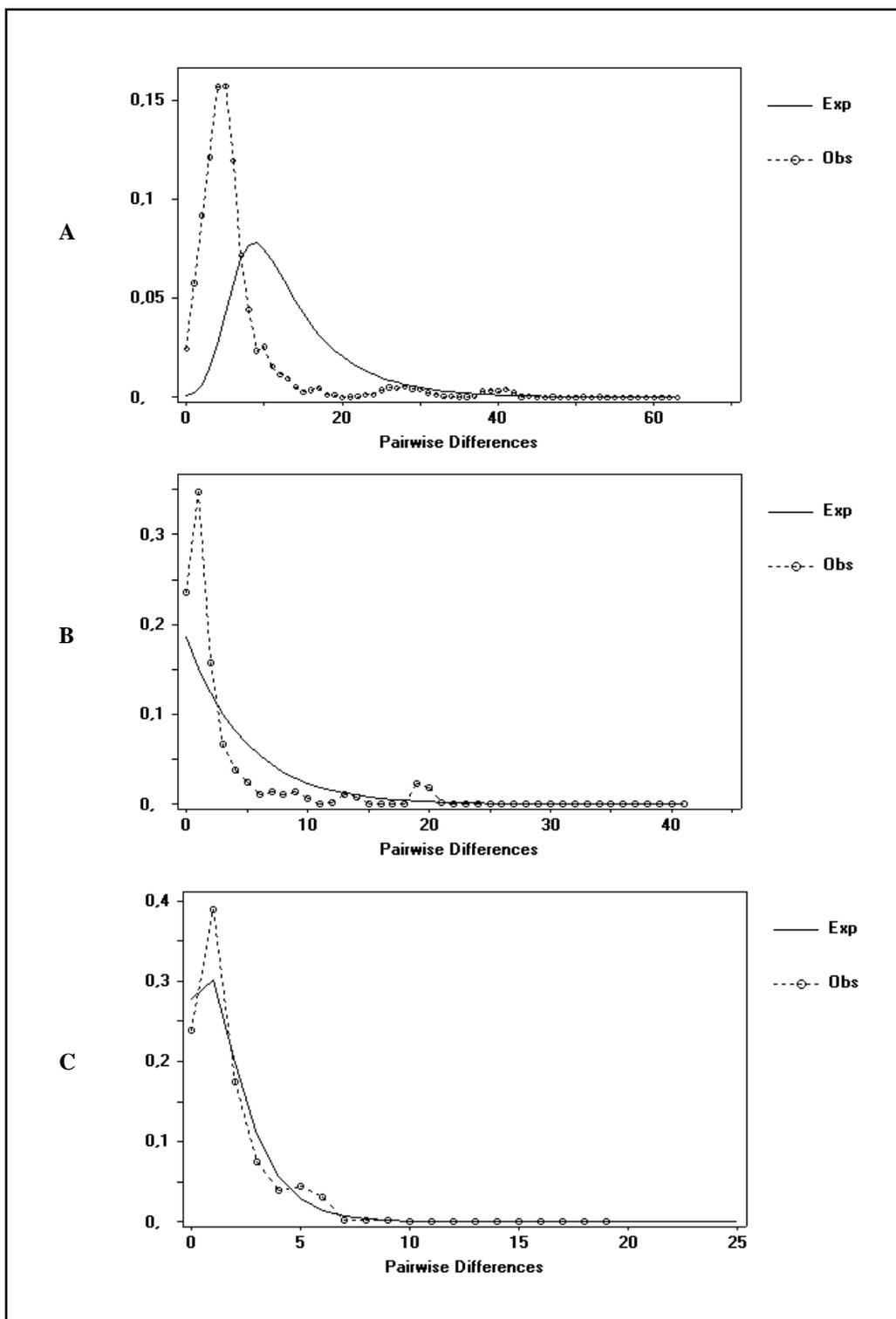


Figura 7. Distribuição *mismatch* das seqüências de DNA mitocondrial, gene COI (A), COII (B) e DNA nuclear, gene HCF (C), observada e esperada para populações de *Drosophila willistoni* de nove locais do Brasil. A linha tracejada representa a frequência das diferenças de bases par-a-par e a linha continua mostra os valores esperados pelo modelo de expansão demográfica.

## 6 Capítulo III

### Artigo 3



Artigo submetido à revista *Genetics and Molecular Biology* (GMB-2017-0250)

ISSN 0100-8455

Fator de impacto 2016: 1.147 (B1 – CBI)

Normas para submissão estão no Anexo 3

### ***Wolbachia pipientis* in Brazilian populations of *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae)**

Zilpa das Graças Silva de Melo<sup>1</sup>, Claudia Rohde<sup>2\*</sup>, Wedja Kelly M. Vasconcelos<sup>2</sup> e Rita de Cassia de Moura<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil

\* Correspondência para Claudia Rohde, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. E-mail: claudia.rohde@yahoo.com.br

Keywords: Endosymbiont, geographic occurrence, *wsp* gene, *willistoni* group.

## Abstract

*Wolbachia pipientis* is a gram-negative bacterium that infect approximately 40% of terrestrial arthropods, particularly insects, in a successful long-term stable evolutionary symbiosis. In the vinegar fly from genus *Drosophila*, *W. pipientis* can causes an egg mortality phenotype known as cytoplasmic incompatibility. Acting as a reproductive parasite, *W. pipientis* enhancing fitness and fecundity of infected host females. This evolutionary strategy of the endosymbiont is for it on spreading and transference to the next host generation. Previously results on biogeographic analysis suggests that *W. pipientis* is absent in *Drosophila willistoni* stocks collected before the 1970s, probably caused by a recent invasion in the field. In this study, we investigated 85 samples of this species from nine Brazilian locations and evaluate the status of infection and distribution of *W. pipientis* as the only variant into and between natural populations of this very abundant and widespread neotropical drosophilid species.

## Introduction

Transmitted predominantly by female inheritance, *Wolbachia pipientis* Hertig is one of the endosymbionts that most often infect the reproductive system of insects (Werren et al., 1995, Jeyaprakash and Hoy, 2000). Hertig and Wolbach (1924) were the first scientists to detect *Wolbachia* in ovaries of the mosquito *Culex pipiens*, though the taxonomical characterization of bacterium was concluded in 1936 (Hertig, 1936). *Wolbachia pipientis* belongs to the Alphaproteobacteria class, Rickettsiales order, and Anaplasmataceae family (Lo et al., 2007). It has been reckoned that the bacterium is one of the most frequent in the biosphere, since it infects approximately 66% of insect species (Hilgenboecker et al., 2008; Zug and Hammerstein, 2012), which accounts for about 85% of the total number of animal species on the planet. Besides the significant presence in insects, *W. pipientis* also infects filarial nematodes (Werren et al., 1998; Serbus et al., 2008; Merçot and Poinso, 2009), terrestrial crustaceans (Bouchon et al. 1998; Cordaux et al., 2012), and other animal species.

The successful prevalence of *W. pipientis* in these organisms is partly explained by its ability to increase enhancing fitness and fecundity of infected host females. The endosymbiont also drives the dispersal patterns by inducing a variety of reproductive changes in hosts such as cytoplasmic incompatibility (O'Neill e Karr, 1990), parthenogenesis (Stouthamer et al., 1990), as well as feminization and male death (Rousset et al., 1992). Besides this, one of the most interesting effect of this endosymbiont is to actually command the host's speciation process through cytoplasmic incompatibility (Caspari and Watson 1959; Weeks et al. 2002; Bordenstein, 2003; Telschow et al. 2005; Jaenike et al. 2006; Bordenstein and Werren, 2007). Studies have shown that cytoplasmic incompatibility improves adaptive fitness of females infected by *W. pipientis*, compared with non-infected counterparts (Telschow et al. 2005; 2007; Miller et al., 2010), controlling the persistence of infection in these populations. The phenomenon signals the risk of reproductive isolation, which stops gene flow and, therefore, the emergence potentially inferior hybrids (Otto and Endler, 1989). So, it may be hypothesized that *W. pipientis* contributes to the evolutionary process associated with sexual selection and speciation. Another important aspect of the infection by *W. pipientis* is that it may protect host species against secondary infections by virus or other parasites (Hedges et al., 2008, Dheilly, 2014).

The *ftsZ* (*Wolbachia cell division protein*) gene and the 16S rDNA sequence are often used in studies about molecular sequences of *W. pipientis*, which have characterized several phylogenetic variants of the bacterium. These were divided in six supergroups (A to F) (Baldo et al., 2005; Lo et al., 2007). In arthropods, the main supergroups are A and B (Werren et al., 1995).

Studies of the evolution and functional interactions between *W. pipientis* and drosophilids (Diptera, Drosophilidae) have used mainly two model species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* (Miller, 2013). Both are cryptic, belong to the *melanogaster* group, and are widely distribution across the globe (Val et al., 1981). It has been shown that wMelSC, an ancestral *W. pipientis* variant included in supergroup A, infects *D. melanogaster* extensively (Zhou et al., 1998). It has been suggested that this variant was gradually replaced by the wMel variant during the 20<sup>th</sup> century (Riegler et al., 2005; Richardson et al., 2012; Chrostek et al., 2013), and that

both are strategically advantageous to the host species (Teixeira et al., 2008). In turn, five variants were detected in *D. simulans*. Briefly, *w*Ri, *w*Ha, and *w*No are associated with cytoplasmic incompatibility, while *w*Ma and *w*Au are not. The variants or strains *w*Mel and *w*Au are strictly associated with the *wsp* (*Wolbachia surface protein*) and *ftsZ* genes present in *D. melanogaster* and *D. simulans*, respectively. Considered the most variable gene, *wsp* was shown to present a certain degree of genetic diversity between *W. pipientis* strains (Zhou et al., 1998; Baldo et al., 2005). Nevertheless, it did not exhibit intra population sequence variation (James and Ballard, 2000; Ballard 2004; Riegler et al., 2005), suggesting a recent infection of host species.

Few studies have evaluated the occurrence of *W. pipientis* in drosophilids that distribute exclusively in the Neotropical region. One exception is the paper published by Miller et al. (2010), which highlighted the significant effect of *W. pipientis* on the development, populational dynamic, and the evolution of the six semispecies of the model species *Drosophila paulistorum*, investigated earlier by Ehrman and Powell (1982). In that study, Miller et al. (2010) conducted interspecific crossings between the drosophilid semispecies and the respective *W. pipientis* variants, observing high embryo mortality rates besides completely sterile hybrid males.

*Drosophila willistoni*, like *D. paulistorum*, is one of the six cryptic species forming the *willistoni* subgroup of *Drosophila*. One of the interesting aspects of studies about *D. willistoni* is the fact that ancient strains collected before the 1970s and kept in laboratory are not infected with *W. pipientis*. Oppositely, populations of strains collected more recently present different rates of infection exclusively with the variant *w*Wil (Miller and Riegler, 2006). This variant is closely linked with *w*Au, in *D. simulans* (Ballard, 2004, Miller and Riegler, 2006).

Warren et al. (1995) were the first to evaluate the presence of *W. pipientis* in *Drosophila willistoni* samples in Panama, Central America, collected a little before the study (between 1993 and 1994). Based on the characterization of the *ftsZ* gene, the authors observed that the supergroup A was the *W. pipientis* variant present in the drosophilids analyzed. In another study, Bourtizis et al. (1996) investigated the presence of the *dnaA* and 16S *rDNA* genes of *W. pipientis* in drosophilid populations maintained in the Stock Center of the University of Arizona (USA) and several other laboratories. However, in the relatively large number of strains of the species included

(N = 41), only one was *D. willistoni* (collected in San Maria d'Orsuna, Nicaragua), and it was not infected with *W. pipientis*. But significant contributions to the study on *D. willistoni* came with the research made by Miler and Riegler (2006) and Mateos et al. (2006). In the first study, the authors investigated 29 strains of the species, 21 of which were collected in continental America and eight that were originally from Caribbean islands, kept in Stock Center. After characterization of drosophilids for the presence of the *wsp* and *ftsZ* genes and single fly southern blot analysis, the authors reported infection by the *W. pipientis*  $\omega$ Wil variant in 12 strains collected in the continent and in five native to islands. The first strain discovered to be infected in that study was captured in Belize, Central America, in 1974. In turn, Mateos et al. (2006) studied strains collected in the 1990s and 2000s and kept in Stock Center, detecting infection in drosophilids collected in seven Central American locations.

In two other important studies using *D. willistoni* populations collected a little before analysis, Müller et al. (2012) evaluated the presence of *W. pipientis* in 60 samples captured in seven locations in southern Brazil. The authors characterized the presence of the *wsp* gene and detected infection in 53% of the strains analyzed. Subsequently, Müller et al. (2013) included 21 *D. willistoni* samples from three locations in northern Brazil (all the state of Pará, Brazilian Amazon) and recorded infection in all individuals. Sequencing of the *wsp* gene in 13 individuals and the characterization of the VNTR-141 region indicated the presence of the  $\omega$ Wil variant in the samples analyzed.

The present study investigates the occurrence and prevalence of the infection of *D. willistoni* with *W. pipientis* in 85 samples collected in nine locations in three Brazilian regions, especially the  $\omega$ Wil variant.

## **Materials and methods**

### *Collection and identification of Drosophila willistoni*

*Drosophila* isofemales (N = 85) reared in laboratory and taxonomically identified as *D. willistoni* were used. Specimens were collected in nine locations in Brazil (Table 1) between 2013 and 2015. In each location, 10 traps built using plastic bottles and using ripe bananas were employed to attract adult flies. Taxonomic

identification of *D. willistoni* against the other cryptic species of the group was based on the careful analysis of hypandrium morphology of male offspring of isofemales, according to the morphologic description presented by Malogolowkin (1952) and Rohde et al. (2010), and the methodology previously described by Garcia et al. (2014).

#### *Molecular analysis*

The *W. pipientis* variants were characterized by partial amplification of the *wsp* gene using the primers Wsp-F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA-3' and Wsp-R 5'-AAAAATTAAA-CGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3' (Jeyaprakash and Hoy, 2000). Total DNA was extracted from a pool formed by 10 flies of each isofemale strain, with Puregene kit (Qiagen), and used in the *wsp*-PCR technique according to a modified version of the amplification method described by Miller et al. (2010). Amplification reactions were carried out using a 20  $\mu$ L reaction volume containing 12.2  $\mu$ L ultrapure water, 2  $\mu$ L 10x buffer (Invitrogen), 2.0  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1.0  $\mu$ L dNTPs 10 mM each, 0.7  $\mu$ L each primer (forward and reverse, 20 mM), and 0.4  $\mu$ L of 1U/  $\mu$ L Taq DNA polymerase (Invitrogen). The concentration of the DNA template used in each reaction was between 100 and 350 ng.

PCR amplification was conducted in a thermal cycler (Mastercycler, Eppendorf) as follows: denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles for 1 min at 94°C, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. A final extension was carried out at 72°C for 7 min. The PCR products obtained (Figure 1) were electrophoresed on agarose gels (1% in TBE buffer 1x) and visualized using specific DNA stain 1:500 (GelRed, Biotium). The *D. willistoni* GdH4 strain, from Guadeloupe Island (Lesser Antilles, Central America) was used as positive control, while ultrapure water was used as negative control. Due to the absence of a suitable drosophilid strain to be used as negative control, that is, free of infection with *W. pipientis*, we used recent *D. paulistorum*, Amazonian semispecies samples collected in 2011 in the Caxiuanã National Forest (state of Pará, Brazil), which contains very low titers of the endosymbiont (Nascimento GAF, personal communication).

The amplicons of the *wsp* gene were purified and sequenced in both directions (forward and reverse) by a laboratory overseas (Macrogen Inc., Seoul, Korea). The

chromatograms obtained were analyzed using the ApE software, version 2.0.51, and the sequences were edited in the Geneious software, version 6.1 (Biomatters). The *wWil* variant of *W. pipientis* was identified using the NCBI databank and the BLASTn tool with sequences AY620218 to AY620229 as reference (Riegler and Miller, 2006).

In addition to *wsp* gene sequence analysis, *Wolbachia* strains were distinguished based on the amplicon size derived from the amplification of a minisatellite marker, Variable Number Tandem Repeats (VNTR-141) (Figura 2). This region was amplified with the primers VNTR-141-F 5'-GGAGTATTATTGATATGCG-3' and VNTR-141-R 5'-GACTAAAGGTTAGTTGCAT-3' (Riegler et al., 2005). The reaction conditions were carried out using a 20 µL reaction volume containing: 0,5uM of primers, 1x reaction buffer (Invitrogen), 2,5mM of MgCl<sub>2</sub>, 25uM dNTPs and 1U of Taq DNA polymerase. The cycling parameters were initially: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and then finally 72 °C for 4 min.

All published records of *W. pipientis* (Warren et al., 1995, Miller and Riegler, 2006, Mateos et al., 2006, Müller et al., 2012, 2013) and the data obtained in the present study were plotted on a map of the Americas to characterize the species' geographic distribution, which starts in Florida (USA) and Mexico, down to Uruguay and northern Argentina. The map was prepared using the DIVA-GIZ program, version 7.5.

## Results

The *wsp* gene of *W. pipientis* was characterized in 85 isofemale strains of *D. willistoni*. Of these, the gene was amplified in 62, meaning a 72.9% infection rate (Figure 3). Intra population infection rates varied between 20% and 100% (Table 1, Figure 3). Infection rates equal and higher than 60% were detected in eight populations, and the highest prevalence of *W. pipientis* (100%) was observed for the population collected in the state of Bahia, Brazil. Interestingly, a low titer of *W. pipientis* was detected in the population collected in Brasília, in the Brazilian Midwest, a geographical region with some of the highest rates of *D. willistoni* chromosomal recombination in the country (Rohde and Valente, 2012).

The molecular analysis afforded to align the 50 partial sequences of the *wsp* gene (631-bp) that were amplified, indicating 100% identity with the *wWil* variant of *W. pipientis*, as expected (Miller and Riegler, 2006). For confirmation purposes, all *D. willistoni* isofemale lines that amplified in the *wsp*-PCR were tested with the VNTR-141 marker and amplified a fragment of the same size, corresponding to the *wWil* strain (Figura 2) (Muller et al., 2013).

The phylogram in Figure 4 shows the clusters formed by the sequences of the *wsp* gene of *W. pipientis* in the *D. willistoni* strains, analyzed in the present work and the sequences identified in other studies (Miller and Riegler, 2006, Mateos et al., 2006).

## Discussion

The results of the present study show that the infection of natural *D. willistoni* populations with *W. pipientis* distributes over a larger geographical extension than previously known. Three new Brazilian regions were included (not been investigated before): Northeastern (in states of Paraíba, Pernambuco, and Bahia), Midwest (in state of Minas Gerais and the Federal District), and Southeastern (state of Rio de Janeiro). In addition, a new sample from the Northern region was added, in state of Pará. Overall, the results reveal the ubiquitous character of infection with *W. pipientis* in natural populations of *D. willistoni* collected in recent years. Importantly, these findings confirm previous studies, which reported the occurrence of one single *W. pipientis* variant in *D. willistoni* populations surveyed to date in the Neotropical region (32 samples, Figure 2) and the putative recent introduction of the endosymbiont in these communities.

Our findings also verify the discontinuous nature of the infection of the *D. willistoni* samples analyzed, which were collected in different regions and biomes in Brazil. With the survey of additional regions in the country, a higher number of isostrains was analyzed per location. Most *D. willistoni* strains (72.9%) were clearly positive for *W. pipientis* in the *wsp*-PCR. Such mean infection rate is higher than that reported by Miller et al. (2012) using the same technique and lower than the value published by Muller et al. (2013) with the Dot-blot technique and qPCR (55% and 100%, respectively).

As in Mateos et al. (2006) and Miller and Riegler (2006), in our investigation some *D. willistoni* isostrains were negative for the bacterium infection. Our results also agree with Müller et al. (2012) to the occurrence of variation in infection between populations of Brazil. All these results are in accordance with the suggestion of recent event of infection in *D. willistoni* Neotropical populations, and the map presented (Figure 2) is in fact, reflecting the actual status of spreading of this event.

The number of *W. pipientis* variants infecting groups and species of the *Drosophila* genus varies. Several *W. pipientis* variants were detected in *D. simulans* and *D. melanogaster*, which belong to the *melanogaster* group, one of the most studied in the genus that has cosmopolitan distribution (Riegler et al., 2005, Miller and Riegler, 2006, Zabalou et al. 2008). In turn, the presence of the endosymbiont varies considerably in the *willistoni* group. For instance, six different *W. pipientis* variants are detected in *Drosophila paulistorum* (essentially one in each of the six drosophilid semispecies), while one variant only (*wWil*) is detected in its sibling *D. willistoni*. The interest in this finding lies in the fact that contradicts ecological data obtained for *D. willistoni*, which is the most abundant, most widely distributed, and ecologically versatile, since it successfully colonizes a variety of environments (forests, clearings, and urban settings) as reviewed in Garcia et al. (2014) and Roque et al. (2017). In addition, *D. willistoni* has considerable genetic diversity in its polytene chromosomes (Rohde and Valente, 2012), allozymes (Ayala et al., 2014), and ISSR sequences (Melo ZGS, personal communication).

Although the natural strains of *D. willistoni* have high *W. pipientis* infection rates, which also vary across the locations surveyed, *wWil* was the only genotype of the endosymbiont that was detected in all strains of the drosophilid analyzed. Also, *wWil* had high number of conserved nucleotides (*wsp* gene). These data lend strength to the hypothesis that the continental magnitude of the infection with the *wWil* variant of *W. pipientis* may be associated with the efficient vertical transmission of the endosymbiont due to the high gene flow in *D. willistoni* (Melo ZGS personal communication). We believe that the co-evolutionary mechanisms at play are shaping the symbiotic relationship between *D. willistoni* and *W. pipientis*, so as to keep the balance between infection rates and titers in natural populations of the drosophilid, when *wWil* becomes the only variant to infect the fly species.

## Acknowledgments

The authors are thankful to Brazilian agencies Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Pernambuco (PROPESQ-UFPE), for financial supports. And to Wolfgang Miller and Victor Hugo Valiati for technical support.

## References

- Arthofer W, Riegler M, Schneider D, Krammer M, Miller WJ and Stauffer C. (2009) *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol* 18(18):3816-3830.
- Ayala FJ, Tracey ML Barr LG, McDonald JF and Perez-Salas S (1974) Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics* 77:342-384.
- Baldo L., Lo N and Werren JH (2005) Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *J Bacteriol* 187(5):5406-5418.
- Ballard JWO (2004) Sequential evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*. *Mol. Biol. Evol.* 21:428-442.
- Bordenstein SR and Werren JH (1997) Bidirectional incompatibility among divergent *Wolbachia* and incompatibility level differences among closely related *Wolbachia* in *Nasonia*. *Heredity* 99:278-287.
- Bordenstein SR (2003) Symbiosis and the origin of species. In: Bourtzis K, Miller T, eds. *Insect Symbiosis*. New York: CRC Press. p 283–304.
- Bouchon D, Rigaud T and Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265:1081-1090.
- Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G and Savakis C (1996) *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144:1063-1073.
- Caspari E and Watson G (1959) On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. *Evolution*, 13:568–570.
- Chrostek E, Marialva MSP, Esteves SS, Weinert LA, Martinez J et al. (2013) *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila*

- melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. PLOS Genet 9:e1003896.
- Cordaux R, Pichon S, Hatira HBA, Doublet V., Grève P, Marcadé I, Braquart-Varnier C et al. (2012) Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. ZooKeys 176:123-131.
- Dheilly NM (2014) Holobiont-holobiont interactions: redefining host-parasite interactions. PLoS Pathog 10(7):e1004093
- Ehrman L and Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr JN (eds). London/New York, Academic Press v.2. p.193-225.
- Garcia ACL, Silva DMIO, Monteiro AGF, Oliveira GF, Montes MA and Rohde C (2014) Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. Ann Entomol Soc Am 107(5):975-982.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL and Johnson KN (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. Science 322:702.
- Hertig M (1936) The rickettsia *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology 28:453-486.
- Hertig M and Wolbach SB (1924) Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. J Med Research 44:329-374.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A and Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. FEMS Microbiol. Lett. 281:215-220.
- Ioannidis P, Hotopp JCD, Sapountzis P, Siozios S, Tsiamis G, Bordenstein SR, Baldo L, Werren JH and Bourtzis K (2007) New criteria for selecting the origin of DNA replication in *Wolbachia* and closely related bacteria. BMC Genomics 8:182.
- Jaenike J, Dyer KA, Cornish C and Minhas MS (2006) Asymmetrical reinforcement and *Wolbachia* infection in *Drosophila*. PLoS Biology, 4(10): e325.
- James AC and Ballard JWO (2000). Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. Evol Int J Org Evol 54:1661-1672.
- James AC and Ballard JWO (2000) Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. Evol Int J Org Evol 54:1661-1672.
- Jeyaprakash A and Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Mol Biol 4:393-405.

- Jeyaprakash A and Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of 63 arthropodes species. *Insect Mol Biol.* 9 (4): 393-403.
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR and Bandi C (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 3):654-657.
- Malogolowkin C (1952) Sobre a genitália dos "Drosophilidae" (Diptera). III. Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Rev Brasil Biol*12: 79-96.
- Mateos M, Castrezana SJ, Nankivell BJ, Estes AM, Markow TA and Moran NA (2006) Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics* 174: 363–376.
- Melo ZGS, Rohde C, Cruz GAS, Mendonça JAN, Oliveira RM, Garcia ACL, Montes MA and Moura RC. High genetic diversity and low differentiation in *Drosophila willistoni* Brazilian populations, inferred by ISSR markers. *Genet Mol Biol* (submetido).
- Merçot H and Poinot D (2009) Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *C R Biol* 332: 284–297.
- Miller WJ (2013) Bugs in transition: The dynamic world of *Wolbachia* in insects. *PLoS Genetics* 9(12):e1004069.
- Miller WJ and Riegler M. (2006) Evolutionary dynamics of *wAu*-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Appl Environ Microbiol* 72: 826-835.
- Miller WJ, Ehrman L and Schneider D (2010) Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS Pathogens*, 6(12): e1001214.
- Müller MJ, Döör N, Deprá M, Schmitz H, Valiati VH and Valente VLS (2013) Reevaluating the infection status by the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila* neotropical species from the *willistoni* subgroup. *Infect Genet Evol* 19:232-239.
- Müller MJ, Von Mühlen C, Valiati VH and Valente VLS (2012) *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. *J Invertebr Pathol* 109:152-155.
- O'Neill SL and Karr TL (1990) Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348:178-180.
- Otto D and Endler JE (1989) Speciation and its consequences. Sinauer Associates Sunderland MA.
- Richardson MF, Weinert LA, Welch JJ, Linheiro RS, Magwire MM et al. (2012) Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genet* 8:e1003129.

- Riegler M, Sidhu M, Miller WJ and O'Neill SL (2005) Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*. 15:1428-1433.
- Rohde C e Valente VLS (2012) Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifty different rearrangements. *Genet Mol Biol* 35(4):966-979.
- Rohde C, Monteiro AGF, Cabral WBM, Silva DMIO, Oliveira GF, Montes MA and Garcia ACL (2010) The importance of identification of the *willistoni* subgroup of *Drosophila* at the species level: the first evidence of *D. equinoxialis* in the Northeast region of Brazil. *Dros Inform Serv* 93:118-122.
- Roque F, Leão BFD and Tidon R (2017) Spatio-temporal distribution of the cryptic flies of the *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae) subgroup in a Neotropical forest. *Ann Entomol Soc Am* 110(4):398-402.
- Rousset F, Vautrin D and Solignac M (1992) Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc R Soc Lond B* 247:163-168.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F and Sullivan W (2008) The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet* 42: 683-707.
- Stouthamer R, Luck RF and Hamilton WD (1990) Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2424-2427.
- Teixeira L, Ferreira A and Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biol* 6:e1000002.
- Telschow A, Flor M, Kobayashi Y, Hammerstein P and Werren JH (2007) *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. *PLoS One*, 8:e701.
- Telschow A, Hammerstein P and Werren JH (2005) The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* 59:1607-1619.
- Val FC, Vilela CR and Marques MD (1981) Drosophilidae of the Neotropical region. In: M. Ashburner; H. L. Carson & J. N. Thompson, J. N. (eds), *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol 3., Academic Press, London.
- Weeks AR, Reynolds KT and Hoffmann AA (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Ecol Evol* 17:257-262.
- Werren J H, Windsor D and Guo L (1995) Distribution of *Wolbachia* among Neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. London B* 262:197-204.

- Werren JH, Baldo L and Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6:741-775.
- Zabalou S, Apostolaki A, Pattas S et al. (2008) Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. *Genetics* 178(4):2145-2160.
- Zhou W, Rousset F and O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* sequences. *Proc R Soc Lond B* 265:509-515.
- Zug R and Hammerstein P (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One* 7:e38544.

## Table and Figures

**Table 1-** Origin of the Brazilian samples of *Drosophila willistoni* investigated for the occurrence of *Wolbachia pipientis* infection.

Biomes and sites surveyed in Brazil	Geographic coordinates	Collection year	N <sup>1</sup>	Infection rate (%)
<b>AMAZON FOREST</b>				
Marituba/Pará	01°25'59.6"S / 48°19'22.2"W	2015	10	80
<b>ATLANTIC FOREST</b>				
Guaribas Biological Reserve, in Mamanguape, Paraíba	06°44'30.0"S / 35°08'32.7"W	2013	10	70
Dois Irmãos State Park, in Recife, Pernambuco	08°00'30.9"S / 34°56'47.1"W	2013	10	90
João Vasconcelos Sobrinho City Park, in Caruaru, Pernambuco	08°22'01.2"S / 36°01'26.5"W	2013	10	90
Saltinho Biological Reserve, in Tamandaré, Pernambuco	08°43'57.8"S / 35°10'21.0"W	2013	10	60
In Jiquiriçá, Bahia	13°14'58.6"S / 39°34'60.0"W	2013	10	100
Serra dos Órgãos National Park, in Teresópolis, Rio de Janeiro	22° 29' 35" S/ 43° 4' 24" W	2015	5	20
<b>CERRADO</b>				
IBGE Biological Reserve, in Brasília, Federal District	15°56'47.0"S / 47°52'16.6"W	2014	10	60
Serra da Canastra, in São Roque de Minas, Minas Gerais	20°20'01.5"S / 46°28'07.7"W	2015	10	60

<sup>1</sup> Number of isostrains analyzed (total = 85).

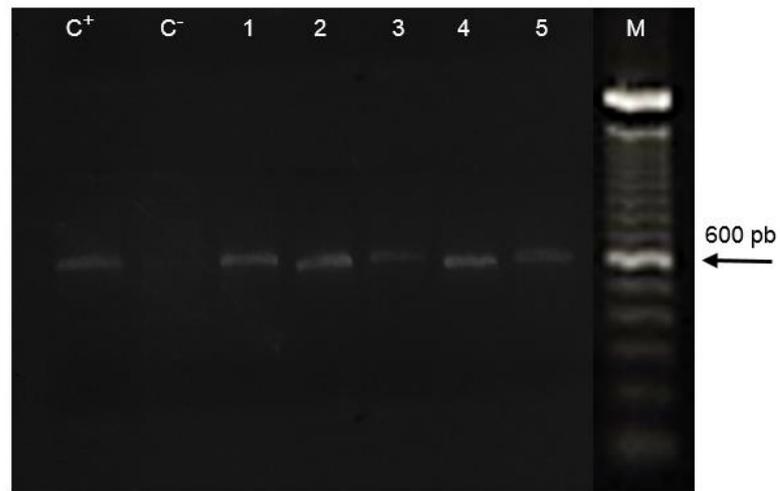


Figure 1 Agarose 1% gel containing PCR products after amplification of the *wsp* gene (600 bp) in *Drosophila willistoni* isostrains (1 to 5). C<sup>+</sup>, positive control (*D. willistoni* GdH4); C<sup>-</sup>, negative control (ultrapure water); M, DNA ladder, 1 kb (Invitrogen).

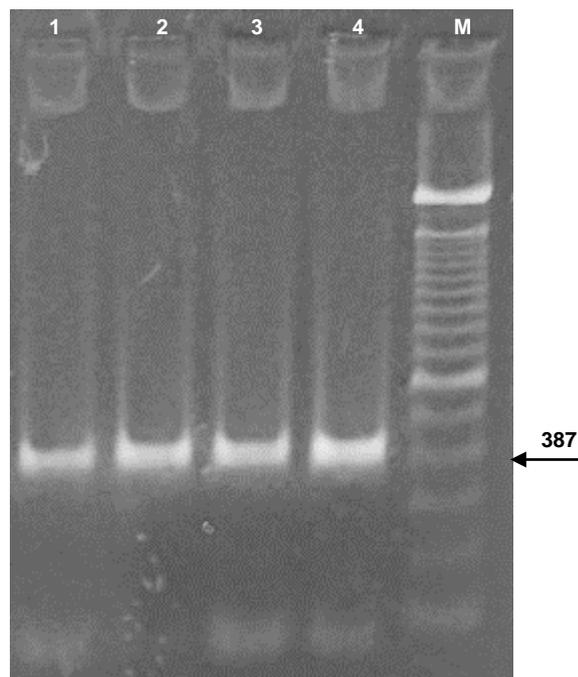


Figure 2 Agarose 1% gel containing PCR products after amplification of the *vnr* (~387 bp) in *Drosophila willistoni* isostrains (1 to 4). M, DNA ladder, 1 kb (Invitrogen).

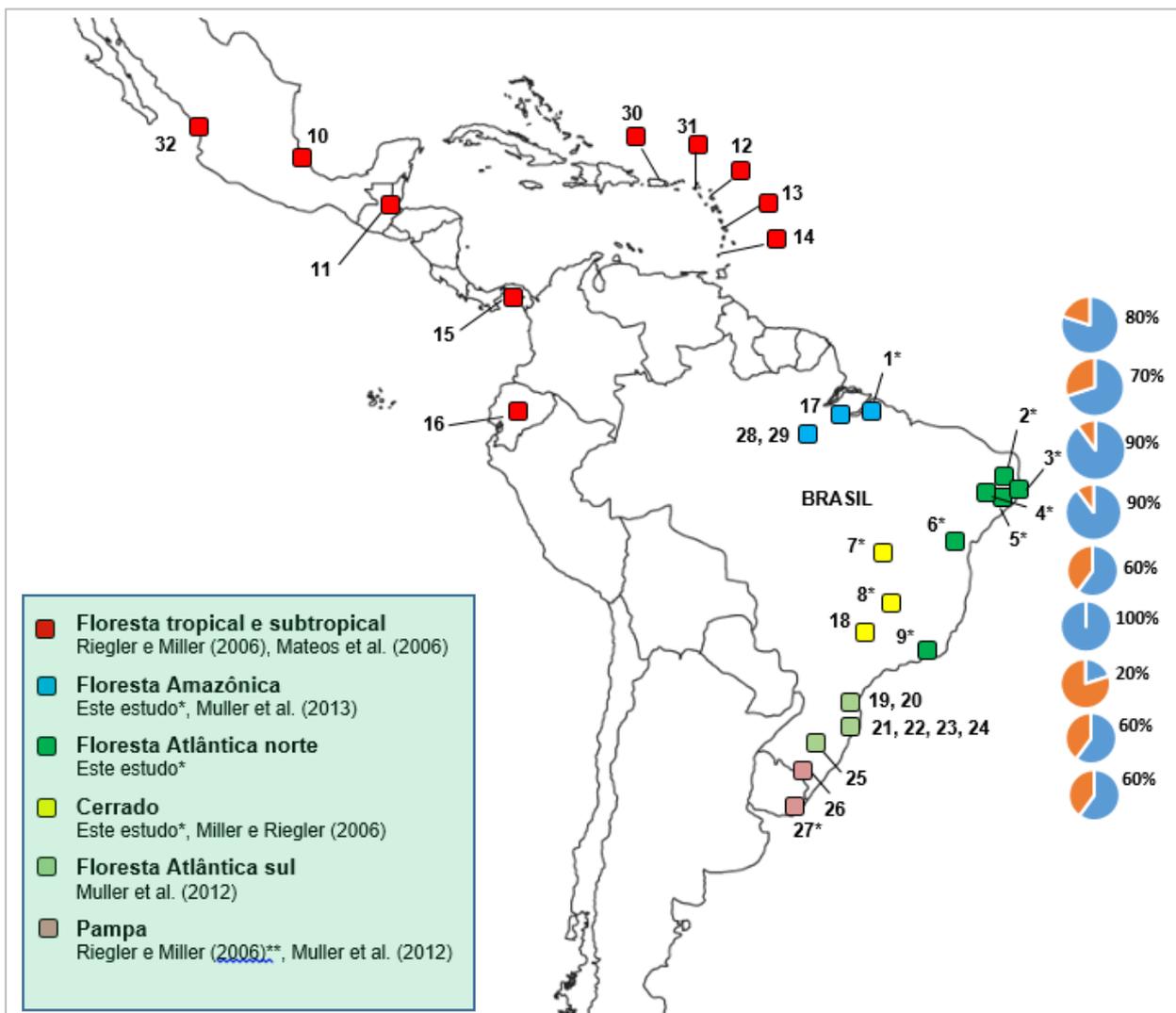


Figure 3 Partial map of the Americas showing the locations with positive records of infection with *Wolbachia pipientis* (wWil) in *Drosophila willistoni* (32). The green box indicates the natural environments surveyed. The pie charts on the right show the rates of infection with *W. pipientis* (20% to 100%, in blue) in isostrains collected in each site in the present study (1 to 9).

1. Marituba, Pará-Brazil (2015); 2. Mamanguape, Paraíba-Brazil (2013); 3. Recife, Pernambuco-Brazil (2013); 4. Caruaru, Pernambuco-Brazil (2013); 5. Tamandaré, Pernambuco-Brazil (2013); 6. Jiquiriçá, Bahia-Brazil (2013); 7. Brasília, Distrito Federal-Brazil (2014); 8. São Roque de Minas, Minas Gerais-Brazil (2014); 9. Teresópolis, Rio de Janeiro-Brazil (2015); 10. Veracruz-México (1998); 11. Belize (1974); 12. Guana Island, Virgin Islands (1991); 13. Basse Terre, San Cristovan Island; Guadeloupe Island (1991; 2000); 14. Saint Vincent and Grenadines Island (1996); 15. Panamá City-Panamá (1998, 2002); 16. Jatun Sacha, Tena-Ecuador (1997); 17. Melgaço, Pará-Brazil (1997, 2011); 18. Ribeirão Preto, São Paulo-Brazil (1995); 19. Guaratuba, Paraná-Brazil; 20. Pontal do Paraná, Paraná-Brazil (2010); 21. Maracajá, Santa Catarina-Brazil; 22. Laguna, Santa Catarina-Brazil (2010); 23. Torres, Rio Grande do Sul-Brazil; 24. Osório, Rio Grande do Sul-Brazil; 25. São João do Polêsine, Rio Grande do Sul-Brazil (2010); 26. Bagé-Rio Grande do Sul-Brazil (-); 27. Laguna Negra-Uruguai (2000); 28. Belterra, Pará-Brazil (2011); 29. Santarém, Pará-Brazil (2011); 30. Toro Negro-Puerto Rico (1994); 31. Monkey Hill, Saint Kitts Island (2005); 32. El Tuito-México (2004).

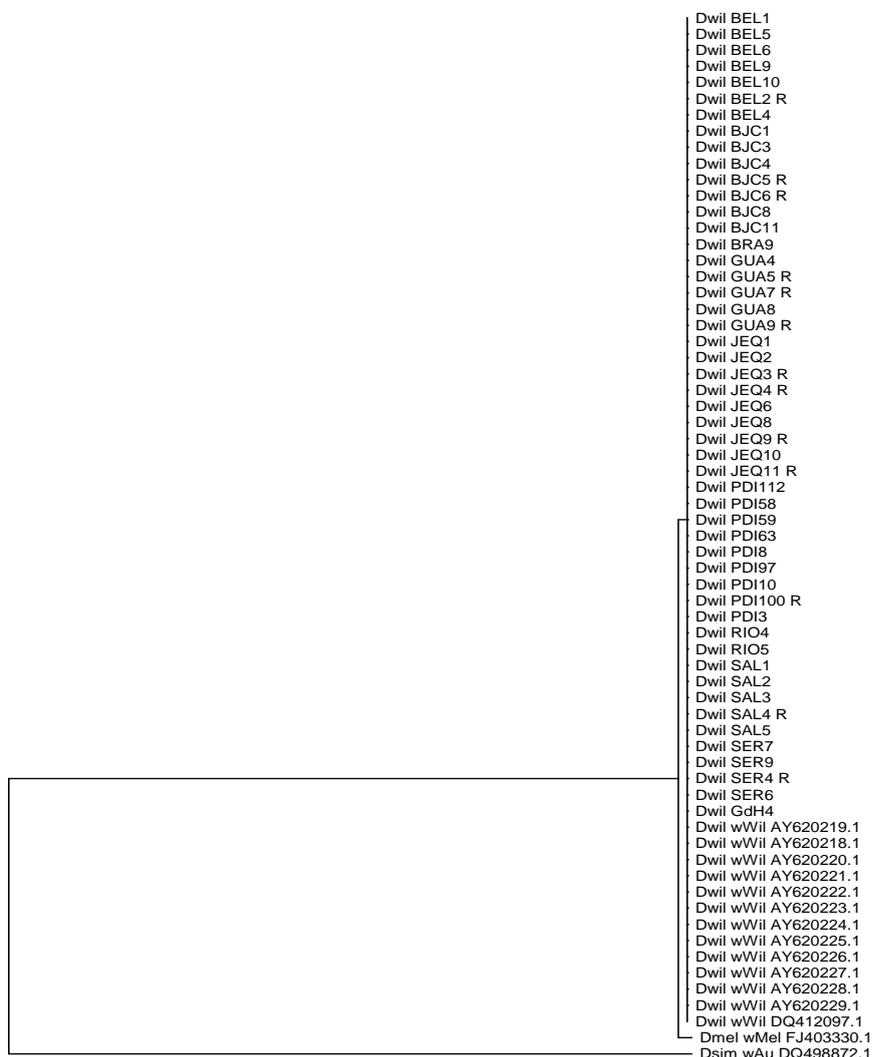


Figure 4 Phylogram of the *wsp* gene of *Wolbachia pipientis* in *Drosophila willistoni* (Dwil) samples analyzed in the present study, the sequences obtained from Miller and Riegler (2006) (AY6202018.1 to AY6202029.1) and from Mateos et al. (2006) (DQ412097.1).

wWil sequences obtained from Miler and Riegler (2006): AY6202018.1, Veracruz-México-1998; AY6202019.1, Belize-1974, AY620220.1, Basse Terre-San Cristovan Island-1991; AY620221.1, Basse Terre-San Cristovan Island-2000; AY620222.1, Guana Island-Antilhas-1991; AY620223.1, Jatón Sacha-Ecuador-1997; AY620224.1, Laguna Negra-Uruguai-2000; 2000AY620225.1, Saint Vincent/Grenadines-Antilles-1997; AY620226.1, Panamá City-Panamá-2002; AY620227, Panamá City-Panamá-1998; AY620228.1.1, Belem-Pará-Brazil-1997; AY620229.1, Ribeirão Preto-São Paulo-Brazil-1995. The wWil obtained from Mateos et al. (2006), called DQ412097.1 does not inform the site *D. willistoni* was collected. wMel samples (FJ403330.1) of *Drosophila melanogaster* (Wang and Zheng, unpublished data) and wAu samples (DQ498872.1) of *Drosophila simulans* (Ioannidis et al., 2007) were included in this analysis as outgroups.

## 7 Capítulo IV

### Artigo 4



ANNALS OF THE  
ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA

Artigo a ser submetido à revista *Annals of the Entomological Society of America*

ISSN 0013-8746

Fator de impacto 2016: 1.222 (B3 – CBI)

Normas para submissão estão no Anexo 4

### **Composição de Drosophilidae (Insecta, Diptera) em fragmentos de florestas tropicais úmidas do Brasil**

Zilpa das Graças Silva De Melo<sup>1</sup>, Danubia Guimarães Silva<sup>2</sup>, Geórgia Fernanda de Oliveira<sup>2</sup>, Rita Dayanne Coutinho da Silva<sup>2</sup>, Martín Alejandro Montes<sup>3</sup>, Ana Cristina Lauer Garcia<sup>2</sup>, Rita de Cassia de Moura<sup>4</sup> e Claudia Rohde<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Bioquímica, Genética e Sequenciamento, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil.

\* Correspondência para Claudia Rohde, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. E-mail: claudia.rohde@yahoo.com.br

Palavras-chave: abundância, espécies neotropicais; espécies exóticas; Floresta Amazônica; Floresta Atlântica; riqueza de espécies.

## Resumo

As Florestas tropicais úmidas e suas variadas fitofisionomias, apresentam-se altamente fragmentadas em decorrência da exploração madeireira e expansão agrícola e urbana. Apesar disto, esses ecossistemas detêm elevada biodiversidade de insetos. Neste trabalho foi analisada a riqueza, abundância e composição de drosofilídeos em seis áreas de florestas úmidas no Brasil, inseridas nos biomas Floresta Atlântica e Amazônica. Foram coletados 15.738 drosofilídeos de 32 espécies, sendo 26 neotropicais e seis exóticas. As espécies neotropicais mais abundantes foram *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *D. sturtevanti*. Em todos os ambientes amostrados *D. malerkotliana* foi a espécie exótica predominante. A composição e a abundância das espécies variaram entre as áreas investigadas. Apesar da fragmentação e redução das florestas tropicais úmidas estes ambientes ainda abrigam grande diversidade e abundância de drosofilídeos neotropicais.

## Introdução

Os ambientes naturais são os mais importantes para a sobrevivência e diversidade das espécies (Wink et al., 2005). Dentre estes, as florestas tropicais úmidas se destacam por apresentar uma das maiores riquezas do globo. Estes territórios estão localizados nas zonas intertropicais do planeta e apresentam clima quente, recebendo chuvas durante o ano todo (Turner e Corlett, 1996; Moore, 1998; Kozlowski, 2002; Turner, 2004).

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical úmida do planeta, com 60% de seu território localizado no Brasil (IBGE, 2010). Por sua vez, a Floresta Atlântica, é o terceiro bioma em área geográfica no Brasil, cobrindo aproximadamente 13% do território nacional. Dentro deste país situa-se 92% da área da Floresta Atlântica (Tabarelli et al., 2005, IBGE, 2010). Devido ao desmatamento, a Floresta Amazônica apresenta redução de aproximadamente 15% de sua cobertura vegetal (IBGE, 2010). Para a Floresta Atlântica a situação é ainda mais grave, pois resta menos de

10% de sua área original. O fato de abrigar elevada riqueza e endemismos associados ao elevado número de espécies em risco de extinção coloca a Floresta Atlântica como um *hotspot* mundial para a conservação da biodiversidade (Myers et al., 2000, Fundação SOS Mata Atlântica, 2017).

A elevada redução das florestas tropicais úmidas tem ameaçado a diversidade e o equilíbrio das espécies neste ambiente (Terborgh e Winter 1980; Tilman et al., 1994; Myers, 2000). A fragmentação florestal também favorece a introdução de espécies invasoras, que por suas vantagens competitivas por recursos acabam sendo favorecidas pela ausência de inimigos naturais. As espécies invasoras alteram as relações ecológicas previamente estabelecidas, podendo levar a extinção de espécies nativas (Mack et al., 2000; D' Antonio et al., 2001; Sax et al., 2007; Sampaio e Schmidt, 2014).

Nos ambientes florestais os insetos são os organismos de maior ocorrência, sendo um dos grupos mais diversificados e abundantes, mas o número de ordens, famílias e espécies tendem a diminuir com o aumento da antropização ambiental (Filho, 1995; Thomazini, 2000, 2002). Dentro deste grupo os drosofilídeos são especialmente importantes em estudos voltados à análise da qualidade dos ambientes como detentores de riqueza e diversidade. Dentre as vantagens destes insetos neste tipo de investigação está o fato de serem moscas pequenas e abundantes, que produzem várias gerações em um curto espaço de tempo, apresentam facilidade na captura e manuseio e são sensíveis às mudanças nas condições de habitat. Outro ponto relevante é o fato de estarem representadas por espécies nativas e exóticas (Parsons, 1991; Powell, 1997; Avondet et al., 2003; Mata et al., 2008, 2010).

Conhecer a biodiversidade das florestas tropicais úmidas é o primeiro passo na busca por meios eficientes para conservá-las. Assim, o presente trabalho avaliou a riqueza, abundância e composição de drosofilídeos em diferentes florestas tropicais úmidas do Brasil, com ênfase nas espécies neotropicais e exóticas.

## **Materiais e Métodos**

### *Amostras de drosofilídeos*

Moscas adultas da família Drosophilidae foram coletadas em seis fragmentos de florestas úmidas no Brasil, sendo cinco localizados no domínio da Floresta Atlântica e um na Floresta Amazônica, Figura 1. As amostragens de drosofilídeos foram realizadas em 2013 e 2014 no período de maior pluviosidade, Tabela 1.

Em cada localidade investigada, foram distribuídas 20 armadilhas com isca de banana preparadas conforme a descrição de Tidon e Sene (1998). As armadilhas foram dispostas em um transecto linear, distanciadas 30 metros umas das outras e penduradas a 1,5 metro do nível do solo, onde permaneceram por 48 horas até serem recolhidas.

#### *Identificação dos drosofilídeos*

Os drosofilídeos capturados foram transferidos para frascos contendo meio de cultura padrão para Drosophilidae, e transportadas para o laboratório, onde as moscas foram adormecidas com uso de éter etílico, e individualmente identificadas. As espécies foram determinadas com base na morfologia externa, utilizando chaves de identificação taxonômica e descrições de espécies (Freire-Maia e Pavan, 1949; Frota-Pessoa, 1954; Val e Sene, 1980; Val, 1982; Vilela, 1983; Vilela e Bächli, 1990; Chassagnard e Tsacas, 1993; Bächli et al., 2004; Culik e Ventura, 2009; Poppe et al., 2014). A identificação de espécies dentro de alguns grupos crípticos foi realizada pela análise da genitália masculina (Salles, 1948; Burla et al., 1949; Breuer e Pavan, 1950; Malogolowkin 1952; Magalhães e Björnberg, 1957; Vilela, 1983; Vilela e Bächli, 1990; Vilela et al., 2002; Bächli et al., 2004; Rohde et al., 2010).

#### *Análises ecológicas*

A partir dos dados de ocorrência de cada espécie de drosofilídeo (abundância  $N$ ), foi calculada a riqueza ( $S$ ) e dominância ( $D$ ) das seis amostragens de drosofilídeos. Estes parâmetros foram utilizados para estimar os índices de diversidade Shannon-Wiener ( $H'$ ), Simpson  $1-D$  e o índice de equitabilidade de Pielou, calculados no programa Ecological Methodology (Kenney e Krebs, 2000). Dendogramas utilizando os índices de Morisita e Jaccard foram construídos com o programa PAST versão 1.94b (Hammer et al., 2001), a fim de analisar a similaridade e dissimilaridade média entre todos os pares de amostras. A estimativa de riqueza de espécies foi calculada pelos índices ACE, ICE, Chao 1, Chao 2, Jack 1 e Jack 2

no software EstimateS v.8.2.0 com 10.000 aleatorizações (Colwell, 2009), utilizando informações sobre a frequência de espécies raras em cada amostra, com a finalidade de estimar o número de espécies não detectadas em uma assembleia (Gotelli e Chao, 2013). Também foi calculada no EstimateS v.8.2.0 a curva do coletor, para verificar a suficiência amostral das coletas.

## Resultados

Foram amostrados 15.738 indivíduos da família Drosophilidae pertencentes a 32 espécies, sendo 26 Neotropicais e seis exóticas (Tabela 2). Seis gêneros foram amostrados, dos quais *Drosophila* foi o mais representativo com 27 espécies, seguido por *Amiota*, *Scaptodrosophila*, *Zaprionus*, *Zygothrica* e *Neotanygastrela* com uma espécie cada. A maior riqueza de espécies foi observada em BJC, uma área de Floresta Atlântica inserida na sub-região de Brejo de Altitude. A área de Floresta Amazônica apresentou o menor número de espécies. Os estimadores de riqueza apontaram, no entanto, a área de Floresta Amazônica (BEL) como a mais rica, seguida por GUA, JEQ, PDI, BJC e SAL (Figura 2). O índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ) e o de Simpson ( $1-D$ ), foram mais altos em BJC e mais baixos em SAL (Tabela 2). Estes dois locais apresentaram, conseqüentemente, a menor e a maior dominância de espécies. A equitabilidade ( $J$ ) foi menor em SAL e maior em JEQ.

O dendograma de similaridade (Figura 3) com índice de Morisita diferenciou a assembleia de drosofilídeos de BJC das amostras das demais áreas de florestas úmidas. Esse padrão não se repetiu no dendograma de Jaccard. Nos dois dendogramas foi observada maior similaridade entre PDI e BEL. As curvas de rarefação de espécies foram construídas considerando que os locais investigados possuem o mesmo número de indivíduos coletados. Os dados desta análise mostram que BJC apresentou a maior curva de riqueza, seguido por JEQ (Figura 4). A curva do coletor apresentou-se contínua e em ascensão para as assembleias de drosofilídeos aqui investigadas (Figura 5).

As espécies neotropicais representaram 41,8% da amostragem, sendo principalmente representadas por *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *D. sturtevanti*. Juntas estas três espécies responderam por quase 92% da abundância das espécies neotropicais coletadas. As espécies exóticas foram principalmente representadas

por *D. malerkotliana* em todas as áreas investigadas. Essa espécie representou 56,13% da amostragem total e 96,43% da abundância do grupo das exóticas (Tabela 3). Apenas em duas localidades, BEL e SAL, a abundância relativa das espécies exóticas foi maior em comparação com as espécies neotropicais (Figura 6).

## Discussão

Neste trabalho foi investigada a riqueza, a abundância e a composição de drosofilídeos em seis áreas de florestas tropicais úmidas do Brasil, inseridas nos biomas Floresta Atlântica e Amazônica. Os índices de heterogeneidade/diversidade (Shannon e Simpson) apontaram BJC, um fragmento de Floresta Atlântica situado na sub-região Brejos de Altitude, como o ambiente mais diverso. Este dado corrobora com os dados de Monteiro et al. (2016) que também investigaram a fauna de drosofilídeos em áreas de brejos de altitude na Floresta Atlântica, observando alta riqueza e diversidade de espécies. Os valores de  $H'$  aqui registrados foram mais altos quando comparados com estudos da fauna de drosofilídeos em outras áreas de florestas úmidas no Brasil (Gottschalk et al., 2007; Schmitz et al., 2010; Praxedes e Martins, 2014).

Os ambientes com maior similaridade, levando em consideração a presença e abundância de espécies foram PDI e BEL, apesar de representarem biomas diferentes, Floresta Atlântica e Amazônica, respectivamente. JEQ e SAL também apresentaram similaridades quanto à presença de espécies, no entanto, pertencem a duas diferentes subregiões da Floresta Atlântica (Bahia e Pernambuco). Enquanto que BJC e GUA (subregião Brejos de Altitude e Pernambuco, respectivamente), apresentaram similaridades na abundância de espécie.

SAL apresentou o menor índice de equitabilidade e uma maior dominância. Isto pode ser justificado pelo fato desta coleta ter sido realizada a poucos metros da borda da reserva, nesse caso, o efeito de borda pode ter influenciado na composição das espécies (Bernardi e Budke, 2009; Reis e Conceição, 2010; Oliveira et al., 2013; Penariol e Madi-Ravazzi, 2013).

Todos os ambientes investigados apresentaram espécies nativas e exóticas em suas composições, sendo as exóticas as mais abundantes, o que demonstra a capacidade destes indivíduos colonizar diferentes ambientes com variadas

estruturas florísticas, e nos últimos anos a introdução destas espécies tem sido reconhecida como umas das principais causas da perda da biodiversidade (Mack et al., 2000; McKiney, 2008). Entre os ambientes amostrados, BJC foi o local com menor abundância de espécies exóticas, o mesmo dado foi encontrado por Monteiro et al. (2016) estudando a diversidade de drosofilídeos em brejos de altitude no nordeste do Brasil, onde também observaram um baixo percentual de espécies exóticas em detrimento de elevadas abundâncias de espécies nativas em brejos de altitudes, sendo estes ambientes elevados, um reduto para espécies nativas.

A abundância das espécies exóticas superou a de neotropicais em quatro dos seis locais amostrados, ocorrendo com maior destaque em SAL e BEL. A dominância desses organismos ocorre principalmente em regiões com elevados níveis de antropização e de fragmentação florestal (Martins, 2001; Ferreira e Tidon, 2005; Gottschalk et al., 2007). Penariol e Madi-Ravazzi estudando os efeitos da fragmentação florestal sobre a riqueza e abundância de drosofilídeos, observaram maior abundância de espécies exóticas em fragmentos florestais mais perturbados e na borda dos fragmentos. A presença de espécies exóticas com abundância maior que as nativas pode ser um alerta em relação à capacidade invasora e competitiva dessas espécies em relação às neotropicais, uma vez que podem competir pelos recursos alimentares disponíveis (Mack e D'Antonio, 1998; Mack et al., 2000).

Dentre os drosofilídeos exóticos registrados no Brasil, nossos resultados mostram *D. malerkotliana* como a espécie exótica mais abundante, isto reforça os achados de Coutinho-Silva et al. (2017) referentes a fauna de drosofilídeos nas estações seca e chuvosa nos fragmentos de Floresta Atlântica de Pernambuco. Esta espécie de drosofilídeo apresenta rápida dispersão, e é considerada generalista quanto aos recursos utilizados, e sua versatilidade em ocupar diferentes fitofisionomias tem contribuído para sua colonização em várias regiões do país (Martins, 1987, 1989; Garcia et al., 2005; Tidon, 2006; Rohde et al 2010; Silva, 2010; Castro et al., 2015; Monteiro et al., 2016).

No Norte do Brasil, por exemplo, na Floresta Amazônica, Martins (2001) observou, uma abundância de 57 % de *D. malerkotliana* entre os drosofilídeos coletados em uma região de floresta alterada, após três anos de fragmentação. Já no Nordeste do Brasil, em áreas de Floresta Atlântica, Silva (2014), Coutinho-Silva

et al., (2017) e Silva (2017) além da *D. malerkotliana*, relataram *Zaprionus indianus* e *D. simulans* como as espécies exóticas mais abundantes deste bioma, evidenciando a facilidade de colonização destas espécies em diferentes ambientes.

Nossos dados parecem indicar que a invasão e colonização das espécies exóticas, nas florestas úmidas, podem estar sendo favorecida pelo aumento da fragmentação desses ambientes, e consequente mudança de suas características originais, tornando mais fácil a dispersão dessas espécies menos exigentes do ponto de vista ecológico.

Já entre as espécies nativas mais representativas neste estudo, as espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* (*D. willistoni* e *D. paulistorum*) foram as mais abundantes. No Nordeste do Brasil, essas espécies caracterizam-se por colonizar principalmente ambientes florestais como brejos de altitude (Monteiro et al., 2016), fragmentos de Floresta Atlântica (Silva, 2010; Garcia et al., 2014, Coutinho-Silva, et al., 2017), e com menor abundância em ambientes de Caatinga (Oliveira et al., 2016). Em outras regiões do país, também é realçado a preferência das espécies *D. willistoni* e *D. paulistorum* por ambientes de Floresta Atlântica, dados como estes foram observados na região sudeste (Medeiros e Klaczko, 2004; Penariol e Madi-Ravazzi, 2013) e região sul (Dobzhansky e Pavan, 1950; Dobzhansky, 1957; Gottschalk et al., 2007, Garcia et al., 2014), na região norte, a Floresta Amazônica, também classificada como floresta úmida, não foge desse padrão (Martins, 1987, 2001).

Segundo Dobzhansky (1957) e Spassky et al. (1971) estas espécies neotropicais (*D. willistoni* e *D. paulistorum*) apresentam preferência por ambientes mais úmidos, e dentre os fatores abióticos, a umidade é um dos principais fatores que influenciam a fauna e o desenvolvimento dos drosofilídeos (Garcia et al., 2014; Poppe et al., 2015), especialmente do subgrupo *willistoni* (Dobzhansky, 1957; Spassky et al., 1971), resultados que corroboram com os achados deste estudo.

Entre *D. willistoni* e *D. paulistorum*, a primeira espécie foi a mais abundante nos ambientes aqui estudados. O mesmo foi observado em outras áreas de florestas úmidas do Brasil (Medeiros e Klaczko 2004; Schmitz et al., 2007; Garcia et al., 2008; 2012; Rohde et al., 2010; Garcia et al., 2014; Coutinho-Silva et al., 2017) e de outros

países localizados nas Américas Central e Sul (Dobzhansky 1957, Spassky et al., 1971, Acurio e Rafael 2009).

Nos ambientes florestais, a umidade é persistente mesmo em épocas de chuvas escassas (Por et al., 2005), mantendo os recursos estáveis e fazendo com que o número de indivíduos das espécies *D. willistoni* e *D. paulistorum* estejam sempre presentes, mesmo que em números reduzidos. Nos ambientes secos, a abundância de *D. willistoni* é menor em épocas de seca quando comparado a épocas chuvosas (Garcia et al., 2014) e *D. paulistorum* é praticamente inexistente nessa situação (Valadão et al., 2010; Rohde et al., 2010, Oliveira et al., 2016). Em períodos de estiagem, os recursos alimentares ficam mais escassos e isso interfere na composição e abundância das espécies dos drosofilídeos (Sano e Almeida, 1998).

*Drosophila sturtevanti* apresentou variação na abundância entre os locais, sendo SAL o ambiente mais abundante, mas de modo geral, juntamente com *D. willistoni* e *D. paulistorum* foram às espécies nativas mais abundantes do estudo. Alguns estudos investigando a fauna de drosofilídeos em diferentes fitofisionomias observaram que heterogeneidade ambiental não afetou a abundância da *D. sturtevanti* (Mata e Tidon, 2013; Oliveira et al., 2016).

O número de espécies coletadas para a Floresta Atlântica neste estudo foi inferior a outros estudos que também investigaram a fauna de drosofilídeos em fragmentos de Floresta Atlântica do nordeste do Brasil (Monteiro et al., 2016; Coutinho-Silva et al., 2017). Já a riqueza obtida para a Floresta Amazônica, foi inferior a esperada, considerando que as taxas de endemismo são semelhantes nos diferentes biomas brasileiros. Dentre os vários fatores que põe em risco o bioma, destaca-se a contaminação dos rios e solos por metais pesados, principalmente o mercúrio usado em atividades de garimpo e, principalmente, o desmatamento desenfreado causado pelo uso irregular do solo em atividades agropecuárias e a exploração ilegal da madeira (Ministério do meio ambiente, 2017).

As curvas de rarefação e do coletor mostraram-se com perfis ascendentes. No entanto, a estabilidade das curvas de acumulação de espécies em grupos megadiversos é raramente alcançada (Praxedes e Martins, 2014), isto é esperado, visto que as florestas tropicais úmidas abrigam grande diversidade de espécies e os

ambientes devem ser melhor explorados, com um número maior de amostragens a fim de que mais espécies sejam contabilizadas.

### **Conclusões**

Os resultados levantados mostraram que as áreas de florestas tropicais úmidas investigadas neste estudo apresentaram semelhanças em suas composições de espécies, com elevadas abundâncias, tanto de espécies nativas como de exóticas da família Drosophilidae. Entre as espécies neotropicais *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* e *D. sturtevanti* foram às mais abundantes e esteve dentro do esperado para ambientes de florestas tropicais úmidas. Em todos os ambientes amostrados *D. malerkotliana* foi à espécie exótica predominante. Com relação à abundância e a composição de espécies, estes parâmetros variaram entre os locais amostrados.

Apesar da elevada fragmentação e redução desses biomas, estas florestas ainda abrigam uma grande diversidade e abundância de drosofilídeos neotropicais. No entanto, há a necessidade de mais inventários biológicos e um considerável esforço de amostragem também é necessário para se identificar os padrões e os processos ecológicos e biogeográficos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem às agências financiadoras Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco (PROPESQ-UFPE).

### **Referências**

- Acurio A, Rafael V e Dangles O (2010) Biological invasions in the Amazonian Tropical Rain Forest: the case of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in Ecuador, South America. *Biotropica* 42, 717-723.
- Avondet, J.L.; Blair, R.B.; Berg, D.J. & Ebbert, M.A. 2003. *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. *Environmental Entomology*, 32:347-358.
- Bächli G, Vilela CR, Escher AS e Saura A (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 39:1.

- Bernardi SE, BUDKE JC (2010) Estrutura da sinúsia epifítica e efeito de borda em uma área de transição entre floresta estacional semidecídua e floresta ombrófila mista, *Floresta*, 40(1): 81-92, jan./mar.
- Breuer ME, Pavan C (1950) Genitália masculina de *Drosophila* (Diptera) grupo annulimana. *Revista Brasileira de Biologia* 10:469-488.
- Burla H, Da Cunha AB, Cordeiro AR, Dobzhansky T, Malogolowkin C e Pavan C (1949) The willistoni group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 3:300-314.
- Castro IFA, Verçosa CJ, Silva-Coutinho RD, Oliveira GF, Garcia ACL, Rohde C (2015) Richness of drosophilids in a naturally radioactive place in the Caatinga biome, northeast Brazil. *Drosoph. Inf. Serv.* 98:80-83.
- Chassagnard MT, Tsacas L (1993) Le sous-genre *Zaprionus* s. str. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-goup vittiger (Diptera: Drosophilidae). *Annales Société Entomologique de France* 29, 173–194.
- Colwell R (2009) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples, Version 8.2. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>
- Coutinho-Silva RD, Montes MA, Oliveira GF, Carvalho-Neto FG, Rohde C and Garcia ACL, (2017) Effects of seasonality on drosophilids (Insecta, Diptera) in the northern part of the Atlantic Forest, Brazil. *Bull Entomol Res* 2:1-11.
- Cockerham CC, Weir BS (1984) Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics*, 157-164.
- Culik MP, Ventura JA (2009) New species of *Rhinoleucophenga*, a potencial predator of pineapple mealybugs. *Pesq. Agropec. Bras.* 44(4):417-420.
- D'Antonio C, Meyerson LA, Denslow J (2001). Exotic species and conservation: research needs. In M. E. Soule, & G. H. Orians (eds.), *Conservation biology: research priorities for the next decade* (pp. 59-80). Island Press: Washington, DC.
- Dobzhansky T (1957) Chromosomal variability in Islands and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution* 11:280-293.
- Dobzhansky T, Pavan C (1950) Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *The Journal of Animal Ecology* 19(1):1-14.
- Ferreira LB, Tidon R (2005) Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodiversity and Conservation*, 14:1809-1821.
- Filho EB (1995) Cupins e florestas. In: Filho EB, Fontes LR. (Org.). *Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba: FEALQ, p.127-140.
- Flybase (2016) disponível em [www.flybase.org.br](http://www.flybase.org.br), acesso em julho/2016.
- Freire-Maia A. e Pavan C (1949) Introdução ao estudo da drosófila. *Cultus* 1:3-66.
- Frota-Pessoa O (1954) Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense*, 10(6), 253-304.

- Fundação SOS Mata Atlântica. Florestas – Mata Atlântica. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>, acesso em: 20/06/2017.
- Garcia AC, Silva DM, Monteiro AG, Oliveira GF, Montes MA, Rohde C. (2014) Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 107(5): 975-982.
- Garcia ACL, Gottschalk MS, Audino GF, Rohde C, Valiati VH, Valente VL. (2005) First evidence of *Drosophila malerkotliana* in the extreme south of Brazil (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). *Drosoph. Inf. Serv.* 88:28-30.
- Garcia ACL, Valiati VH, Gottschalk MS, Rohde C, Valente VLS (2008) Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia Série Zoologia* 98:329-338.
- Garcia CF, Hochmüller CJC, Valente VLS, Schmitz HJ (2012) Drosophilid assemblages at different urbanization levels in the city of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Neotropical Entomology* 41:32-41.
- Gotelli NJ, Chao A (2013) Measuring and estimating species richness, species diversity, and biotic similarity from sampling data. *Encyclopedia of Biodiversity* 5:195-211.
- Gottschalk MS, De Toni DC, Valente VLS, Hofmann RP (2007) Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanization gradient. *Neotropical Entomology*, 36(6):848-861.
- Hammer HDAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9. Acesso em: dezembro de 2010. Disponível em: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Geografia do Brasil:
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1987) Geografia do Brasil: Região Centro-Oeste. Rio de Janeiro: IBGE, 1987. p- 23-35.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010) Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pa>. (acesso em: 08 December 2015).
- Kenney AJ e Krebs CJ (2000) Programs for Ecological methodology. 2nd edn. Vancouver, Canada, University of British Columbia.
- Kozłowski TT (2002) Physiological ecology of natural regeneration of harvested and disturbed forest stands: implications for forest management. *Forest Ecology and Management* 158:195-221.
- Mack MC, D'Antonio CM (1998) Impacts of biological invasions on disturbance regimes. *Trends Ecol Evol.* 13:195-198.
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, et al. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications* 10(3):689-710.

- Magalhães LE, Björnberg AJS (1957) Estudo da genitália masculina de *Drosophila* do grupo *saltans* (Diptera). *Revista Brasileira de Biologia* 17:435-450.
- Malogolowkin C (1952) Sobre a genitália dos “Drosophilidae” (Diptera). III. Grupo willistoni do gênero *Drosophila*. *Revista Brasileira de Biologia* 12:79-96.
- Martins MB (1987) Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). [Tese], Belém: Universidade Federal do Pará.
- Martins MB (1989) Invasão de fragmentos florestais por espécies oportunistas de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Acta Amaz.* 19:265-271.
- Martins MB (2001) *Drosophilid* fruit-fly guilds in Forest fragments, In: Bierregaard Jr, RO, Gascon, C, Lovejoy TE, Mesquita R. (Eds.). *Lessons from Amazonia: the ecology and conservation of a fragmented forest*. New Haven: Yale University Press. p. 175-186.
- Mata RM, Tidon R (2013) The relative roles of habitat heterogeneity and disturbance in drosophilid assemblages (Diptera, Drosophilidae) in the Cerrado. *Insect Conservation and Diversity*, 6:663-670.
- McKinney ML (2008) Effects of urbanization on species richness: A review of plants and animals. *Urban Ecosystems*, 11(2):161-176.
- Medeiros HF, Klaczko LB (2004) How many species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) remain to be described in the forests of Sao Paulo, *Biota Neotropica*, 4:1–12.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos> acesso em 10/07/2017.
- Monteiro LS, Garcia ACL, Oliveira GF, Rohde C. (2016) High diversity of Drosophilidae in High-Altitude wet forests in Northeastern Brazil. *Neotrop Entomol* 45(3):265-273.
- Moore PD (1998) Did the forests survive the cold in a hotspot? *Nature* 391:124-127.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA, e Kent J (2000) Biodiversity hot spots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Müller HJ (1940) Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: *The New Systematics*. Huxley J (ed). Oxford, Clarendon Press, p.185-268.
- Oliveira CM, Barreto PAB, Gomes AS, Guimarães SO (2013) Efeito de borda e decomposição da serapilheira foliar de um Fragmento florestal, em vitória da conquista – BA. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 9(17):1150.
- Oliveira GF, Rohde C, Garcia ACL, Montes, MA e Valente, VLS (2016) Contributions of dryland forest (Caatinga) to species composition, richness and diversity of Drosophilidae. *Neotropical Entomology* 45:537-547.
- Parsons PA (1991) Biodiversity conservation under global climatic change: the insect *Drosophila* as biological indicator? *Global Ecology and Biogeography* 1(3):77-83.

- Papaceit M, Juan E (1998) Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. *Chromosome Research*, 6:49-54.
- Penariol LV, Madi-Ravazzi L (2013) Edge-interior differences in the species richness and abundance of drosophilids in a semideciduous forest fragment. *Springer plus*, p. 1-7.
- Poppe JL, Schmitz HJ, Callegari-Jacques SM e Valente VLS (2015) Environmental determinants on the assemblage structure of drosophilid flies in a temperate-subtropical region. *Neotropical Entomology* 44:140-152.
- Poppe JL, Schmitz HJ, Grimaldi D, Valente VLS (2014) High diversity of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the Pampas Biome of South America, with descriptions of new *Rhinoleucophenga* species. *Zootaxa*, 3779:215–245.
- Por FD, Imperatriz-Fonseca VL, Lencioni F (2005) Biomes of Brazil: an illustrated natural history/Biomas Brasileiros: uma história natural ilustrada. Sofia, Bulgária, Pensoft Publishers
- Powell JR (1997) Progress and prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* model. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Praxedes CLB, Martins MB (2014) Inventário biológico: riqueza, biodiversidade local e regional de Drosophilidae (Diptera) frugívoros. In Caxiuana: Desafios para Conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia, P. Lisboa, Org.). 4° ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, p. 521–537.
- Reis CS, Conceição, GM (2010) Aspectos Florísticos de um Fragmento de Vegetação, localizado no Município de Caxias, Maranhão, Brasil. *Scientia Plena*, v.6, n.2, p.25-40.
- Rohde C, Monteiro AGF, Cabral WBM, Silva DMIO, Oliveira GF, Montes MA e Garcia ACL (2010) The importance of identification of the *willistoni* subgroup of *Drosophila* at the species level: the first evidence of *D. equinoxialis* in the Northeast region of Brazil. *Drosophila Information Service* 93, 118–122.
- Salles H (1948) Sobre a genitália dos drosofilídeos (Diptera): I. *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans*. *Summa Brasiliensis Biologiae* 1, 311–383.
- Sampaio AB e Schmidt IB (2013) Espécies Exóticas Invasoras em Unidades de Conservação Federais do Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3(2):32-49.
- SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). Cerrado-ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados - CPAC, 1998. 556 p.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hastings A, Holt RD, Mayfield MM, O'Connor MI, Rice WR (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology e Evolution* 22:465-471.
- Schmitz HJ, Hofmann PRP, Valente VLS (2010) Assemblages of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) in mangrove forests: community ecology and species diversity. *Iheringia, Série Zoologia*, 100(2):133-140.

- Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP (2007) Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. *Neotropical Entomology*, 36:53-64.
- Silva DG (2017) Eficiências das florestas plantadas para manter a biodiversidade de drosofilídeos no norte da Floresta Atlântica. Dissertação de Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão. 74 pp.
- Silva DMIO (2010) Levantamento taxonômico da fauna de Drosophilidae em ambientes de Floresta Atlântica e Caatinga do estado de Pernambuco, Brasil. [Dissertação]. Recife: Universidade de Pernambuco.
- Spassky B, Richmond RC, Perez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T, Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25:29-143.
- Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota M e Bedê L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology* 19:695–700.
- Terborgh J, Winter B (1980) Some causes of extinction. Pp. 119-133. In: Soulé ME. e Wilcox, B. A. (Eds.). *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Thomazini MJ, Thomazini APBW (2002) Levantamento de insetos e análise entomofaunística em floresta, capoeira e pastagem no Sudeste Acreano. Rio Branco: EMBRAPA Acre, 41p. Circular Técnica, 35.
- Thomazini MJ, Thomazini APBW. (2000) A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. Rio Branco: EMBRAPA Acre, 21p. Circular Técnica, 57.
- Tidon R (2006) Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linnean Soc.*; 87(2): 233-247.
- Tidon R e Sene FM (1988) A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Information Service* 67, 89.
- Tilman D, May RM, Lehman CL e Nowak MA (1994). Habitat destruction and the extinction debt. *Nature* 371:65-66.
- Turner IM (2004) *The ecology of trees in the tropical rain forest*. Cambridge University Press, 314p.
- Turner IM e Corlett T (1996) The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Trends in Ecology and Evolution* 11(8):330-333.
- Val FC (1982) The male genitalia of some Neotropical *Drosophila*: Notes and illustrations. *Pap. Avulsos Zool.* 34:309–347.
- Val FC e Sene FM (1980) A newly introduced *Drosophila* species in Brazil (Diptera, Drosophilidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 33:293-298.

- Valadão, H., Hay, J.D.V., Tidon, R. (2010) Temporal dynamics and resource availability for drosophilid fruit flies (Insecta, Diptera) in a gallery forest in the Brazilian Savanna. *Int. J. Ecol.* 2010, Article ID 152437, 7 p.
- Vilela CR (1983) A revision of the *Drosophila* repleta species group (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 27:1-114.
- Vilela CR e Bächli G (1990) Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 63:1-332.
- Vilela CR, Silva AFG e Sene FM (2002) Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. III. The *cardini* group. *Revista Brasileira de Entomologia* 46:139-148.
- Wink C, Guedes JVC, Fagundes CK, Rovedder AP (2005). Insetos edáficos como indicadores da qualidade ambiental. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 4(1): 60-71.

## Tabelas e Figuras

Tabela 1. Localidades, códigos, coordenadas geográficas, áreas florestais e anos das amostragens de drosofilídeos nas florestas úmidas investigadas no Brasil.

Localidade	Código	Coordenadas	Área florestal	Ano de coleta
Marituba, Pará	BEL	1°25'59.6"S/ 48°19'22.2"W	Não definida	2015
Reserva Biológica de Guaribas Mamanguape, Paraíba	GUA	6°44'30.0"S / 35°08'32.7"W	3.016 ha	2013
Parque Dois Irmãos Recife, Pernambuco	PDI	8°00'30.9"S / 34°56'47.1"W	384,42 ha	2013
Parque João Vasconcelos Sobrinho, Caruaru, Pernambuco	BJC	8°22'01.2"S / 36°01'26.5"W	359 ha	2013
Reserva Biológica de Saltinho Tamandaré, Pernambuco	SAL	8°43'57.8"S / 35°10'21.0"W	562,57 ha	2013
Jiquiriçá, Bahia	JEQ	13°14'58.6"S / 39°34'60.0"W	Não definida	2013

Tabela 2. Abundância e índices de diversidade para os drosofilídeos amostrados em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil.

Gênero	Subgênero	grupo	Espécie	Localidades					
				BEL	GUA	PDI	BJC	SAL	JEQ
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>annulimana</i>	<i>D. ararama</i>	0	0	0	0	1	0
			<i>D. araicas</i>	0	0	0	3	0	0
			Não identificadas	0	0	1	0	1	0
	<i>cardini</i>	<i>D. cardini</i>	0	0	0	7	0	0	
		<i>D. cardinoides</i>	0	0	0	4	0	0	
		<i>D. neocardini</i>	0	12	0	48	5	8	
		<i>D. polymorpha</i>	0	0	0	62	12	0	
		Não identificadas	4	2	0	0	0	0	
		<i>repleta</i>	<i>D. ellisoni</i>	0	0	0	0	9	4
			<i>D. mercatorum</i>	0	1	0	0	0	0
	<i>D. querubimae</i>		0	0	0	2	0	0	
	<i>D. coroica</i>		0	0	0	0	19	0	
	Não identificadas		29	1	0	0	0	0	
	<i>tripunctata</i>	<i>D. mediopunctata</i>	0	0	0	0	0	2	

		<i>D. cuaso</i>	0	0	0	45	0	0	
		<i>D. paraguayensis</i>	0	0	0	135	0	0	
		Não identificadas	0	23	0	0	15	0	
	<i>caloptera</i>	<i>D. atrata</i>	0	0	2	0	0	0	
	<i>dreyfusi</i>	<i>D. camargoi</i>	0	1	0	1	0	0	
	<i>guarani</i>	<i>D. griseolineata</i>	0	0	0	17	0	0	
	<i>coffeata</i>	<i>D. coffeata</i>	0	0	0	1	0	0	
		Não identificadas	3	0	0	5	0	1	
	<i>Sophophora</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster*</i>	0	0	0	11	48	2
		<i>D. malerkotliana*</i>	1005	269	1676	16	5781	87	
		<i>D. simulans*</i>	0	2	1	2	134	0	
		<i>D. ananassae*</i>	16	0	15	9	14	16	
	<i>saltans</i>	<i>D. prosaltans</i>	0	2	0	0	0	0	
		<i>D. sturtevantii</i>	54	19	78	0	229	25	
		Não identificadas	0	2	0	0	0	0	
	<i>willistoni</i>	<i>D. willistoni</i>	484	1046	1553	341	1035	74	
		<i>D. paulistorum</i>	219	137	582	72	70	15	
		<i>D. nebulosa</i>	7	4	0	1	1	1	
		<i>D. fumipennis</i>	0	0	18	0	4	15	
	<b>Amiota</b>	Não identificadas	1	0	0	0	0	0	
	<b>Neotanygastreia</b>	<i>N. tricoloripes</i>	0	0	0	0	2	0	
	<b>Scaptodrosophila</b>	<i>S. latifasciaeformis*</i>	0	0	0	0	3	0	
	<b>Zygothrica</b>	<i>Z. orbitalis</i>	0	1	0	0	0	0	
	<b>Zaprionus</b>	<i>Z. indianus*</i>	0	12	35	0	6	0	
		<i>N</i>	1822	1534	3961	782	7389	250	
		<i>S</i>	6	12	9	18	17	11	
		<i>H'</i>	1.105	0.959	1.184	1.848	0.792	1.750	
		<i>1-D</i>	0.593	0.477	0.645	0.754	0.364	0.766	
		<i>D</i>	0.406	0.523	0.355	0.246	0.636	0.233	
		<i>J</i>	0.616	0.386	0.539	0.639	0.279	0.729	

N= abundância de indivíduos,  $S_{obs}$  = Riqueza de espécies observada,  $H'$  = Índice de diversidade de Shannon,  $1-D$  = índice de diversidade de Simpson,  $D$  = Dominância,  $J$  = Índice de equitabilidade de Pielou. \* Espécies exóticas na região neotropical. Os códigos das localidades são os mesmos indicados na Tabela 1.

Tabela 3. Abundância relativa de drosofilídeos exóticos na região Neotropical em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1.

Espécies exóticas na região	Locais de amostragem					
	BEL	GUA	PDI	BJC	SAL	JEQ
Neotropical						
<i>Drosophila ananasseae</i>	1.60	0.00	0.38	1.15	0.19	6.40
<i>Drosophila malerkotliana</i>	55.2	17.54	42.31	2.05	78.24	34.80
<i>Drosophila melanogaster</i>	0.00	0.00	0.00	1.41	0.65	0.80
<i>Drosophila simulans</i>	0.00	0.13	0.03	0.26	1.81	0.00
<i>Scaptodrosophila latisfaciaeformis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
<i>Zaprionus indianus</i>	0.00	0.78	0.88	0.00	0.08	0.00
Total	56.8	18.45	43.60	4.86	81.01	42.00



Figura 1. Mapa do Brasil com a indicação dos diferentes biomas que ocorrem no país. Os locais de amostragens de drosofilídeos nas florestas tropicais úmidas estão indicados sobre o mapa. 1. Marituba, Belém, Pará (BEL), 2. Reserva Biológica de Guaribas, Paraíba (GUA), 3. Parque Estadual Dois Irmãos, Pernambuco (PDI), 4. Parque Ecológico João Vasconcelos Sobrinho, Pernambuco (BJC), 5. Reserva Biológica de Saltinho, Pernambuco (SAL), 6. Jiquiriçá, Bahia (JEQ).

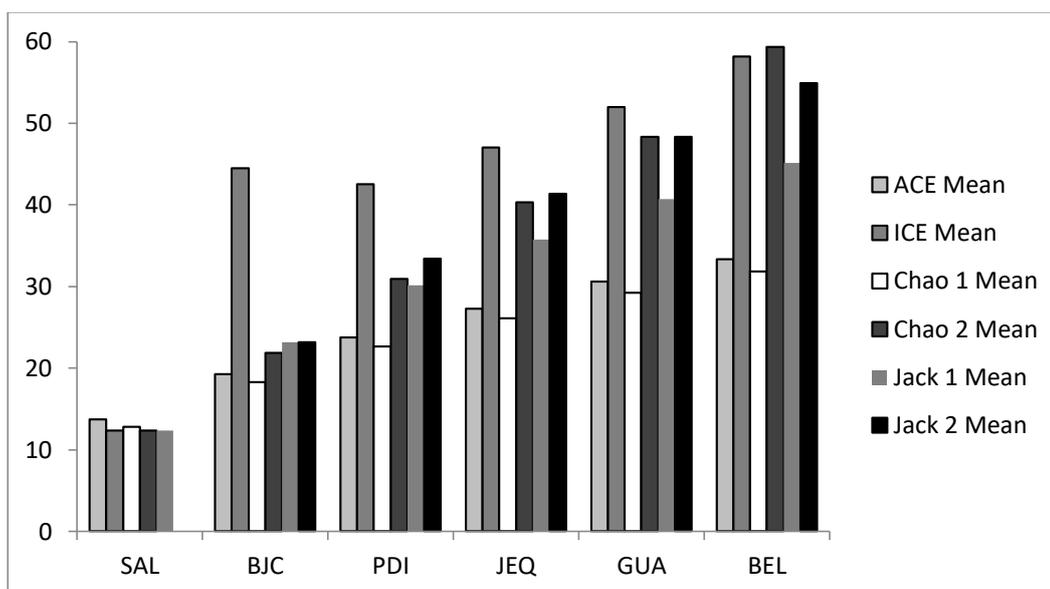


Figura 2. Estimadores de riqueza ACE, ICE, Chao 1, Chao 2, Jack 1 e Jack 2 para as seis áreas de florestas tropicais úmidas investigadas. Os códigos das localidades são os mesmos indicados na Tabela 1.

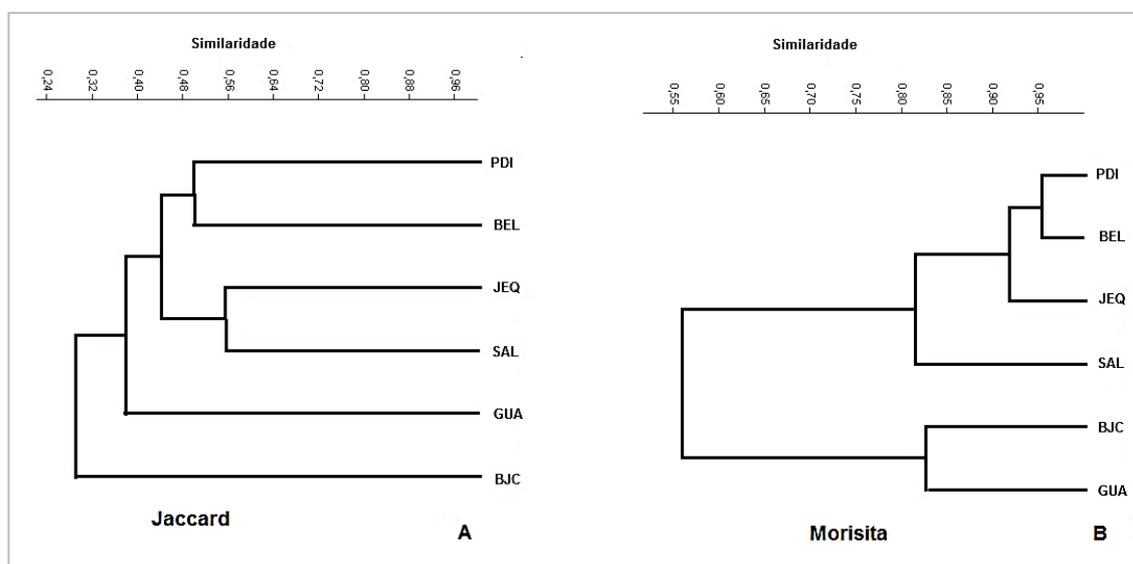


Figura 3. Dendrogramas de similaridade construídos com os índices de Jaccard (Cophcorr = 0,8804) (A) e (B) Morisita (Cophcorr = 0,7341) para as amostragens de drosofilídeos em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil. Os códigos das localidades são os mesmos indicados na Tabela 1.

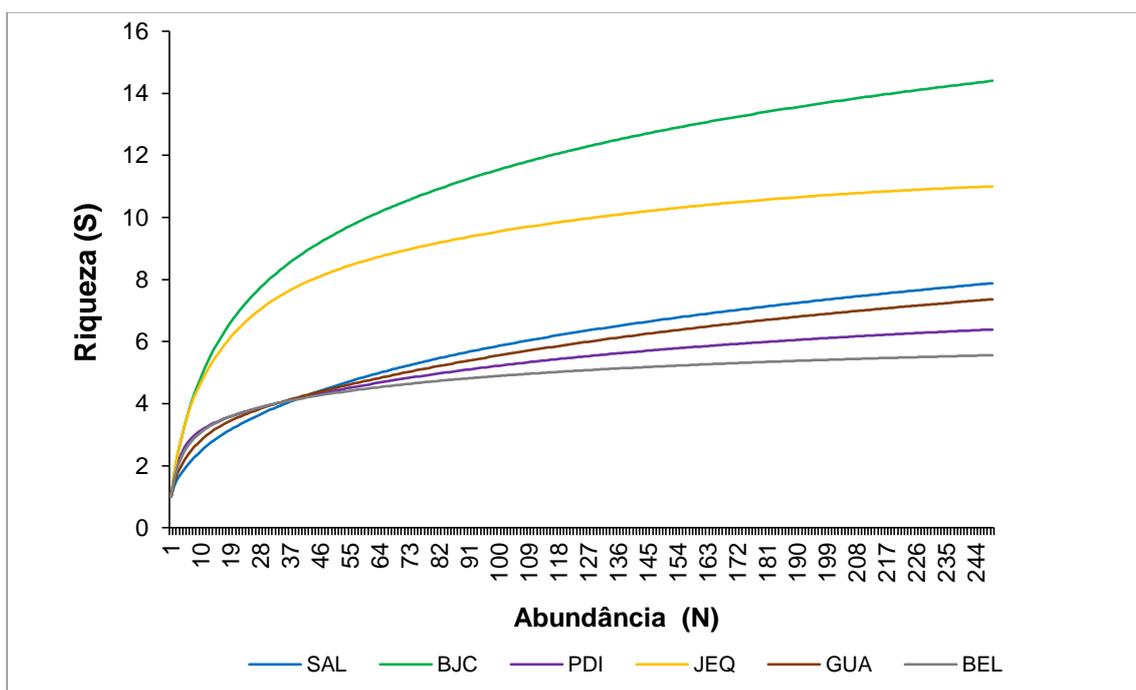


Figura 4. Curvas de rarefação de espécies baseadas na riqueza e abundância da assembleia de drosofilídeos construídas para as amostragens realizadas em seis áreas de florestas tropicais úmidas no Brasil. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1.

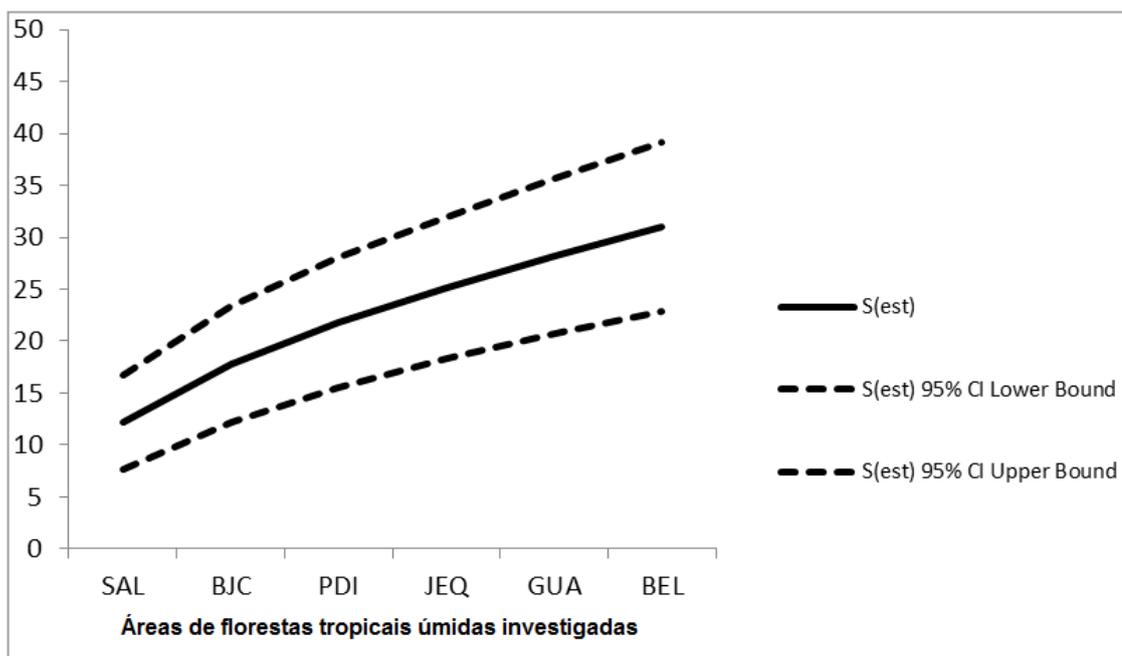


Figura 5. Curva de acúmulo de espécies (linha contínua) e intervalo de 95% de confiança (linhas tracejadas) para as amostragens de drosofilídeos realizadas em

diferentes florestas úmidas no Brasil. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1.

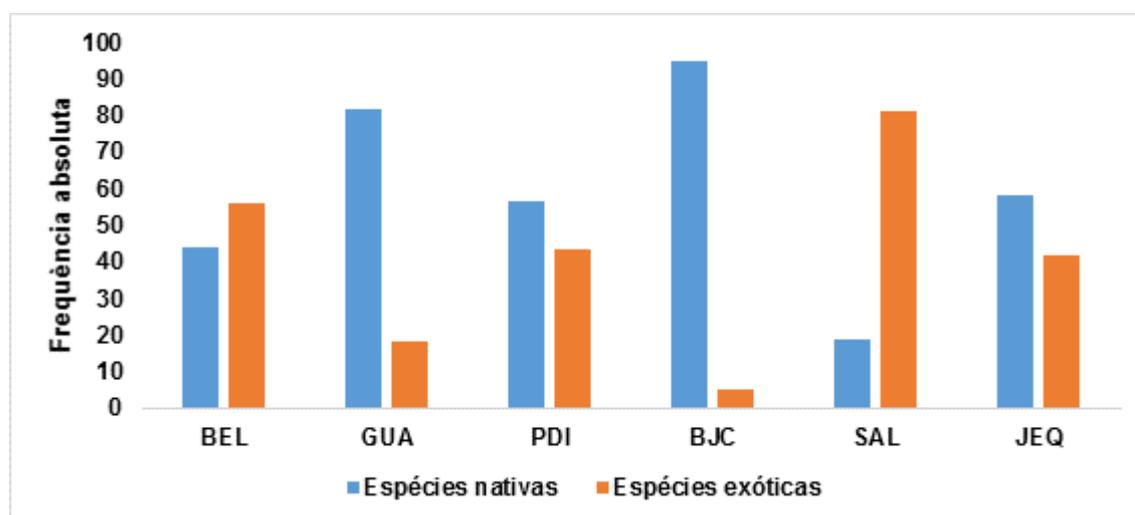


Figura 6. Abundância relativa de drosofilídeos nativos da região neotropical e exóticos nas seis áreas de florestas úmidas investigadas. Os códigos para os locais de amostragem são os mesmos utilizados na Tabela 1.

## 8 Discussão geral

A diversidade genética desempenha um papel importante na sobrevivência e adaptabilidade de uma espécie. Quando ocorrem mudanças no habitat, a capacidade da população em se adaptar ao ambiente em mudança determinará sua sobrevivência. A variação no *pool* de genes da população é, portanto, o fator que fornece traços variáveis aos seus indivíduos, que por meio da seleção natural, serão selecionados e irão direcionar mudanças adaptativas na população. Se uma espécie possui grupos genéticos muito diversificados, mais características adaptativas poderão ser selecionadas, em indivíduos mais aptos a sobreviver. A diversidade genética é também, essencial para que uma espécie evolua. Com pouca variação genética dentro da espécie, a reprodução saudável pode ser comprometida, com a prole sofrendo efeitos resultantes de endogamia, e aumento da vulnerabilidade a certos tipos de doenças.

*D. willistoni* tem se mostrado um importante modelo biológico em genética e vem sendo estudada desde 1916. As abordagens incluem uma ampla e variada caracterização de seu polimorfismo cromossômico, com presença de uma interessante variação e fixação de inversões cromossômicas associadas geograficamente (revisão em Schaeffer *et al.*, 2008; Rohde e Valente 2012), passando por estudos de cruzamentos interespecíficos e caracterização da presença de uma ou mais subespécies (revisão em Mardiros *et al.*, 2016), além de exaustivas análises da sua diversidade proteica ao nível de alozimas (revisão em Ayala, 1975). Graças ao sequenciamento completo de seu genoma codificante, que neste ano de 2017 completou 10 anos de sua publicação (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), *D. willistoni* se tornou uma espécie-modelo para estudos

moleculares. Os resultados do sequenciamento revelaram que, apesar das semelhanças gerais, ocorrem várias diferenças inesperadas entre as espécies estudadas, especialmente em aspectos relacionados à ecologia e ao comportamento, refletindo os ajustes nos ambientes muito diferentes em que as espécies evoluíram. Entre estas espécies, *D. willistoni* foi a única representante Neotropical, que provou ser excepcional em vários aspectos de seu genoma: como o grande tamanho, um uso preferencial de códons (*codon bias*), um conteúdo elevado de elementos transponíveis (15%), e uma aparente falta de selenoproteínas (Vicario *et al.*, 2007). Depois do advento do sequenciamento, vários estudos ao nível do DNA foram realizados, como a análise da ortologia de genes com outras espécies (Butkar *et al.*, 2008), estudos filogenéticos (revisão em Robe *et al.*, 2010; Powell *et al.*, 2011) e mapeamento *in situ* de genes em cromossomos politênicos (revisão em Pita *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2015).

Neste trabalho foi possível ampliar as informações sobre a diversidade genética de *D. willistoni*, após implementação de uma nova abordagem, com o marcador ISSR, que mostrou elevado polimorfismo na espécie, tanto ao nível intra quanto interpopulacional. Os resultados com ISSR confirmam a elevada variabilidade genética demonstrada por outros marcadores (cromossômicos e enzimáticos) já estudados na mesma espécie. No entanto, não houve indicação da presença de estruturação populacional nas amostras estudadas. O fluxo gênico foi o principal fator associado à baixa diferenciação genética entre as populações, já que tende a homogeneizar as frequências gênicas entre populações, em um curto intervalo de tempo evolutivo. Mesmo que apenas um migrante bem-sucedido se desloque para uma nova população, a cada geração, o fluxo gênico é capaz de

direcionar, de forma inevitável, as frequências gênicas da população em direção a um valor médio, atuando para manter a unidade da espécie (Mayr, 2001). O elevado fluxo gênico (migração) observado em *D. willistoni* pode ser, ainda, um dos fatores responsáveis pelo aumento da variabilidade genética nas populações, pois neste processo novas mutações são levadas de uma população para a outra (Wright, 1931).

A diversidade haplotípica e nucleotídica observada para os genes mitocondriais (*COI* e *COII*) foi considerada alta em *D. willistoni*, quando comparada com investigações feitas por outros autores, tanto na mesma espécie (Müller *et al.*, 2012; Mardiros *et al.*, 2016) quanto em outras espécies com ocorrência no Brasil (De Ré *et al.*, 2014; Gustani *et al.*, 2015). Da mesma forma, a variação genética encontrada para o gene nuclear *HCF* foi maior do que a encontrada por Powell *et al.* (2011) para outros genes do elemento cromossômico E+F de *D. willistoni*. O gene *HCF* parece ser um dos genes com maior variabilidade genética do elemento cromossômico F, informação confirmada pelo sequenciamento piloto feito neste estudo (genes *Ankiryin*, *Plexin B* e *Zinger Finger Homeodomain-2* - dados não mostrados), que observou elevada conservação das sequências nucleotídicas, e a presença de apenas um haplótipo de cada gene em variadas amostras geográficas de *D. willistoni*.

Em nosso estudo foi possível definir, pela primeira vez, medidas de diversidade genética (como  $F_{ST}$  e AMOVA) para um conjunto de variadas populações. Os resultados obtidos para dois genes mitocondriais e um nuclear apontaram para uma moderada diferenciação genética, se considerados os intervalos propostos por Hartl e Clark (1997). Embora as interpretações do

significado dos intervalos  $F_{ST}$  variem entre diferentes autores, esta medida é uma primeira indicação dos processos que moldaram a variação genética em uma população. De acordo com Frankham *et al.* (2002) o valor de  $F_{ST}$  depende tanto da quantidade de diferenciação genética entre populações, quanto da diversidade dentro delas, e pode variar dependendo do tipo de marcador utilizado. Um consenso entre os pesquisadores é de que um  $F_{ST}$  maior pode ser esperado para estudos com marcadores de baixa taxa evolutiva. Isso porque à medida que surgem novas variações em uma dada população, aumenta também a diversidade média dentro dela ( $H_s$ ), em relação a medida da diversidade das populações agrupadas ( $H_t$ ). Essa variação, entretanto, será em baixa frequência. Por outro lado, em investigações de marcadores genéticos com elevada taxa de variabilidade, ou muito polimórficos, um possível aumento do  $H_s$  em relação ao  $H_t$  é esperado, com tendências a reduzir o  $F_{ST}$ , homogeneizando as diferenças entre populações. Em nosso estudo, a análise dos genes mitocondriais apontou baixo  $F_{ST}$ , enquanto que a análise do gene nuclear indicou um valor moderado. Entretanto, as populações não se agruparam em diferentes *clusters* genéticos pela análise feita no STRUCTURE, o que nos faz supor que a diferença entre os níveis de variabilidade genética encontrada nesses genes (com diferentes taxas evolutivas) pode ter contribuído para os valores observados de  $F_{ST}$  em populações naturais de *D. willistoni*.

Os resultados também demonstram evidências de expansão populacional na espécie, para todos os genes investigados. Estes resultados de expansão estão de acordo com a ampla distribuição e migração da espécie na região neotropical. De acordo com Tajima (1990), populações com altas taxas de migração têm também variabilidade genética maior. O elevado fluxo gênico observado em *D. willistoni* pode

ser justificado por sua grande mobilidade e dispersão, através do voo. Carvalho e Kratz (1988) testaram a capacidade de dispersão em *Drosophila melanogaster* e os dados obtidos sugerem dispersão ativa e dependente do genótipo, sendo maior no tipo selvagem estudado, do que no mutante (cor de olhos *white*).

O estudo aqui realizado da presença da bactéria *W. pipientis* no hospedeiro *D. willistoni*, feito por meio do sequenciamento do gene *wsp* do endossimbionte, reafirmou a ubiquidade da infecção nas populações naturais do hospedeiro, e a provável presença de uma única variante (*wWil*) nas populações neotropicais. Um mapa geográfico elaborado neste estudo reuniu informações de todas as investigações feitas até o momento, em variadas populações de *D. willistoni* demonstrando a presença de *W. pipientis* em todas as amostras recentemente coletadas, o que reafirma a sugestão de Miller e Riegler (2006) da infecção recente no hospedeiro *D. willistoni*.

O levantamento da diversidade ecológica de espécies de drosofilídeos em locais de florestas úmidas aqui estudadas, demonstrou que os locais são ricos em diversidade de espécies (total de 32, sendo 26 nativas e 6 exóticas) e confirmam o *status* dominante de *D. willistoni* entre as espécies nativas encontradas.

Diante do cenário de estudos pós-genômicos feitos na última década, os resultados de nosso trabalho trazem um novo entendimento a respeito da variabilidade ao nível molecular da espécie *D. willistoni*, em amostras recentemente coletadas. De forma geral, os resultados desta Tese demonstram que *D. willistoni* é uma espécie muito bem representada na natureza, dominante em muitos locais investigados, com uma elevada variabilidade genética, elevado fluxo gênico e que,

possivelmente, passou por eventos de expansão populacional, que resultaram em pouca diferenciação entre suas populações recentes.

Estes processos evolutivos foram acompanhados por uma relação coevolutiva recente com uma única extirpe do endossimbionte *W. pipientis*. A continuidade desta abordagem prevê a ampla caracterização de haplótipos de genes mitocondriais em indivíduos infectados e não infectados por *W. pipientis*. Uma vez que a bactéria é co-herdada junto com a mitocôndria, a seleção natural atuará sobre as duas, de forma a aumentar ou diminuir a variabilidade genética molecular (“efeito carona”). Até o momento, não houve confirmação da associação de haplótipos mitocondriais e a infecção pelo endossimbionte em *D. willistoni*, conforme análises de Muller *et al.* (2012) em amostras do sul do Brasil.

Ainda que avanços tenham sido feitos por meio das abordagens de acesso direto ao genótipo da espécie (marcador ISSR) e análise de regiões específicas do genoma mitocondrial (*COI* e *COII*) e nuclear (*HCF* e outros), é clara a necessidade da continuidade desta linha de pesquisa, focada na análise da variabilidade molecular de populações naturais de *D. willistoni* e outras espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Esta linha de pesquisa se iniciou no mestrado da autora desta Tese, em 2012, e permitiu que o grupo de pesquisa do laboratório de genética do CAV-UFPE adentrasse no mundo da biologia molecular, coletando amostras recentes da espécie em variados biomas do Brasil, e implementando metodologias novas em um laboratório de pesquisa com apenas 10 anos, estabelecido no interior de Pernambuco. Passado este tempo, hoje são conhecidas as relações evolutivas entre espécies do subgrupo *willistoni* com base na caracterização de sequências dos genes *Ankyrin* e *PlexinB* (Nascimento, 2013; Monteiro, 2014; Silva, 2014), na

localização *in situ* de genes nucleares (Pita *et al.*, 2014; Silva, 2014), e na variabilidade molecular de populações neotropicais de *Drosophila nebulosa* (Oliveira, 2016), do grupo *willistoni*, com os mesmos genes. Comparações futuras entre as duas espécies, que têm preferências ecológicas bem distintas (*D. willistoni* prefere florestas úmidas e *D. nebulosa*, prefere florestas secas, como a Caatinga) poderão trazer grandes contribuições do efeito genético sobre o *fitness* das espécies, nos variados ambientes naturais.

Em suma, os resultados caracterizam *D. willistoni* como uma espécie bem estabelecida na natureza, com grande diversidade genética, que passou por um processo de expansão demográfica, associada à elevada migração de indivíduos entre populações. Estes dados poderão ser confirmados em futuros trabalhos que investiguem características associadas ao seu *fitness*, como os níveis de fertilidade, longevidade, imunidade e resposta a variados fatores ambientais (como temperatura e umidade) em diversos ambientes ao longo da sua distribuição.

## 9 Conclusões

- *Drosophila willistoni* apresenta elevada diversidade genética presente nas regiões genômicas ISSR, e há evidências de elevado fluxo gênico entre suas populações naturais, com baixa diferenciação genética e estruturação;
- *D. willistoni* também apresenta elevada diversidade genética em genes do DNA mitocondrial (*COI* e *COII*) e nuclear (*HCF*), além de baixa estruturação genética e evidências de que as populações passaram por um processo de expansão recente;
- A infecção de *D. willistoni* pela bactéria endossimbionte *W. pipientis* foi encontrada em todas as populações analisadas. O gene *wsp* de *W. pipientis* apresenta elevada conservação nucleotídica, e a variante *wWil* ocorre em toda distribuição geográfica de *D. willistoni*.
- A família Drosophilidae apresenta alta diversidade ecológica em ambientes de Floresta úmida do Norte e Nordeste do Brasil e *D. willistoni* está entre as espécies nativas mais frequentes nestas regiões. A alta frequência de *D. willistoni* em diferentes ambientes neotropicais, é consequência da sua adaptação e *fitness*, que por sua vez, é modelada a partir da diversidade genética existente em suas populações naturais.

## Referências

- Almerão MP (2009) Primeiro registro de *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales) em isópodos terrestres na América do Sul: prevalência, aspectos filogenéticos de suas linhagens e seu possível impacto sobre a estrutura populacional estimada através de um loco mitocondrial em duas espécies do gênero *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea).
- Andrade-Lima D (1966) Vegetação. In Atlas Nacional do Brasil. IBGE, ed. Conselho Nacional de Geografia, Rio de Janeiro.
- Antunes RSP, Gomes VN, Prioli SMAP, Prioli RA, Júlio Jr HF, Prioli LM, Agostinho CS e Prioli AJ (2010) Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genet Mol Res* 9 (2): 674-684.
- Ashburner M and Lemeunier F (1976) Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora) I. Inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 193(1111):137-57.
- Avise JC (2004) Molecular markers, natural history and evolution. 2nd ed. Sinauer: Sunderland, MA.
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, et al. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics* 18(1):489-522.
- Avondet J, Blair RB, Berg DJ e Ebbert MA (2003) *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. *Journal of Environmental Biology*, 32: 347-358.
- Ayala FJ (1975) Genetic differentiation during the speciation process. *Evolutionary Biology* 8: 1-78.
- Ayala FJ and Tracey ML (1973) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. VIII. Genetic differentiation and reproductive isolation between two subspecies. *J. Heredity* 64:120-124.

- Ayala FJ, Powel JR. and Dobzhansky T (1971) Polymorphisms in continental and island populations of *Drosophila willistoni*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2480-2483.
- Ayala FJ, Tracey ML, Barr LG, McDonald JF, Perez-Salas S. (1974) Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. Genetics 77: 34.2-384.
- Ayala FJ, Tracey MT, Hedgecock D and Richmond RC (1974) Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. Evolution 28(4): 576-592.
- Bächli G (2015) TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Acesso em 15 Ago 2015. Disponível em <<http://taxodros.unizh.ch/>>
- Ballard JWO (2004) Sequential evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*. Mol. Biol. Evol. 21:428-442.
- Barbosa NCCP, Freitas S e Morales AC (2014) Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. Revista Brasileira de Entomologia 58(2): 203–211.
- Benevides EA, Vallinoto MNS, Fetter Filho AFH, De Souza JRB, Silva-Oliveira G, Freitas MO, Ferreira BP, Hostim-Silva M., Bertoncini AA, Blanchard F, Torres RA (2014) When physical oceanography meets population genetics: The case study of the genetic/evolutionary discontinuity in the endangered goliath grouper (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) with comments on the conservation of the species. Biochemical Systematics and Ecology 56: 255-266.
- Berg EE, Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Canadian Journal of Forest Research, 27:415-424.
- Bhutkar A, Schaeffer SW, Russo SM, Xu M, Smith TF, Gelbart WM (2008) Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. Genetics 179: 1657-1680.
- Bijaya T e Ramachandra NB (2010) Genetic Variability Assessed by competitive Ability and ISSR markers in the members of the *nasuta-albomicans* complex of *Drosophila*. Nature and Science; 8(12): 29-42.
- Bizzo L, Gottschalk MS, De Toni DC., Hofmann PRP (2010) Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potential as bioindicator in open environments. Iheringia, Sér. Zool. 00(3):185-191.

- Bornet B, Branchard M (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Brown, AHD. (1978) Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, 52(4):145-57.
- Cano J, Rezusta A, Sole M, Gil J, Rubio M, et al. (2005) Inter-single- sequence repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *J Derm Sci* 39: 17–21.
- Capobianco JPR (2001) Dossiê Mata Atlântica 2001 - Projeto Monitoramento Participativo da Mata Atlântica. Rede de ONGs da Mata Atlântica, Instituto Socioambiental, Sociedade Nordestina de Ecologia. 407 p.
- Carson HL (1971) Especiação e princípio fundador. *Stadler Genet Symp* 3: 51-70.
- Carvalho SD and Kratz FL (1988) Dispersão ativa em *Drosophila melanogaster* (Diptera; Drosophilidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 5(1):31-44.
- Castro AAJF, Martins FR, Tamashiro JY, Shepherd GJ (1998) How rich is the flora of Brazilian cerrados? *Annals of Missouri Botanical Garden* 86: 192-224.
- Cockerham, C. C. (1969) Variance of Gene Frequencies. *Evolution*, Washington, v. 23(1):72-84.
- Cordeiro AR e Winge H (1995) Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levene L (ed) *Genetics of natural populations: the continuing importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 262-280.
- Coutinho-Silva RD, Montes MA, Oliveira GF, Carvalho-Neto FG, Rohde C and Garcia ACL, (2017) Effects of seasonality on drosophilids (Insecta, Diptera) in the northern part of the Atlantic Forest, Brazil. *Bull Entomol Res.* 2:1-11.
- D'Antonio C, Meyerson LA, Denslow J (2001). Exotic species and conservation: research needs. In M. E. Soule, & G. H. Orians (eds.), *Conservation biology: research priorities for the next decade* (pp. 59-80). Island Press: Washington, DC.
- Da Cunha AB, e Dobzhansky T (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to environment. *Evolution* 8: 119-134.
- Datwyler SL e Wolfe AD (2004) Phylogenetic Relationships and morphological evolution in *Penstemon* subg. *Dasanthera* (Veronicaceae). *Syst Bot* 29: 165–176.

- David JR, Gibert P, Legout H, Capy P e Moreteau B (2005) Isofemales lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94: 3-12.
- De Brito RA, Manfrin MH e Sene FM (2002) Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet Mol Bio.* 2: 161–171.
- De Leon JH e Jones WA (2005) Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassywinged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *J Insect Sci* 5: 1–9.
- De Ré CFC, Gustani EC, Oliveira APF, Machado LPB, Mateus RP, Loreto ELS e Robe LJ (2014) Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera, Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. *Biological Journal of the Linnean Society. Linnean Society of London*, 112(1): 55-66.
- De Toni DC, Gottschalk MS, Cordeiro J, Hofmann PPR e Valente VLS (2007) Study of the Drosophilidae (Diptera) communities on atlantic forest islands of Santa Catarina state, Brazil. *Neotropical Entomology* 36(3):356-375.
- Deprá M, Poppe JL, Schmitz HJ, De Toni DC, Valente VL. (2014) The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *J Pest Sci.*; 87(3): 379-383.
- Dobzhansky T e Sturtevant AH (1938) Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 23: 28-64.
- Ehrman L e Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr JN (eds). London/New York, Academic Press v. 2 p. 193-225.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72:250-259.
- Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, Windus JL, Wolfe AD (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8(1):443-451.
- Excoffier L, Smouse PE (1992) Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2):479-491.

- Eyre-Walker A, Keightley PD (2007) The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature Reviews Genetics* 8(8):610.
- Falconer DS, Mackay, TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*. 4.ed. Edinburgh : Longman Group Limited, 464p.
- Fernandez ME, Figueiras AM, Benito C (2002) The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor Appl Genet* 104: 845-851.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- Ferreira, LB, Tidon R (2005) Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodiversity and Conservation* 14(8):1809-1821.
- Ferreira-Neto CA , Cruz GAS, Amorim IC, Balbino VQ, Moura RC (2017) Effects of fragmentation and anthropic pressure on the genetic structure of *Canthon (Peltecanthon) staigi* (Coleoptera: Scarabaeidae) populations in the Atlantic Forest domain. *J Insect Conserv* 21(2):267-276.
- Fisher R A (1930) *The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition*. Oxford University Press.
- Flybase (2016) Base de dados pública, acessível em <<http://www.flybase.org>> Acesso em 03 maio 2016.
- Frydman H (2007) *Wolbachia* bacterial infection in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (2).
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2):915-925.
- Futuyma, DJ. (1992) *Biologia evolutiva*. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 631 p
- Galindo-Leal C e Gusmão-Câmara I (2005) Atlantic forest hotspots status: an overview. In: *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Carlos Galindo-Leal, Ibsen de Gusmão Câmara (eds). Fundação SOS Mata Atlântica: Conservação Internacional, Belo Horizonte, pp.3-11.

- Garcia ACL, Gottschalk MS, Audino GF, Rohde C, Valiati VH, Valente VL (2005) First evidence of *Drosophila malerkotliana* in the extreme south of Brazil (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). *Drosoph. Inf. Serv*; 88: 28-30.
- Garcia ACL, Rohde C, Audino GF, Valente VLS e Valiati VH (2006) Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretical mobility of acid phosphatase-1. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 44: 212-216.
- Garcia ACL, Silva DMIO, Monteiro AGF, Oliveira GF, Montes MA and Rohde C (2014) Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. *Ann Entomol Soc Am* 107(5):975-982.
- Garcia ACL, Valiati VH, Gottschalk MS, Rohde C e Valente VLS (2008) Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia Serie Zoologia* 93: 329-338.
- Garcia CF, HochMüller CJC, Valente VLS e Schmitz HJ (2012) Drosophilid assemblages at different urbanization levels in the city of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Neotrop Entomol* 41: 1-12.
- Gleason JM, Griffith EC, Powell JR (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concept? *Evolution* 52:1093-1103.
- Goñi B, Martinez ME e Daguer P (1997) Studies on two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. *Revista Brasileira de Entomologia* 41(1):89-93.
- Gonzalez E e Zardoya R (2007) Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evol. Biol.* 7(197): 1-12.
- Goto SG e Kimura MT (2001) Phylogenetic utility of mitochondrial *COI* and nuclear *Gpdh* genes in *Drosophila*. *Mol Phylogenet Evol* 18: 404-422.
- Gottschalk MS, De Toni DC, Hofmann PRP e Valente VLS (2007) Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanization gradient. *Neotrop Entomol*, 36: 848-862.
- Gottschalk MS, Hofmann PRP e Valente VLS (2008) Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* 4: 485-518.

- Goulão L, Oliveira CM (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (*SSR* and *ISSR*) markers. *Euphytica* 122: 81-89.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J e Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006.
- Gustani EC, Oliveira APF, Santos MH, Machado LP e Mateus RP (2015) Demographic Structure and Evolutionary History of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from Atlantic Forest of Southern Brazil. *Zoological science*, 32(2), 141-150.
- Hamm CA, Begun DJ, Vo A, Smith CC, Saelao P, Shaver AO, Turelli M (2014) *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. *Molecular ecology*, 23(19):4871-4885.
- Hamrick JL (1982) Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69(10):1685-1693.
- Hartl D, Clark, A (2010) *Princípios de Genética de Populações*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 660 p.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A e Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281:215-220.
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F<sub>ST</sub>*. *Fundamental Concepts in Genetics*, 10:639-650.
- Hundsdoerfer AK, Kitching I e Wink M (2005) The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): Molecular evidence from sequence data and *ISSR-PCR* fingerprints. *Org Divers Evol* 5: 173–198.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (1987) *Geografia do Brasil: Região Centro-Oeste*. Rio de Janeiro: IBGE, 1987.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2004). *Mapa de biomas do Brasil*. Brasília: MMA; IBAMA, 2004. Escala 1: 5.000.000 <available in: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Accessed in may 2017.

- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2010) Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pa>. (acesso em: 08 December 2015).
- Jeyaprakash A e Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of 63 arthropodes species. *Insect Mol Biol.* 9 (4): 393-403.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL e Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*, 411(6835): 302.
- Judd BH, Shen MW e Kaufman TC (1972) The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 71: 139-156.
- Kageyama, PY (1987) Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. *Silvicultura, São Paulo* 11(41):7-37.
- Kantety RV, Zeng X, Bennetzen JL e Zher BE (1995) Assesment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using intersimple sequences repeated (ISSR) amplification. *Mol Breed* 1: 365–373.
- Kar PK, Vijayan K, Mohandas TP, Nair CV, Saratchandra B, et al (2005) Genetic variability and genetic structure of wild and semi-domestic populations of tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) ecorace Daba as revealed through ISSR markers. *Genetica* 125: 173–183.
- Keightley PD and Eyre-Walker A (2010) What can we learn about the distribution of fitness effects of new mutations from DNA sequence data? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1544):1187-1193.
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K, Ogihara Y (1998) Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that RFLP markers. *Theor Appl Genet* 96: 37–45.
- Kozlowski TT (2002) Physiological ecology of natural regeneration of harvested and disturbed forest stands: implications for forest management. *Forest Ecology and Management* 158:195-221.
- Krijger CL (2000) Spatio-temporal heterogeneity and local insect diversity - a case study on neotropical *Drosophila* communities. Leiden: Universiteit Leiden.
- Krimbas CB e Powell JR (1992) *Drosophila* inversion Polymorphism. CRC Press Florida, p.127-220.

- Kuhn GC, Franco FSF e Silva Jr WA, Martinez-Rossi NM e Sene FM (2003) On the pBuM189 satellite DNA variability among South American populations of *Drosophila buzzatii*. *Hereditas* 139: 161–166.
- Lakhotia, SC EM (1974) EM autoradiographic studies on polytene nuclei of *Drosophila melanogaster*. 3. Localisation of non-replicating chromatin in the chromocentre heterochromatin *Chromosoma* 46(12): 145-159.
- Lakovaara S e Saura A (1972) Location of enzyme *loci* in chromosomes of *Drosophila willistoni*. *Experientia* 28(3): 355-356.
- Leme EMC (1998) *Canistropsis - Bromélias da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro: Salamandra. 143 p.
- Lemeunier F e Ashburner M 1976. Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora). II. Phylogenetic relationships between six species based upon polytene chromosome banding sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 193(1112): 275-294.
- Lercher MJ, Blumenthal T e Hurst LD (2003) Coexpression of neighboring genes in *Caenorhabditis elegans* is mostly due to operons and duplicate genes. *Genome Res* 13: 238–243.
- Leung W, Shaffer CD, Cordonnier T et al. (2010) Evolution of a distinct genomic domain in *Drosophila*: comparative analysis of the dot chromosome in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. *Genetics* 185:1519-1534.
- Leung W, Shaffer CD, Reed LK, Smith ST, Barshop W, Dirkes W, et al (2015) *Drosophila* Muller F Elements maintain a distinct Set of Genomic Properties Over 40 Million Years of Evolution. *G3: Genes Gen Genet*, 5(5):719–740.
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, New York, v. 6, p. 381-398.
- Lu Z, Wang Y, Peng Y, Korpelainen H e Li C (2006) Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern china revealed by ISSR markers. *PI Sci* 170: 407–412.
- Lucchese MEP, Flores FEV, e Valente VLS (2002) *Drosophila* as bioindicator of air pollution: Preliminary evaluation of the wild species *D. willistoni*. *Revista Brasileira de Biociências* 1(1): 19-28.

- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM e Hewitt GM (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5: 153-165.
- Machado LPB, Silva DC, Simão DP, Mateus RP (2012) Spatial variation of genetic diversity in *Drosophila* species from two different South America environments. In Caliskan, M. *Genetic Variation in Animals*. Rijeka: Intech. p. 45-62.
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, et al. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecol Applic* 10(3):689-710.
- Malogolowkin C (1952) Sobre a genitália dos “Drosophilidae” (Diptera). III. Grupo *willistoni* do gênero “*Drosophila*”. *Rev Brasil Biol* 12: 79-96.
- Manrique-Poyato, MI, Lopez-Leo, MD, Gomez, R, Perfectti, F, Camacho, JPM (2013) Population genetic structure of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. *Plos One* 8(3): e59041.
- Mardiros XB, Park R, Clifton B, Grewal G, KhizarAK, Markow TA, Ranz JM and Civetta A (2016) Postmating reproductive isolation between strains of *Drosophila willistoni*. *Fly* 10(4):162-171.
- Martinelli, Gustavo et al. (2013) Avaliações de risco de extinção de espécies da flora brasileira. In: Martinelli, G.; Moraes, M.A. (orgs.), *Livro vermelho da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pp. 60-103.
- Martins M (1987) Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 3: 195-218.
- Martins, M. (2001) *Drosophilid* fruit-fly guilds in forest fragments. In: Bierregaard, R. O. JR.; Gascon, C.; Lovejoy, T. E. e Mesquita, R. ed. *Lessons from Amazonia: The ecology and conservation of a fragmented forest*. Yale, Yale University. p.175-186.
- Mata RA, McGeoch M, Tidon R (2010) *Drosophilids* (Insecta, Diptera) as tools for conservation biology. *Natureza e Conservação* 8:60–65.
- Mata RA, Tidon R e Mcgeoch M (2008) *Drosophilid* assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. *Biodiversity Conservation* 17: 1-18.

- Mateus RP, Buschini, MLT, Sene, FM (2006) The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay river basin. *Braz J Biol* 66(2B):719-729.
- Mateus RP, Sene FM (2003) Temporal and Spatial Allozyme Variation in the South American Cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). *Biochemical Genetics*. 41: 219-233.
- Matioli SR (2001) *Biologia Molecular e Evolução*. Ed. Holos, 202 p.
- Mayr E (2001) *O que é a evolução*. Rio de Janeiro: Editora Rocco.
- Medeiros HF, Klaczko LB (2004) How many species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) remain to be described in the forests of Sao Paulo, Brazil. *Species lists of three forest remnants*. *Biota Neotrop*. 4(1): 1-12.
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: *FST* and related measures. *Mol. Ecol. Resources* 11: 5–18.
- Melo ZGS (2012) *Caracterização citogenética de genes do elemento cromossômico F em espécies do grupo willistoni de Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Pernambuco (UPE).
- Mendki MJ, Sharma AK, Veer V, Agrawal OP, Prakash S, Parashar BD (2011) Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(5): 357-362.
- Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Júnior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE (1998) *Flora vascular do Cerrado*. In: Sano, S. M. & Almeida, S. P. (eds). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa-CPAC. Pp. 289-556.
- Miller WJ and Riegler M (2006) Evolutionary dynamics of *wAu*-Like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Appl Environ Microbiol* 72: 826-835.
- Miller WJ, Ehrman L, Schneider D (2010) Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS Pathogens*, 6(12): e1001214.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2017). Acesso em: 19.07.2017. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA) Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acesso em: 18/10/2003.

- Ministério do Meio Ambiente (MMA). Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/amazonia>. Acesso em: 20/07/2017.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos> acesso em 10/07/2017.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas>. Acesso em: 15/02/2004.
- Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B.; Rylands, A. B., Brandon, K. (2005) A brief history of biodiversity conservation in Brazil. *Conservation Biology* 19(3): 601-611.
- Monteiro AGF (2014) Filogenia de espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) baseada em genes do Elemento F de Müller. Dissertação de Mestrado (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
- Monteiro LS, Garcia ACL, Oliveira GF, Rohde C. (2016) High diversity of Drosophilidae in High-Altitude wet forests in Northeastern Brazil. *Neotrop Entomol* 45(3):265-273.
- Moore PD (1998) Did the forests survive the cold in a hotspot? *Nature* 391:124-127.
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. (2008) Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu Rev Genet.*; 42:165–190.
- Mulder H (2017) Transcribing  $\beta$ -cell mitochondria in health and disease. *Molecular Metabolism* 6 (9): 1040-1051.
- Müller MJ, Mühlen C, Valiati VH, Valente VLS (2012) *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. *J Invertebr Pathol* 109(1):152-155.
- Müller MJ, Dörr NCD, Deprá M, Schmitz H, Valiati VH, Valente VLS (2013) Reevaluating the infection status by the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila* Neotropical species from the *willistoni* subgroup. *Infection, Genetics and Evolution* 19: 232-239.
- Müller MJ, Von Mühlen C, Valiati VH, Valente VLS (2012) *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. *J. Invert. Pathol* 109: 152–155.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

- Nagaoka T e Ogihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5): 597-602.
- Nagaraja, Nagaraju J e Ranganath HA (2004) Molecular phylogeny of the *nasuta* subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and Col mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms. *Genes Genet Systems* 79(5): 293-299.
- Nascimento GAF (2013) Caracterização molecular dos genes Ankyrin e PlexinB e presença do endossimbionte *Wolbachia* em populações naturais de *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco, 69p.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nei M (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, n. 12, p. 3321–3323.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press, 512 p.
- Nunes MDS, Neumeier H e Schlötterer C (2008) Contrasting patterns of natural variation in global *Drosophila melanogaster* populations. *Molecular Ecology* 17: 4470-4479.
- O’Neill SL e Karr TL (1990) Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348:178-180.
- Oliveira GF, Rohde C, Garcia ACL, Montes MA, Valente VLS (2016) Contributions of dryland forest (Caatinga) to species composition, richness and diversity of Drosophilidae. *Neotropical Entomology* 45, 537–547.
- Otte D and JA Endler (1989). *Speciation and its consequences*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Paglia, AP, Fonseca, GAB, Silva, JMC (2008) A fauna brasileira ameaçada de extinção: síntese taxonômica e geográfica. In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M.; Paglia, A.P. (eds.), *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, pp. 63-70.
- Painter TS (1931) A cytological map of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Science* 73: 647-648.

- Palma J, Maebe K, Guedes JVC, Smagghe G (2015) Molecular variability and genetic structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an important soybean defoliator in Brazil. *Plos One* 10(3): e0121260.
- Papaceit M, Juan E (1998) Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. *Chromosome Research* 6:49-54.
- Parecer S, Ahmadjian V (2000) Symbiosis. Na introduction to Biological associations. Oxford: Oxford University Press.
- Parsons PA (1991) Biodiversity conservation under global climatic change: the insect *Drosophila* as a biological indicator? *Global Ecology and Biogeography Letters* 1:77-83.
- Pavan C (1959) Relações entre populações naturais de *Drosophila* e o meio ambiente. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Biologia Geral* 11(221): 1-81.
- Pearson DL (1994) Selecting indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 345: 75-79.
- Pétavy G, David JR, Debat V, Gibert P, Moreteau B (2004) Specific effects of cycling stressful temperatures upon phenotypic and genetic variability of size traits in *Drosophila melanogaster*. *Evolutionary Ecology Research* 6: 873-890.
- Phillips CB, Cane RP, Mee J, Chapman HM, Hoelmer KA, et al (2002) Intraspecific variation in the ability of *Microctonus aethiopooides* (Hymenoptera: Braconidae) to parasitise *Sitona lepidus* (Coleoptera: Curculionidae). *N Z J Agric Res* 45: 295-303.
- Pita S, Panzera Y, Valente VLS, Silva ZG, Garcia CF, Garcia ACL, Montes MA e Rohde C (2014) Cytogenetic mapping of Müller F element genes in the *willistoni* species group. *Genetica* 142: 397-403.
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM, Reid JB (2005) Genomic Research in *Eucalyptus*. *Genetica*, 125: 1, p79.
- Poppe JL, Schmitz HJ, Callegari-Jacques SM, Valente VLS (2015) Environmental determinants on the assemblage structure of drosophilid flies in a temperate-subtropical region. *Neotropical Entomology* 44:140-152.

- Poppe JL, Schmitz HJ, Grimaldi D, Valente VLS (2014) High diversity of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the Pampas Biome of South America, with descriptions of new *Rhinoleucophenga* species. *Zootaxa*, 3779:215–245.
- Poppe JL, Valente VLS and Schmitz HJ (2012) Structure of Drosophilidae assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa biome (São Luiz Gonzaga, RS). *Pap Avulsos Zool* 52:185-195.
- Powell JR (1997) *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila model*. Oxford University Press, New York, 493 p.
- Powell JR, Dion K, Papaceit M, et al. (2011) Nonrecombining genes in a recombination environment: The *Drosophila* “dot” chromosome. *Molecular Biology Evolution* 28: 825-833.
- Pradeep AR, Chatterjee SN, Nair CV (2005) Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. *J Appl Genetics* 46: 291-298.
- Ramos-Onsins SE and Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2092–2100.
- Ranz JM, Casals F e Ruiz A (2001) How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. *Genome Res* 11: 230-239.
- Ratnaparkhe MB, Tekeoglu M, Muehlbauer FJ (1998) Inter-simple-sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 97: 515–519.
- Richards SY, Liu BR, Bettencourt P, Hradecky S, Letovsky et al., (2005) Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene and cis-element evolution. *Genome Res* 15: 1-18.
- Riddle NC, Shaffer CD, Elgin SC (2009) A lot about a little dot—lessons learned from *Drosophila melanogaster* chromosome 4. *Biochem Cell Biol* 87: 229–241.
- Riegler M e O’Neill, SL (2006) The genus *Wolbachia*. In *The prokaryotes* (pp. 547-561 Springer New York.
- Ritchie MG and Gleason JM (1995) Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *J Evol Biol* 8:463-479.

- Robe LJ, Cordeiro J, Loreto ELS, Valente VLS (2010) Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 138: 601-617.
- Rohde C e Valente VLS (2012) Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifty different rearrangements. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 966-979.
- Rohde C, de Oliveira Silva DM, de Araújo Jucá JC, Montes MA, Garcia AC. (2010a) Espécies Invasoras da Família Drosophilidae (Diptera, Insecta) em ambientes da caatinga de Pernambuco. *An. Acad. Pernamb. Ciênc. Agron.* 7: 227-240.
- Rohde C, Degrandi, TH, De Toni, DC. e Valente, VLS. (2005). *Drosophila willistoni* polytene chromosomes. I. Pericentric inversion on X chromosome. *Caryologia* 58(3): 249-254.
- Rohde C, Garcia ACL, Valiati VH e Valente VLS (2006) Chromosomal evolution of sibling species of *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Müller's element B). *Genetica* 126: 77-88.
- Rohde C, Monteiro AGF, Cabral WBM, Silva DMIO, Oliveira, GF, Montes, MA.; Garcia, ACL (2010) The importance of identification of the *willistoni* subgroup of *Drosophila* at the species level: the first evidence of *D. equinoxialis* in the Northeast region of Brazil. *Drosophila Information Service* 93: 118-122.
- Rohde C, Silva DMIO, Oliveira GF, Liv SM, Montes MA e Garcia ACL (2014) Richness and abundance of the cardini group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Caatinga and Atlantic Forest biomes in northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2014) 86(4): 1711-1718
- Roque F, Leão BFD and Tidon R (2017) Spatio-temporal distribution of the cryptic flies of the *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae) subgroup in a Neotropical forest. *Annals of the Entomological Society of America* (DOI: 10.1093/aesa/sax039).
- Roque, F, Mata RA, Tidon R (2013) Temporal and vertical drosophilid (Insecta; Diptera) assemblage fluctuations in a neotropical gallery forest. *Biodivers. Conserv.* 22, 657-672.
- Ross CL and Markow TA (2006) Microsatellite variation among diverging populations of *Drosophila mojavensis*. *J Evol Biol* 19(5): 1691-1700.
- Rousset F, Vautrin D e Solignac M (1992) Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc R Soc Lond B* 247:163-168.

- Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D, Legal L (2007) ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Mol Phylogenet Evol* 43: 240–250.
- Roy PJ, Stuart JM, Lund J and Kim SK (2002) Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 418:975-979.
- Rylands AB, Brandon K (2005) Unidades de conservação brasileiras. *Megadiversidade.v.1*, n.1, p.28-35.
- Sampaio AB e Schmidt IB (2013) Espécies Exóticas Invasoras em Unidades de Conservação Federais do Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3(2):32-49.
- Santa-Brígida R, Schmitz HJ and Martins MB (2017) Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the state of Pará (Brazil). *Biota Neotropica* 17(1): e20160179.
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Quart Rev Biophys* 23: 331–366.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hastings A, Holt RD, Mayfield MM, O'Connor MI, Rice WR (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology e Evolution* 22:465-471.
- Schlötterer C, Hauser MT, von Haeseler A, Tautz D (1994) Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 11(3): 513-522.
- Schaeffer SW, Bhutkar AU, McAllister BF, Matsuda M, Matzkin LM, O'Grady PM, Rohde C, Valente VLS, Aguadé M, Anderson WW, Edwards K, Garcia ACL, Goodman J, Hartigan J, Kataoka E, Lapoint RT, Lozovsky ER, Machado CA, Noor MAF, Papaceit M, Reed LK, Richards S, Rieger TT, Russo SM, Sato H, Segarra C, Smith DR, Smith TF, Strelets V, Tobari YN, Tomimura Y, Wasserman M, Watts T, Wilson R, Yoshida K, Markow TA, Gelbart WM, Kaufman TC (2008) Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics* 179(3): 1601-1655.
- Sene FM, Val FC, Maqr CR e Pereira V (1980) Dados preliminares sobre a distribuição geográfica da *Drosophila* espécies dentro de domínios morfoclimáticos do Brasil. *Papéis Avulsos de Ecologia* 33(22): 315-326.
- Shen J, Ding X, Liu D, Ding G, He J, Li X, Tang F, Chu B (2006) Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 29, n.3, p. 420–422.

- Silva JG, Garcia AC, Rohde CC. (2014) Efeitos da urbanização na assembleia de drosofilídeos (Diptera, Insecta) no domínio da floresta atlântica na região nordeste do Brasil. [dissertação]. Vitória de Santo Antão: Universidade Federal de Pernambuco.
- Silva NM, Fantinel CC, Valente VL e Valiati VH (2005a). Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Porto Alegre, southern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, 95(3):233-240.
- Silva NM, Fantinel CD, Valente VLS e Valiati VH (2005b) Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. *Neotropical Entomology* 34(3):363-374.
- Silva P (2014) Variabilidade genética de *Drosophila equinoxialis* (Insecta, Diptera) baseada em genes do Elemento F de Müller. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Federal Pernambuco (UFPE).
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial genes sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Singh YT, Mazumdar-Leighton S, Saikia M, Pant P, Kashung S, Neog K, ... e Babu CR (2012) Genetic variation within native populations of endemic silkmoth *Antheraea assamensis* (Helfer) from Northeast India indicates need for in situ conservation. *Plos one*, 7(11), e49972.
- Sinkins SP (2004) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 723-729.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 16, p. 393-430.
- Slatkin M (1987) Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science*, Washington D. C., v. 236.
- Slawson EE, Shaffer CD, Malone CD, Leung W, Kellmann E (2006) Comparison of dot chromosome sequences from *D. melanogaster* and *D. virilis* reveals an enrichment of DNA transposon sequences in heterochromatic domains. *Genome Biology*. 7:R15.
- Soliani C, Rondan J, Chiappero DSMB, Martinez M, Da Rosa, EG, e Gardenal CN (2010) Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* from Uruguay

and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data. *Medical and Veterinary Entomology* 24: 316–323.

SOS Mata Atlântica - Fundação SOS Mata Atlântica-Florestas –. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>, acesso em: 20/06/2017.

SOS Mata Atlântica-Fundação SOS Mata Atlântica; INPE- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica – Período 2013-2014. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2015, p. 60.

Souza GA, Carvalho MRO, Martins ER, Guedes RNC e Oliveira LO (2008) Genetic diversity estimated through ISSR markers in populations of *Zabrotes subfasciatus*. *Pesq Agropec Bras* 43(7): 843-849.

Spassky B (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Univ Texas Publ* 5721: 48- 61.

Spassky B, Richmond RC, Pérez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T e Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and the semi-species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25: 129-143.

Spellman PT e GM Rubin (2002) Evidência para domínios grandes de genes expressos de forma semelhante no genoma de *Drosophila*. *J Biol* 1(5): 5.1-5.8.

Stouthamer R, Luck RF e Hamilton WD (1990) Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2424-2427.

Sturtevant AH (1916) Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. *Ann. ent. Soc. Am.* 9: 323-343

Sturtevant AH, Dobzhansky T (1936) Inversions in the Third Chromosome of Wild Races of *Drosophila Pseudoobscura*, and Their Use in the Study of the History of the Species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22(7):448–450.

Tabarelli, M et al. (2010) Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: lessons from aging human-modified landscapes. *Biological Conservation*, vol.143, pp. 2328-2340.

Tajima F (1990) Relationship between migration and DNA polymorphism in a local population. *Genetics* 126(1):231-234.

- Telschow A, Flor M, Kobayashi Y, Hammerstein P e Werren JH (2007) *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. PLoS ONE, 8:e701.
- Telschow A, Hammerstein P e Werren JH (2005) The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. Evolution 59:1607-1619.
- Templeton AR (2006) Population Genetics and Microevolutionary Theory. A John Wiley e Sons., Inc., Publication: USA, 716 p.
- Templeton AR (2011) Genética de Populações e Teoria Microevolutiva. Riberão PretoSP: Sociedade Brasileira de Genética, 705 p.
- Thongatabam B e Ramachandra B (2012) Genomic introgression in laboratory evolved hybrid races, Cytorace 1 and Fissioncytorace-1 of *nasuta-albomicans* complex (NAC) of *Drosophila* (Insecta, Diptera) as revealed by RAPD and ISSR markers. Italian Journal of Zoology, 9(4): 520-529.
- Tidon R (2006) Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. Biological Journal of the Linnean Society 87(2):233-247.
- Tidon R, Leite DF e Leão BFD (2003) Impact of the colonisation of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical region: 2 years after the invasion. Biological Conservation 112(3):299-305.
- Toggler MGF, Contel EPB, Torggler SP (1995) Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: SBG, 186 p.
- Torres FR e Madi-Ravazzi L (2006) Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp. (Diptera) in two woodlands in the state of São Paulo, Brazil. Iheringia, Série Zoologia, 96(4):437-444.
- Turner IM (2004) The ecology of trees in the tropical rain forest. Cambridge University Press, 314p.
- Turner IM e Corlett T (1996) The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. Trends in Ecology and Evolution 11(8):330-333.
- Val FC, Vilela CR e Marques MD (1981) Drosophilidae of the Neotropical region. In: M. Ashburner; H. L. Carson & J. N. Thompson, J. N. (eds), The Genetics and Biology of *Drosophila*. 3o Vol., Academic Press, London.

- Vaulin OV e Zakharov IK (2008) Temporal dynamics and variation of multilocus ISSR-PCR DNA markers in the Uman' population of *Drosophila melanogaster* over two decades (1984–2004). Russian Journal of Genetics, 44(3): 306-311.
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, et al (2006) Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. J Insect Sci 6: 1–11.
- Vicario S, Moriyama EN and Powell JR (2007) Codon usage in twelve species of *Drosophila*. BMC Evol Biol 7:e226.
- Weir BS (1996) Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 455 p.
- Wong TW e Clayton DA (1985) Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. J. Biol. Chem. 260: 11530-11535.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. Annals of Eugenics, New York, v. 15, p. 395-420.
- Yang J, Tian L, Xu B, Xie W, Wang S, Zhang Y, Wang X e Wu Q (2015) Insight into the migration routes of *Plutella xylostella* in China using mtCOI and ISSR markers. Plos One, 10(6): 1-15.
- Yeoh Y, Kang SS, Chung MG (1996) Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. Botanical Bulletin of Academia Sinica, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146.
- Yiang H e Wong TW (1991) *In vitro* replication of heavy strand DNA in permeabilized human mitochondria. Nucleic Acids Res. 19: 905-911.
- Zhang XP, Li XH, Qui YX (2006) Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. Biochem Syst Ecol 34: 38-47.
- Zietkiewicz E, Rafalski A e Labuda D (1994) Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics 20(2): 176-183.
- Ziller SR (2001) Plantas exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica. Ciênc. Hoje, 1-3.

## Anexos

### Anexo 1

#### Bulletin of Entomological Research

#### Comprovante de submissão

Submissions Being Processed for Author Claudia Rohde

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		High genetic diversity and low differentiation in <i>Drosophila willistoni</i> Brazilian populations, inferred by ISSR markers	14 Aug 2017	14 Aug 2017	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

#### Aims and scope

The aims of the Bulletin of Entomological Research are to further our global knowledge of entomology through the generalisation of research findings rather than providing more entomological exceptions. The Bulletin publishes high quality and original research papers, 'critiques' and review articles concerning insects or other arthropods of economic importance in agriculture, forestry, stored products, biological control, medicine, animal health and natural resource management. The scope of papers addresses the biology, ecology, behaviour, physiology and systematics of individuals and populations. This includes the interactions between species (plants, hosts for parasites, natural enemies and whole communities), novel methodological developments, including molecular biology, in an applied context. The Bulletin does not publish the results of pesticide testing or traditional taxonomic revisions.

#### Styles of Paper

Bulletin of Entomological Research publishes two types of paper:

- Full research papers

A full account of a complete project, including details of experimental findings.

- Reviews

Literature overviews of recent research in a larger subtopic or comparative reviews of related work in different species. Reviews will normally be specially commissioned but we would welcome any suggestions from authors for reviews they wish to write. Reviews can be comparative across species or be confined to a single species.

### Manuscript Preparation

Manuscripts should be in English. We suggest that authors whose first language is not English have their manuscripts checked by a native English speaker before submission. This is optional, but will help to ensure that any submissions that reach peer review can be judged exclusively on academic merit. We offer a Cambridge service which you can find out more about [here](#), and suggest that authors contact as appropriate. Please note that use of language editing services is voluntary, and at the author's own expense. Use of these services does not guarantee that the manuscript will be accepted for publication, nor does it restrict the author to submitting to a Cambridge-published journal.

### Manuscript content

Manuscripts should be prepared according to the following structure:

- The text, divided under appropriate headings. Clearly differentiate between primary (bold, large font size), secondary (bold, text font size) and tertiary (italics) headings
- **Acknowledgements (if any)**
- References (for further information about presenting references please see below)
- Tables, either at the end of the manuscript or as separate files. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and every table should be mentioned at least once in the text.
- Illustrations should be submitted as separate files in TIF or EPS format but captions to illustrations should be supplied on a separate sheet at the end of the main manuscript. Full research papers should not exceed 8,000 words, while Reviews may be up to 10,000 words in length.

### Abstract

Each paper must commence with an accurate, informative abstract in one paragraph that is complete in itself and intelligible without reference to text or figures. It should not exceed 250 words. A short title should also be provided for use as a running head, and authors should specify keywords for the article.

### References

References must be based on the name and year system, give full journal titles and conform to the following styles:

**Follett, P.A. & Roderick, G.K.** (1996) Genetic estimates of dispersal ability in the leucaena psyllid predator *Curinus coeruleus* (Coleoptera: Coccinellidae): implications for biological control. *Bulletin of Entomological Research* **86**, 355-361.

**Nevill, E.M., Kappmeier, K. & Venter, G.J.** (1993) Tsetse fly research in Zululand. p. 81 in *Proceedings of the ninth Entomological Congress organized by the Entomological Society of Southern Africa, Johannesburg, 28 June-1 July 1993 Pretoria, Entomological Society of South Africa.*

**Wilson, M.D. & Post, R.J.** (1994) Integration of morphometric, cytogenetic and molecular techniques: a case study of *Simulium damnosum* pp. 215-224 in Hawksworth, D.L. (Ed.) *The identification and characterization of pest organisms.* Wallingford, CAB International.

Please list papers by more than two authors, but with the same first author, by year sequence and alphabetically within each year. Citation of authors in the text should appear in the form: Polaszek (1996) or (Polaszek, 1996). Authors should be cited in chronological order as: (Blackman et al., 1994; Roberts & Kumar, 1995).

### Tables

Tables should be in a simple form. They should not be used if text or illustrations give the same information. They can either be submitted as separate files (Microsoft Word or Excel) or embedded within the main manuscript text file. Each table must be accompanied by a clear and concise caption.

### Illustrations

Illustrations should be submitted in TIF or EPS format at approximate final publication size. Resolution of artwork should be at the following minimum resolutions: Line artwork (black &

White), 1200dpi; Combination, i.e. line/tone (greyscale), 800dpi; Black & White halftone (greyscale), 300dpi; and colour halftone, 300dpi. Comprehensive guidance on creating suitable electronic figures is available [here](#).

### **Supplementary Material**

There will normally be one of the following reasons for you to be supplying supplementary material to accompany the online version of your article:

1. You wish to link to additional information which due to its nature does not lend itself to print media (examples- full data sets, movie or sounds files etc...)
2. The Editor of the Journal has requested that you extract certain information from the original article in order to allow for space constraints of the print version.
3. You have requested additional material to be available to accompany an article that does not normally allow such material to be included (example – tables to accompany a correspondence article).

### **Submission**

Please follow the following instructions to supply supplementary material to accompany the online version of your article:

1. Each supplementary file must be supplied as a separate file. Do not supply this material as part of the file destined for publication in the print journal.
2. Each supplementary file must have a clear title (e.g. Supplementary Figure 1).
3. Provide a text summary for each file of no more than 50 words. The summary should describe the contents of the file. Descriptions of individual figures or tables should be provided if these items are submitted as separate files. If a group of figures is submitted together in one file, the description should indicate how many figures are contained within the file and provide a general description of what the figures collectively show.
4. The file type and file size in parentheses.

### **Manuscript Preparation**

We kindly ask that you follow the instructions below for the final manuscript. This will minimize the risk of errors being introduced during the publishing process.

- Use double line spacing and ample margins (at least 2.5 cm) on each side
- Do not underline anything
- Number each line consecutively across the pages of the manuscript, rather than within pages
- Do not indent the start of each paragraph
- Number every page (preferably the top right corner)
- Use italics for taxonomic nomenclature and bold for headings
- Use standard abbreviations (e.g. Fig. and Figs) and SI units
- Use British rather than American spellings, and 'z' rather than 's' spellings in words with 'ize'

### **Manuscript submission**

All manuscripts should be submitted via our on-line system, Editorial Manager, at [www.editorialmanager.com/ber](http://www.editorialmanager.com/ber) New users will need to register first.

## Anexo 2

### G3: Genes, Genomes, Genetics

#### Scope and Publication Policies

G3, published by the Genetics Society of America, meets the critical and growing need of the genetics community for rapid review and publication of important results in all areas of genetics. G3 offers the opportunity to publish the puzzling finding or to present unpublished results that may not have been submitted for review and publication due to a perceived lack of a potential high-impact finding.

G3 is a peer-reviewed, *peer-edited* journal. All editorial decisions are made through collaboration of at least two peer-editors.

#### Criteria for Publication

The experiments and other analyses are of high-quality and are clearly described and reasonably interpreted; the study describes information (e.g. large-scale datasets; sequence or QTL information), reagents or new resources (e.g. results of a mutant screen; mutant; collections for functional genomic experiments) or tools/methodologies (e.g. statistical/computational methods) whose availability would be valuable for genetics and genomics investigators; the results are original and adhere to all community standards for data availability and format (note: in certain cases we will specify required data formats in instructions to authors); the results presented provide strong support for the conclusions reached.

#### Authorship

Authors are those who contributed substantially to the research documented in the paper and share responsibility for the resulting article. The names of these researchers should appear in the byline. Those who assisted peripherally but are not authors should be recognized in the Acknowledgments. All authors are responsible for the article's content. A Co-corresponding Author(s) can be designated, but the Corresponding Author has the authority to act on behalf of all authors. Authorship data entered during manuscript submission appears in the published-ahead-of-print version, so be sure to complete all fields. To avoid production delays post-acceptance, please be sure that the author list is final and accurate at time of first submission. If there are changes post-acceptance please contact the Editorial Office to discuss the authorship changes. G3 follows COPE (Committee on Publication Ethics) guidelines and will obtain approval from the editor and all authors for authorship changes.

#### Open Access License for Publication

G3 applies a Creative Commons Attribution License (CCAL) to all its published material. With this open access license, authors retain ownership to the copyright for their published article in G3. Authors allow anyone to share, remix, download, mine, or otherwise use their work-with the requirement that the authors and the journal are given the proper attribution (the full article citation). For more information, see <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Applying this license to this work fulfills the truest definition of open access, in which your work will be fully available. G3 also participates in secure archiving programs through LOCKSS (Lots of Copies Keep Stuff Safe).

#### Research Materials

If your manuscript is accepted for publication, you agree to provide any unique research materials at reasonable cost to any investigator who requests them. Examples of unique

research materials are strains, plasmids, antibodies (including cell lines producing monoclonal antibodies), and software programs or applications. You are permitted to require that the materials be used only for non-commercial purposes, and that the recipient not transfer the materials to a third party without your consent. You may request reasonable payment for costs of sending the material (e.g. shipping and customs fees).

### **Image Manipulation**

Images must not be manipulated in any way that misrepresents the original data. Examples of inappropriate manipulations include: selective alteration of specific features or regions within an image, e.g. removing or obscuring bands in a gel photo, or enhancing brightness for a specific cell within a group; Grouping together images without clearly indicating the edit using dividing lines or some other visual marker, e.g. combining lanes from different gels into a composite image; Selectively making the image background appear more uniform, e.g. “erasing” background noise; Duplicating images (e.g. controls) in different figures or parts of a figure without clearly indicating this duplication in the figure legend.

Adjustments to brightness, contrast, and color balance that clarify presentation of the data are acceptable only if they are applied uniformly to the entire image. Non-linear adjustments (such as gamma setting adjustments) should be noted in the text.

If editors suspect any images in your manuscript have been inappropriately manipulated, they may request the original image files for comparison. If original files are not available or reveal inappropriate manipulations, the editors may reject or withdraw acceptance of your manuscript.

### **Review Process**

A submitted manuscript is assigned to the Senior Editor of the appropriate subject section. The Senior Editor assigns it to an Associate Editor who manages and adjudicates its review. The Editors will return manuscripts that are judged to be outside the scope of the journal. Manuscripts can be returned without review for reasons that include: grammar and style that is not of the quality expected in a published article; The topic or scope of the work is not within the scope of the journal; The presentation of the findings is not directed to the readership of the journal; The methods or approaches are judged to be flawed.

At least two Editorial Board members collaborate in determining whether a manuscript will be returned without review. Manuscripts returned without review may be resubmitted to G3 after suitable revision. Manuscripts sent for review are examined by one or more reviewers selected for their expertise in the subject matter of the article. Reviewers will remain anonymous (unless they choose to reveal themselves). The Associate Editor makes one of the following decisions on the manuscript:

## **Anexo 3**

### **Genetics and Molecular Biology**

Comprovante de submissão

The screenshot shows the ScholarOne Manuscripts Author Dashboard for the journal Genetics and Molecular Biology. The user is Claudia Rohde. The dashboard is titled 'Unsubmitted and Manuscripts in Draft' and contains a table with the following data:

CONTINUE	ID	TITLE	CREATED	DELETE
<a href="#">Continue</a>	Draft (GMB-2017-0250) Returned by Admin on 15-Aug-2017	Wolbachia pipientis in Brazilian populations of Drosophila willistoni (Diptera: Drosophilidae) <a href="#">View Submission</a>	08-Aug-2017	<a href="#">Delete</a>

The sidebar on the left includes the following navigation options:

- 1 Unsubmitted and Manuscripts in Draft
- 1 Manuscripts with Decisions
- Start New Submission
- Legacy Instructions
- 5 Most Recent E-mails

## Genetics and Molecular Biology

Formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics). The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered. Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics), contributors are not required to be members of the Society. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor, are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript. Genetics and Molecular Biology follows and Open-Access policy. Articles are made available in full content at SciELO (Scientific Library Online) hosted at [www.scielo.br/gmb](http://www.scielo.br/gmb). Back issues dating to 1998 are available through [this](#) site. Back issues of the earlier titles (Brazilian Journal of Genetics and Revista Brasileira de Genética) are hosted at GMB's own site: [www.gmb.org.br](http://www.gmb.org.br) GMB articles published since 2009 are also indexed at PubMed Central, and there available as a full text version.

**SUBMISSION OF PAPERS** The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered. Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board, are reviewed by the Associate Editor and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The journal's short title is **Genet. Mol. Biol.**, which should be used in bibliographies, footnotes and bibliographical references and strips. There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. There is a publication charge for manuscripts once they are accepted.

**The publication charge for accepted manuscripts is**

US\$ 700.00 for manuscripts from abroad and  
R\$ 2.100,00 from Brazil.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

Manuscripts submitted by a corresponding author who is a Member-in-good-standing of the Sociedade Brasileira de Genética (before the submission date) are exempt from publication charges. Other authors may request a waiver, which will be judged by the Editor based on sound reasoning. Waiver requests, with reasons given in the cover letter, must be made at the first submission (original version). Waiver requests will not be considered for revised versions.

*There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.*

**Manuscripts must be submitted through our online submission platform**

**hosted at:** <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

The cover letter should be addressed to: Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

**Categories of Contribution**

**Research Articles**

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all

contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

**Sample journal article citation:**

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilopthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

**Sample book citation:** Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

**Sample chapter-in-book citation:** Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

**Sample electronic article citation:** Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. PLoS One 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

*Sample Internet resource citation:*

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), (September 4, 2009)

LEM Software, (September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

## Anexo 4

### Annals of the Entomological Society of America

*Annals of the Entomological Society of America* is published in January, March, May, July, September, and November. *Annals* especially invites submission of manuscripts that integrate different areas of insect biology, and address issues that are likely to be of broad relevance to entomologists. Articles also report on basic aspects of the biology of arthropods, divided into categories by subject matter: systematics; ecology and population biology; arthropod biology; arthropods in relation to plant diseases; conservation biology and biodiversity; physiology, biochemistry, and toxicology; morphology, histology, and fine structure; genetics; and behavior.

Note that the *Annals of the ESA* does not accept purely descriptive single-species taxonomic manuscripts. Instead, the *Annals of the ESA* looks for manuscripts that link taxonomy to the evolutionary biology of species groups. Descriptive single-species taxonomic papers can be submitted to our sister journal, ESA's *Journal of Insect Science*.

#### Journal Submissions

The journals published by ESA primarily contain research articles, all of which are peer reviewed before being accepted for publication. Learn more about the manuscript review process. In addition to scientific research articles, the journals publish letters to the editor, interpretive or evaluative articles that appear in a *Forum* section, and book reviews (all book reviews appear in *American Entomologist*). Manuscripts that describe entomological techniques and computer software programs generally are not considered for publication in the journals.

#### Formatting

For new submissions, our formatting requirements are simple—just make sure your paper has the following items:

- ✓ Continuous line numbers
- ✓ Double-spaced lines
- ✓ A title page and abstract in the main document
- ✓ A main document in a doc, docx, rtf, or tex (converted to PDF for review) file type
- ✓ Tables in a Word document (we cannot accept Excel files, unless they are supplementary files)
- ✓ Figure and table legends in the main document
- ✓ All coauthors entered into the online review system (email addresses required)

Please note there are more formatting guidelines for revised versions, as those are closer to being accepted (see the Revised Versions section of these author instructions).

#### Article types and lengths

- Research article: No limit (under 7500 words recommended)
- Review: No limit
- Forum: No limit
- Letter to the Editor: 2,000 words or less

For explanations of the different article types, please see the Article Types section of these author instructions.

#### Language

- English. A second abstract in a second language is permitted. Authors are responsible for the accuracy of non-English abstracts.

### **Page charges**

In order to publish in AESA, authors are required to pay page charges or an Open Access fee. ESA members are exempt from page charges and receive a discount on the Open Access fee. For more information, including pricing, please visit the Charges and Licensing page.

### **Title Page**

The title page should include:

1. **Corresponding author:** Include full name, mailing address, telephone number, and email address.
2. **Title:** Should be as short as possible. Only include common names that are listed in the ESA Common Names of Insects & Related Organisms. Do not include authors of scientific names. Insert “([Order]: [Family])” immediately after the name of the organism.
3. **Author list:** Include all authors in the order the names should be published.
4. **Affiliation line:** Include full addresses of all authors. If there are multiple affiliations, designate through numbered footnotes.
5. **Abstract**  
250 words or less.

Give scientific name and authority at first mention of each organism.

Do not cite references, figures, tables, probability levels, or results.

Refer to results only in the general sense.

A second abstract in a second language is permitted.

6. **Keywords** Below the abstract, provide three to five keywords, separated by commas. Do not use abbreviations, combined keywords, or species names.

**Introduction** Clearly state the basis of your study along with background information and a statement of purpose.

**Materials and Methods** Include a clear and concise description of the study design, experiment, materials, and method of statistical analysis.

**Results** Clearly present the results. Do not include interpretation of results or interpretation of statistical analysis—simply present the results of the experiment and the results of the statistical analysis. Data listed in tables should not be listed in the results; instead, refer to the table.

**Discussion** Interpret and discuss results of the study and their implications. Include suggestions for direction of future studies, if appropriate.

**Acknowledgments** Place the acknowledgments after the text. Organize acknowledgments in paragraph form in the following order: persons, groups, granting institutions, grant numbers, and serial publication number.

Following the Acknowledgments, you may include a statement of author contribution outlining the specific contributions of each author to the article. A statement of author contribution is welcomed but not required.

### **References**

- EndNote style is “Environmental Entomology,” and Reference Manager style is “Journal of Medical Entomology.”
- Only cite published or formally accepted (in press) articles, not submitted articles.
- References should be in alphabetical order. If multiple references from the same author are cited, those references should be in chronological order.
- Abbreviate journal titles according to the most recent issue of BIOSIS Serial Sources.
- For non-English titled journals that are cited in the references, the title of the journal should be spelled out.
- Systematics-related articles may specify that all serial titles be spelled out for final publication.

## Sample reference styles

**Journal Articles**

**Evans, M. A. 2000.** Article title: subtitle (begin with lowercase after colon or dash unless first word is a proper noun). J. Abbr. 00:000–000.

**Evans, M. A. 2001a.** Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

**Evans, M. A., and R. Burns. 2001.** Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

**Evans, M. A., and A. Tyler. 2001.** Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

**Evans, M. A., A. Tyler, and H. H. Munro. 2000.** Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

**Evans, M. A., R. Burns, and A. A. Dunn. 2001.** Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

**In Press**

**Evans, M. A. 2002.** Article title. J. Econ. Entomol. (in press).

**Books**

**Burns, R. 2001.** Title (initial cap only): subtitle (no initial cap after colon). Publisher, city, state abbreviation or country.

**Evans, M. A. 2001.** Colorado potato beetle, 2nd ed. Publisher, city, state abbreviation or country.

**Tyler, A. 2001.** Western corn rootworm, vol. 2. Publisher, city, state abbreviation or country.

**Article/Chapter in Book**

**Tyler, A. 2001.** Article or chapter title, pp. 000–000. In T.A.J. Royer and R. B. Burns (eds.), Book title. Publisher, city, state abbreviation or country.

**Tyler, A., R.S.T. Smith, and H. Brown. 2001.** Onion thrips control, pp. 178–195. In R. S. Green and P. W. White (eds.), Book title, vol. 13. Entomological Society of America, Lanham, MD.

**No Author Given**

**USDA) U.S. Department of Agriculture. 2001.** Title. USDA, Beltsville, MD.

**(IRRI) International Rice Research Institute. 2001.** Title. IRRI, City, State or Country.

**Patents**

**Harred, J. F., A. R. Knight, and J. S. McIntyre, inventors; Dow Chemical Company, assignee. 1972 Apr 4.** Epoxidation process. U.S. patent 3,654,317.

**Proceedings**

**Martin, P. D., J. Kuhlman, and S. Moore. 2001.** Yield effects of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) feeding, pp. 345–356. In Proceedings, 19th Illinois Cooperative Extension Service Spray School, 24–27 June 1985, Chicago, IL. Publisher, City, State.

**Rossignol, P. A. 2001.** Parasite modification of mosquito probing behavior, pp. 25–28. In T. W. Scott and J. Grumstrup-Scott (eds.), Proceedings, Symposium: the Role of Vector-Host Interactions in Disease Transmission. National Conference of the Entomological Society of America, 10 December 1985, Hollywood, FL. Miscellaneous Publication 68. Entomological Society of America, Lanham, MD.

**Theses/Dissertations**

**James, H. 2001.** Thesis or dissertation title. M.S. thesis or Ph.D. dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia.

**Software**

**SAS Institute. 2001.** PROC user's manual, version 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Online Citations

**Reisen, W. 2001.** Title. Complete URL (protocol://host.name/path/file.name) and/or DOI (Digital Object Identifier)

#### Tables

- Tables should be editable tables in a Word document.

#### Figures

- Figures should be at least 300 dpi, or 600 dpi for line graphs.
- The quality in which figures are submitted is the quality in which they will print—please ensure figures are high quality.
- The following file types of figures are accepted: tif (preferred), eps (preferred), rtf, doc/docx, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png.

#### Supplemental Material

Supplemental Material may be submitted in the form of one or more files to accompany the online version of an article. Such material often consists of large tables, data sets, or videos that are not possible or convenient to present in print media. Supplemental Material represents substantive information to be posted on the ESA journal website that enhances and enriches the information presented in the main body of a paper; however, the paper must stand on its own without the need for the reader to access the supplemental information to understand and judge the merits of the paper. All Supplemental Material must be provided at the time of manuscript submission and will be distributed to reviewers as part of the normal peer-review process. It will not be edited during production and will be published as submitted.

## Curriculum vitae (Lattes)

### Zilpa das Graças Silva de Melo

Curriculum Vitae

---

#### Dados pessoais

**Nome:** Zilpa das Graças Silva de Melo

**Nome em citações bibliográficas:** Melo, Z.G.S. e SILVA, Z. G.

**Sexo:** Feminino

**Endereço eletrônico:** zilpasilva@bol.com.br  
zilpation@gmail.com

#### Formação acadêmica/titulação

- 2013 - 2017**      Doutorado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis*, Ano de obtenção: 2017  
Orientador: Rita de Cássia de Moura  
Co-orientador: Cláudia Rohde  
Bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2010 - 2012**      Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada.  
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil  
Título: Caracterização Molecular do Elemento Cromossômico F de *Drosophila willistoni* (Diptera. Drosophilidae), Ano de obtenção: 2012  
Orientador: Dra Cláudia Rohde  
Co-orientador: Dr. Martín Alejandro Montes  
Bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2005 - 2011**      Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2009**      Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado.

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Título: Produção de Protease alcalina extracelular por *Bacillus firmus* em batelada alimentada.

Orientador: Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro

## Formação complementar

**2016 - 2016** Curso de curta duração em Introdução à Ecologia do Bentos Marinho. (Carga horária: 5h). Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

**2013 - 2013** Curso de curta duração em Biologia Molecular aplicada à experimentação farmacológica. (Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Pernambuco -CAV, UFPE -CAV, Brasil

**2011 - 2011** Curso de curta duração em Cromossomos politênicos. (Carga horária: 6h).

Universidade Federal do Pará, UFPA, Belém-PA, Brasil

Bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

**2010 - 2010** Extensão universitária em Citogenética Molecular Animal (teoria e prática). (Carga horária: 40h).

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Biologia Molecular. (Carga horária: 8h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

**2002 - 2002** Curso de curta duração em Operador de Microcomputador. (Carga horária: 120h).

Tecnologia e treinamento em Informática, T&T INFORMÁTICA, Brasil

## Atuação profissional

### 1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

#### Vínculo institucional

**2013 - 2017** Bolsista, Enquadramento funcional: Estudante de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Integral

**2005 - 2011** Aluna, Enquadramento funcional: Aluna de graduação, Regime: Parcial

## 2. Prefeitura Municipal de Recife - PM/Recife

### Vínculo institucional

**2007 - 2008** Vínculo: Estagiário (CIEE), Enquadramento funcional: Professora de Ciências, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações: ESTÁGIO REALIZADO EM ESCOLA DA PREFEITURA MUNICIPAL DO RECIFE ATRAVÉS DO CIEE (CENTRO DE INTEGRAÇÃO EMPRESA ESCOLA) COM A DURAÇÃO DE DOIS ANOS LETIVOS. DISCIPLINA LECIONADA: MATEMÁTICA. PARA TURMAS DE ENSINO REGULAR: 7ª E 8ª SÉRIE E TURMAS DE EJA (EDUCAÇÃO JOVENS E ADULTOS)

### Atividades

**07/2008 - 07/2008** Outra atividade técnico-científica, Secretaria de Educação, Esporte e Lazer

*Especificação: Monitora das oficinas de leitura e artes na Escola Municipal Prof. Hugo Gerdau*

## 3. COLÉGIO REAL

### Vínculo institucional

**2009 - 2009** Vínculo: Estágio (ABRE), Enquadramento funcional: Professora de Ciências e Biologia, Carga horária: 21, Regime: Parcial

Outras informações: Estágio em colégio da iniciativa privada, com duração de seis meses. Disciplinas lecionadas: Ciências e Biologia para turmas de ensino fundamental e médio (Da 5ª Série do ensino Fundamental ao 3º ano do ensino médio).

## 4. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

### Vínculo institucional

**2012 - 2012** Vínculo: Aluna de Mestrado Visitante, Enquadramento funcional: Monitora de Atividades de Inserção Científica, Carga horária: 16, Regime: Parcial

Outras informações: MONITORIA (INSERÇÃO CIENTÍFICA INICIAL-ICI) Período: 15 a 16 de Janeiro de 2012. Carga horária: 16 horas. Local: Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA Tânia Falcão-UFRPE.

**2012 - 2012** Vínculo: Aluna de Mestrado Visitante, Enquadramento funcional: Monitora de Atividades de Inserção Científica, Carga horária: 8, Regime: Parcial

Outras informações: MONITORIA (INSERÇÃO CIENTÍFICA INICIAL-ICI) Período: 04 a 06 de Setembro de 2012. Carga horária: 08 horas. Local: Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA Tânia Falcão-UFRPE.

**2010 - 2012** Vínculo: aluna de mestrado visitante, Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado Visitante, Carga horária: 40, Regime: Integral

### Atividades

**01/2012 - 01/2012** Outra atividade técnico-científica, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, PET-BIOLOGIA

*Especificação:*

*MONITORIA (INSERÇÃO CIENTÍFICA INICIAL-ICI) Carga horária: 16 horas*

## 5. Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Ant - UFPE-CAV

### Vínculo institucional

**2015 - 2017** Aluna do laboratório de Genética.

## 6. Faculdade Frassinetti do Recife - FAFIRE

### Vínculo institucional

**2014 - 2014** Vínculo: Colaboradora, Enquadramento funcional: Colaboradora, Regime: Parcial

## 7. Universidade de Pernambuco - UPE

### Vínculo institucional

**2008 - 2009** Vínculo: Monitoria, Enquadramento funcional: Monitor de Citologia, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**2008 - 2009** Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Iniciação Científica Voluntária, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações: Participação voluntária do projeto de Pesquisa: Identificação e propriedades de protease alcalina extracelular produzida por *Bacillus firmus* em batelada alimentada.

- 2007 - 2008** Vínculo: Monitoria, Enquadramento funcional: Monitor de Morfoanatomia Vegetal, Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2007 - 2008** Vínculo: Aluna de Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Iniciação Científica Voluntária - CNPQ, Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2006 - 2006** Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Estagiário do Laboratório de Parasitologia, Carga horária: 20, Regime: Parcial  
 Outras informações: Estágio extracurricular no Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário Osvaldo Cruz. Carga horária total: 182h
- 2006 - 2007** Monitoria, Enquadramento funcional: Monitor de Microbiologia, Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2005 - 2006** Estágio Voluntário, Enquadramento funcional: Estagiário do Laboratório Clínico, Carga horária: 20, Regime: Parcial  
 Outras informações: Estágio Extracurricular no Laboratório Clínico do Hospital Universitário Osvaldo Cruz, nos setores: Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Uranálise, Coleta e Triagem . Carga horária total:182h
- 2005 - 2009** Aluna de Graduação, Enquadramento funcional: Graduação em Ciências Biológicas, Bacharelado, Carga horária: 40, Regime: Integral.

## Projetos

### Projetos de pesquisa:

#### 2015 – Atual Filogenia dos drosofilídeos dos grupos *saltans* e *willistoni* do Novo Mundo

Descrição: Este projeto pretende ampliar as análises filogenéticas entre os grupos *saltans* e *willistoni* investigando tanto a variabilidade de nucleotídeos de cinco genes do elemento cromossômico F, como a variabilidade ao nível dos genes clássicos do DNA mitocondrial, a fim de identificar corretamente as espécies de estudo. Estes aspectos vêm sendo investigados nos últimos três anos em várias espécies e populações do grupo e subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. Trinta amostras deste grupo já foram sequenciadas e investigadas para os genes PlexinB e Ankyrin do elemento F (Nascimento, 2013; Monteiro 2014). Fizeram parte das amostras, cinco linhagens de *Drosophila willistoni*, 18 de *D. paulistorum*, cinco de *D. equinoxialis*, uma de *D. tropicalis*, e três de *D. nebulosa* (subgrupo *bocainensis*). Mais recentemente, Silva (2014) estudou a variabilidade de mais três genes (Host Cell Factor, Zinc Finger Homeodomain-2 e Bent) entre populações de *D. equinoxialis*. Estes resultados abrem caminho para que mais estudos sejam feitos, para espécies e populações do grupo *saltans*, já que são poucos os trabalhos sobre a variabilidade de nucleotídeos de genes, sobre a localização in situ nos cromossomos politênicos, e sobre as relações filogenéticas com o grupo irmão, *willistoni*. Esperamos que ao final deste estudo seja possível comparar os resultados e estabelecer árvores filogenéticas robustas para os representantes dos grupos *saltans* e *willistoni*; que seja conhecida a variabilidade dentro e entre espécies e populações; e que as posições dos genes no elemento F sejam conhecidas sobre os cromossomos politênicos das espécies. Para alcançar os objetivos serão aplicadas metodologias da área da biologia molecular, taxonomia e genética para melhor entender as relações de parentesco existente entre espécies de drosofilídeos que habitam a região das Américas (Novo Mundo). As atividades serão desenvolvidas no Laboratório de Genética, do Centro Acadêmico de Vitória, campus da UFPE, no município de Vitória de Santo

Antão/Pernambuco, que desde 2007 vem garantindo novas oportunidades de trabalho científico, formação profissional e nucleação de pesquisa de qualidade no interior do Estado.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Zilpa das Graças Silva de Melo; Cláudia Rohde (Responsável); Martín Alejandro Montes; Georgia Fernanda de Oliveira; Jaqueline Alves Nery de Mendonça; Ana Cristina Lauer Garcia; Gleyse Audria F. Nascimento; Paloma da Silva; Rita Dayane Coutinho-Silva; Evelane Pinto de Lima

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

**2013 - 2017      Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) e infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis***

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1); Integrantes: Zilpa das Graças Silva de Melo; Cláudia Rohde; Martín Alejandro Montes; Ana Cristina Lauer Garcia; Rita de Cássia de Moura (Responsável)

**2012 - Atual      Estudo integrado de pesquisa sobre biodiversidade, uso do solo e mudanças climáticas na Mata Atlântica. Edital MCT/CNPq nº 35/2012. PPBio/Geoma. Redes de Pesquisa, Monitoramento e Modelagem em Biodiversidade e Ecossistemas (Mata Atlântica).**

Descrição: No presente projeto são propostos meios para a integração interinstitucional de grupos de pesquisa em Drosophilidae (Diptera) dedicados ao estudo de organismos presentes em regiões de Mata Atlântica (3 deles situados no Nordeste do Brasil). A família Drosophilidae se constitui em um dos grupos modelo mais importantes e amplamente utilizados na pesquisa científica. A sensibilidade destas pequenas moscas em relação às mudanças nos ambientes, aliada a capacidade de funcionarem como indicadores de interferências humanas nos ambientes naturais, como o impacto do uso da terra, e a ocorrência de variações climáticas, que são capazes de interferir na sua biodiversidade. A extensão deste tipo de estudo para o Bioma Mata Atlântica, promovendo a integração dos grupos de pesquisa desta região entre si e com os da Amazônia, tem muito a contribuir para o entendimento da diversidade e evolução dos drosofilídeos, assim como para o entendimento dos processos ecológicos e evolutivos em diferentes escalas.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Zilpa das Graças Silva de Melo (Responsável); Cláudia Rohde; Jaqueline Alves Nery de Mendonça; Ana Cristina Lauer Garcia; Vera Lucia da Silva Valente; Rita Dayane Coutinho-Silva; Daniela C De Toni; Loius Bernard Klaczko; Hermes Jose Schmitz ; Lilian Madi Ravazzi; Blanche C. Bitner-Mathe; Carlos Ribeiro Vilela; Rui Cerqueira Silva

**2010 - 2013      Citogenética molecular do elemento cromossômico F no grupo *willistoni* de *Drosophila***

Descrição: Neste projeto foi feita a caracterização molecular do elemento F de *D. willistoni* e demais espécies do grupo, utilizando dados do projeto genoma de *D. willistoni*, para produção de sondas e determinar a localização de genes neste cromossomo. Os resultados contribuíram para o entendimento da organização estrutural do cariótipo da *D. willistoni* e das demais espécies crípticas e não-crípticas do grupo.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Zilpa das Graças Silva de Melo; Cláudia Rohde (Responsável); Martín Alejandro Montes; Yanina Panzera; Pita, S.; Ana Cristina Lauer Garcia

### Áreas de atuação

1. Biologia Geral
2. Biologia Molecular
3. Genética Animal
4. Genética Geral
5. Citogenética

### Idiomas

**Inglês** Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

**Espanhol** Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem

**Português** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

### Prêmios e títulos

**2014** Menção honrosa do prêmio Jovem Cientista pelo trabalho apresentado dentro da categoria Genética Animal (doutorado), UFPE, UEPB

**2013** Prêmio de melhor trabalho de Genética do VIII Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila*, Universidade Federal de Pernambuco

### Produção

#### Produção bibliográfica

##### Artigos completos publicados em periódicos

1. PITA, SEBASTIÁN; Panzera, Yanina; LÚCIA DA SILVA VALENTE, VERA; **DAS GRAÇAS SILVA DE MELO, ZILPA**; GARCIA, CAROLINA; GARCIA, ANA CRISTINA LAUER; MONTES, MARTÍN ALEJANDRO; ROHDE, CLAUDIA

Cytogenetic mapping of the Muller F element genes in *Drosophila willistoni* group. *Genetica* ('s-Gravenhage), v.142, p.397 - 403, 2014.

*Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s10709-014-9784-3]*

##### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, G. F.; **Melo, Z.G.S.**; Valente, VLS.; Rohde, C.

Avaliação da similaridade entre populações de *Drosophila nebulosa* (Insecta, Diptera) da Caatinga e florestas In: Congresso Nordestino de Biólogos, 2016, João Pessoa-Paraíba.

<http://congresso.rebibio.net/congrebio2016/trabalhos.html>. 2016.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

2. **Melo, Z.G.S.**; Costa, AP; VASCONCELOS, W. K. M.; Moura, R.C; Rohde, C.

Identificação molecular de *Wolbachia pipientis* em amostras recentes de *Drosophila willistoni* (Diptera, Drosophilidae) In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife-PE.

<http://www.engene-sbg.com.br/2016/files/anais.pdf>. 2016.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

3. OLIVEIRA, G. F.; **Melo, Z.G.S.**; NASCIMENTO, G. A. F.; VALENTE, V. L. S.; Rohde, C.

Infeccion by the intracellular bacteria *Wolbachia pipientis* in natural populations of *Drosophila nebulosa* (Diptera, Drosophilidae) In: Brazilian-International Congress of Genetics (62 Congresso Brasileiro de Genética), 2016, Caxambu-MG.

**Anais. Ribeirão Preto/SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2016. v. 1. p. 1-1..2016.**

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. MENDONCA, J. A. N.; OLIVEIRA, R. M.; Costa, AP; **Melo, Z.G.S.**; Moura, R.C; Rohde, C.

New surveys in the study of chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* populations collected in Bahia and Pernambuco states In: IX Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila*, 2015, Brasília-DF.

**Anais do IX Simpósio de *Drosophila*. Brasília/DF: Universidade de Brasília, 2015. v. 1. p. 29-29.. , 2015.**

Referências adicionais : Brasil/Português.

5. **Melo, Z.G.S.**; OLIVEIRA, G. F.; MENDONCA, J. A. N.; GARCIA, A. C. L.; Montes, M.A.; MOURA, R. C.; Rohde, C.

Análise da diversidade genética de genes nucleares e mitocondriais em *Drosophila willistoni* In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

**Biofar: Revista de Biologia e Farmacia.** Campina Grande-PB: EEMAE GENÉTICA - Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management, 2015 - revista.uepb.edu., 2014. v.Esp. p.1 - 34

Referências adicionais : Brasil/Português. . Home page:

[<http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/download/2544/1370>]

6. OLIVEIRA, G. F.; **Melo, Z.G.S.**; GARCIA, A. C. L.; MONTES, M. A.; VALENTE, V. L. S.; Rohde, C.

Caracterização genética preliminar de *Drosophila nebulosa* (Diptera, Drosophilidae) dos biomas de Caatinga e Floresta Atlântica In: XX Encontro de Genética do Nordeste - ENGENE, 2014, Campina Grande-PB.

**Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management. Ribeirão Preto/SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2014. v. 10. p. 21-21.. , 2014.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários*

7. **Melo, Z.G.S.**; CRUZ, G. A. S.; MENDONCA, J. A. N.; GARCIA, A. C. L.; Rohde, C.; Montes, M.A.; Moura, R.C

Caracterização inicial da estrutura genética de populações de *Drosophila willistoni* baseada no marcador ISSR In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande-PB.

**Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management. Ribeirão Preto/SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2014. v. 10. p. 15-15.. , 2014.. , 2014.**

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

8. MENDONCA, J. A. N.; **Melo, Z.G.S.**; Moura, R.C; MONTES, M. A.; GARCIA, A. C. L.; Rohde, C.

Identificação de espécies crípticas do grupo *willistoni* de *Drosophila* de cinco ambientes de Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil In: XX Encontro de Genética do Nordeste - ENGENE, 2014, Campina Grande-PB.

**Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management. Ribeirão Preto/SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2014. v. 10. p. 15-15.. , 2014.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários*

9. NASCIMENTO, G. A. F.; MONTEIRO, A. G. F.; SILVA, P.; **Melo, Z.G.S.**; SOUZA, C. M.; Montes, M.A.; GARCIA, A. C. L.; Rohde, C.

Phylogeny of the species of the *willistoni* group of *Drosophila* in different natural environments in Brazil based on Müller F element ('dot') In: VIII Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila*, 2013, Ipojuca-PE.

**Resumos VIIISEGED. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2013. v. 1. p. 93-93.. , 2013.**

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

10. Pita, Sebastian; **Melo, Z.G.S.**; Panzera, Yanina; Goni, B; Montes, M.A.; GARCIA, A. C. L.; Valente, VLS.; Rohde, C.

Cytogenetic mapping and synteny of genes of the chromosomal element F in six species of the *Drosophila willistoni* group (Insecta, Diptera) In: I International Symposium on Evolutionary Biology, 2012, João Pessoa-PB.

**Resumos. João Pessoa/PB: Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal de Campina Grande, 2012. v. 1. p. 1-1.. , 2012.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*

11. MONTEIRO, A. G. F.; **SILVA, Z. G.**; Montes, M.A.; GARCIA, A. C. L.; Rohde, C.

Intrapopulacional variability of the P transposable element in the Muller Element F of *Drosophila willistoni* assessed by in situ hybridization In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu-PR.

**Resumos. Ribeirão Preto/SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. v. 1. p. 4-4.. , 2012.**

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

12. **Melo, Z.G.S.**; Rohde, C.; Montes, M.A.; GARCIA, A. C. L.; Pita, S.; Panzera, Y

Localization of Hsp83 heat shock gene by fluorescent in situ hybridization (FISH) in populations of *Drosophila willistoni* (Diptera, Drosophilidae) from Northeast Brazil In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu-PR.

**Resumos. Ribeirão Preto/SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. v. 1. p. 3-3. 2012.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*

13. Rohde, C.; **Melo, Z.G.S.**; Montes, M.A.; GARCIA, A. C. L.; Pita, S.; Panzera, Y

Localization of Hsp83 heat shock gene by fluorescent in situ hybridization (FISH) in populations of *Drosophila willistoni* (Diptera, Drosophilidae) from Northeast Brazil In: I International Symposium on Evolutionary Biology, 2012, João Pessoa-PB.

**Resumos. João Pessoa/PB: Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal de Campina Grande, 2012. v. 1. p. 1-1. , 2012.**

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

14. **Melo, Z.G.S.**; Montes, M.A.; Rohde, C.

Análise in silico de regiões gênicas conservadas do elemento cromossômico F de *Drosophila willistoni*. In: VII Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila*, 2011, Belém-PA.

**Resumos. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2011. v. 1. p. 7-7.. , 2011.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*

15. **SILVA, Z. G.**; Garcia; Montes, M.A.; Rohde, C.

OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA GENES DO IV CROMOSSOMO DE *Drosophila willistoni* In: V Encontro de Pós-graduação e pesquisa, 2011, RECIFE.

**V ENCONTRO DE POS GRADUAÇÃO E PESQUISA. 2011.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários*

16. DIAS, M. F.; **SILVA, Z. G.**; SANTOS, A.C.O.; PINHEIRO, I. O.

IDENTIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR DE PRODUZIDA POR *B. firmus* EM BATELADA ALIMENTADA In: II ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA E 14º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UPE, 2008, RECIFE.

## II ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA E 14° SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UPE. 2008.

Palavras-chave: BIOTECNOLOGIA; PRODUÇÃO DE ENZIMAS; PROTEASE

Áreas do conhecimento : BIOTECNOLOGIA

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: [<http://IDENTIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR DE PRODUZIDA POR B. firmus EM BATELADA ALIMENTADA>]

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **Melo, Z.G.S.**; SILVA, D. G.; OLIVEIRA, G. F.; COUTINHO-SILVA, R. D.; MENDONCA, J. A. N.; Costa, AP; OLIVEIRA, R. M.; GARCIA, A. C. L.; Moura, R.C; Rohde, C.

Composição de Drosophilidae em diferentes ecossistemas úmidos no nordeste do Brasil In: XIX Encontro de Zoologia do Nordeste: Biodiversidade e mudanças climáticas, 2016, Garanhuns-PE.

<http://www.upe.br/garanhuns/wp-content/uploads/2017/03/Livro-de-Resumos.pdf>. 2016.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

2. **Melo, Z.G.S.**; MENDONCA, J. A. N.; Costa, AP; OLIVEIRA, R. M.; VASCONCELOS, W. K. M.; GARCIA, A. C. L.; Rohde, C.; Moura, R.C

Prevalência das espécies crípticas *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* do subgrupo *willistoni* em florestas úmidas do Brasil In: XIX Encontro de Zoologia do Nordeste, 2016, Garanhuns-PE.

<http://www.upe.br/garanhuns/wp-content/uploads/2017/03/Livro-de-Resumos.pdf>. 2016.

Referências adicionais : Brasil/Português.

3. OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, G. F.; **Melo, Z.G.S.**; VALENTE, V. L. S.; Rohde, C.

Primeiro registro de *Wolbachia* em *Drosophila nebulosa*, uma espécie abundante na Caatinga In: XIX Encontro de Zoologia do Nordeste: Biodiversidade e mudanças climáticas, 2016, Garanhuns-PE.

<http://www.upe.br/garanhuns/wp-content/uploads/2017/03/Livro-de-Resumos.pdf>. 2016.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

4. DIAS, M. F.; **SILVA, Z. G.**; SANTOS, A.C.O.; PINHEIRO, I. O.

PRODUÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR POR *Bacillus firmus* var. *arozia* NCIB 10557 EM BATELADA ALIMENTADA In: IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX 2009, 2009, RECIFE.

**IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO- JEPEX. RECIFE: 2009.**

Palavras-chave: *Bacillus firmus*, BATELADA ALIMENTADA, BIOTECNOLOGIA; PRODUÇÃO DE ENZIMAS; PROTEASE

Áreas do conhecimento : *Biologia Molecular*, BIOTECNOLOGIA

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://PRODUÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR POR Bacillus firmus var. arosia NCIB 10557 EM BATELADA ALIMENTADA]*

## **Apresentação de trabalho e palestra**

1. **Melo, Z.G.S.**; Rohde, C.; CRUZ, G. A. S.; Montes, M.A.; Moura, R.C

**Diversidade e estruturação genética de *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) através do marcador ISSR, 2015.** (Outra,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais; Brasil/Português; Local: Universidade Federal de Pernambuco; Cidade: Recife-PE; Evento: V Jornada de Pós-graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco*

2. **Melo, Z.G.S.**; OLIVEIRA, G. F.; MENDONÇA, J. A. N.; GARCIA, A. C. L.; Montes, M.A.; MOURA, R. C.; Rohde, C.

**Análise da diversidade genética de genes nucleares e genes mitocondriais em populações de *Drosophila willistoni*, 2014.** (Outra,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Estadual da Paraíba; Cidade: Campina Grande, PB; Evento: XX Encontro de Genética do Nordeste; Inst.promotora/financiadora: UEPB*

3. DIAS, M. F.; **SILVA, Z. G.**; SANTOS, A.C.O.; PINHEIRO, I. O.

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR PRODUZIDA POR *B. firmus* EM BATELADA ALIMENTADA, 2008.** (Seminário,Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: BIOTECNOLOGIA; PRODUÇÃO DE ENZIMAS; PROTEASE*

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR PRODUZIDA POR *B. firmus* EM BATELADA ALIMENTADA; Local: PROCAPE- PE; Cidade: RECIFE; Evento: II ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA - UPE; Inst.promotora/financiadora: UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO*

4. **SILVA, Z. G.**; PINHEIRO, I. O.; SANTOS, A.C.O.

**PRODUÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR POR *Bacillus firmus* EM BATELADA ALIMENTADA, 2008.** (Outra,Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Bacillus firmus, BATELADA ALIMENTADA, BIOTECNOLOGIA; PRODUÇÃO DE ENZIMAS; PROTEASE*

*Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,BIOTECNOLOGIA*

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: PRODUÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR POR Bacillus firmus EM BATELADA ALIMENTADA; Local: PROCAPE-HUOC; Cidade: RECIFE; Evento: II ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA - UPE; Inst.promotora/financiadora: UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO*

## **Orientações e Supervisões**

**Orientações e supervisões concluídas**

**Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. Elza Maria de Menezes. **Perfil epidemiológico da Dengue no município de Paulista/PE, no ano 2013**. 2014. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) - Faculdade Frassinetti do Recife

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

### **Trabalhos de conclusão de curso de graduação**

1. Paloma da Silva. **Variabilidade genética de *Drosophila equinoxialis* (Insecta, Diptera) baseada em genes do Elemento E-F de Muller**. 2014. Curso (Ciências Biológicas-Licenciatura) - Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Ant

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

## **Eventos**

### **Participação em eventos**

1. **XIX Encontro de Zoologia do Nordeste: Biodiversidade e mudanças climáticas**, 2016. (Encontro)

2. **V Jornada de Pós Graduação em Genética**, 2015. (Outra)

Diversidade e estruturação genética de *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) através do marcador ISSR.

3. **XX ENGENE**, 2014. (Encontro)

4. **GE Day**, 2013. (Outra)

5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **III Jornada de Genética da UFPE**, 2013. (Outra)

ESTUDO DA VARIABILIDADE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE DROSOFILÍDEOS DO SUBGRUPO WILLISTONI EM FRAGMENTOS DE FLORESTA ATLÂNTICA DO NORDESTE DO BRASIL.

6. **VIII Simpósio de Ecologia Genética e Evolução de *Drosophila***, 2013. (Simpósio)

7. **Congresso Brasileiro de Genética**, 2012. (Congresso)

8. **I International Symposium Evolutionary Biology**, 2012. (Simpósio)

9. **V Encontro de Pós-graduação e pesquisa**, 2011. (Encontro)

10. **VII Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila***, 2011. (Simpósio)

11. **III ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA**, 2009. (Encontro)

12. **IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENÇÃO - JEPEX 2009**, 2009. (Outra)

13. **VI SEMANA NACIONAL DE TECNOLOGIA**, 2009. (Outra)

14. **XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2009. (Seminário)

15. **FORMAÇÃO DE CIÊNCIA DA NATUREZA E SUAS TECNOLOGIAS**, 2008. (Outra)

16. **FORMAÇÃO DO PROGRAMA: "FÉRIAS, VÍDEO E LEITURA 2008"**, 2008. (Oficina)
17. **I FÓRUM DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO CONTROLE DE INFECÇÕES EM SERVIÇOS DE SAÚDE**, 2008. (Outra)
18. **I SEMINÁRIO INVENTÁRIO DA EDUCAÇÃO**, 2008. (Seminário)
19. **I WORKSHOP INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA**, 2008. (Congresso)
20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA - UPE**, 2008. (Encontro) **PRODUÇÃO DE PROTEASE ALCALINA EXTRACELULAR POR Bacillus firmus EM BATELADA ALIMENTADA.**
21. **II WORKSHOP SUL AMERICANO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS FARMACÊUTICAS**, 2008. (Congresso)
22. **III CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA**, 2008. (Encontro)
23. **III ENCONTRO ALFA VALNATURA**, 2008. (Encontro)
24. **III JORNADA CIENTÍFICA DO LIKA**, 2008. (Outra)
25. **SEMINÁRIO DE ALTOS ESTUDOS DA UPE: "NOVAS POSSIBILIDADES DE FINANCIAMENTO PARA A PÓS- GRADUAÇÃO: AÇÕES INOVADORAS E INDUTORAS NAS REGIÕES DE FRONTEIRAS"**, 2008. (Seminário)
26. **XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UPE**, 2008. (Seminário)
27. **1º ENCONTRO NORDESTINO DE ENTOMOLOGIA FORENSE**, 2007. (Encontro)
28. **20º CONGRESSO DE PARASITOLOGIA**, 2007. (Congresso)
29. **2º SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**, 2007. (Simpósio)
30. **I ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**, 2007. (Encontro)
31. **I SIMPÓSIO GENÉTICA RECIFE**, 2007. (Simpósio)
32. **PROGRAMAÇÃO DO DIA DO BIÓLOGO (UM OLHAR PARA O MUNDO)**, 2007. (Outra)
33. **V CONGRESSO DE MICOLOGIA**, 2007. (Congresso)
34. **VII SEMANA UNIVERSITÁRIA - ICB- UPE**, 2007. (Outra)
35. **XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO**, 2007. (Seminário)
36. **I JORNADA PRÉ-CONGRESSO DO ENSINO BÁSICO: UNIVERSIDADE PARA TODOS**, 2006. (Congresso)
37. **I WORKSHOP SULAMERICANO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS FARMACÊUTICAS**, 2006. (Congresso)
38. **II CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA**, 2006. (Congresso)
39. **INFLUENCIA ANTROPICA NO MEIO AMBIENTE**, 2006. (Outra)

**Organização de evento**

1. Rohde, C.; Garcia; Montes, M.A.; **SILVA, Z. G.**

**VIII Simpósio de Ecologia Genética e Evolução de Drosophila**, 2013. (Outro, Organização de evento)

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários*

2. CAETANO, M. N.; TABOSA, T.; **SILVA, Z. G.**

**III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana**, 2008. (Congresso, Organização de evento)

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*

*Organização de Evento como Monitor. Carga horária: 40h. Período: 22-24/Agosto/2008.*

## **Bancas**

### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

#### **Curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. SILVA, Z. G.; SANTOS, A.C.O.

Participação em banca de Eduardo Ribeiro. **Avaliação dos testes para o marcador HBsAg empregados na triagem de doadores de sangue na fundação HEMOPE**, 2012

(Patologia Clínica) Universidade de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

## **Graduação**

1. **SILVA, Z. G.**

Participação em banca de Jackson Roberto da Silva. **Avaliação da Quiropterofauna das Ecorregiões da Caatinga**, 2013

(Ciências Biológicas) Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

2. SILVA, Z. G.; Antonio Carvalho Neto; Montes, M.A.

Participação em banca de Lidiane Almeida Pessoa. **Artibeus planirostris (Chiroptera) da Floresta Atlântica, Brejos de altitude e Caatinga do estado de Pernambuco tem semelhança genética?**, 2012

(Ciências Biológicas) Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

3. Norma Machado; SILVA, Z. G.; Montes, M.A.

Participação em banca de Rita Dayane Coutinho da Silva. **Diversidade de drosofilídeos (Insecta, Diptera) na Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil**, 2012

(CIENCIA BIOLOGICAS LICENCIATURA) Universidade Federal de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

### **Participação em banca de comissões julgadoras**

#### **Outra**

1. **Avaliadora da I Sepec / III Enexc - UFPE 2017**, 2017

Universidade Federal de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

2. **Banca Examinadora do projeto de pesquisa de mestrado: Avaliação do potencial efeito genotóxico das águas do Rio Capibaribe no Estado de Pernambuco. Autoria: Raimundo Márcio Pereira de Oliveira.**, 2017

Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Ant

*Áreas do conhecimento : Mutagenese*

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

3. **Banca Examinadora do projeto de pesquisa de mestrado: Potencial efeito genotóxico da contaminação ambiental por metais pesados em açudes do semiárido nordestino, Brasil, avaliado por meio da exposição do organismo modelo *Drosophila melanogaster* Fallén, 1823. Autoria: Edson Francisco do Carmo Neto.**, 2017

Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Ant

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

4. **Avaliadora AD HOC de ações extensionistas UFPE - Parecerista do II ENExC- UFPE 2016 – Encontro de Extensão e Cultura da Universidade Federal de Pernambuco 2016**, 2016

Universidade Federal de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

*Emissão de pareceres sobre Resumos apresentados para a modalidade Comunicação Oral em Sessão Temática.*

5. **Avaliadora de Poster no IX Simposio Integrado de ciências da saúde e biológicas e VIII Congresso de ensino, pesquisa e extensão**, 2016

Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Ant

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

**6. Avaliadora de pôsters no Encontro de Pós Graduação e Pesquisa, Seminário de Iniciação Científica e Seminário de Inovação Tecnológica, 2014**

Universidade de Pernambuco

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

*As avaliações ocorreram nos dias 26, 27 e 28 de Novembro de 2014 em Recife -PE*

**7. Avaliadora de pôsters no Simpósio de Biologia - UFPE-CAV, 2014**

Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Ant

*Referências adicionais : Brasil/Português.*

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 25/11/2017 às 15:07:36