



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Amanda Gabriela Felix Monteiro

**Filogenia de espécies do grupo *willistoni* de
Drosophila (Diptera, Drosophilidae) baseada em
genes do Elemento F de Müller**

Vitória de Santo Antão
Janeiro, 2014

Amanda Gabriela Felix Monteiro

**Filogenia de espécies do grupo *willistoni* de
Drosophila (Diptera, Drosophilidae) baseada em
genes do Elemento F de Müller**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

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

Coorientador: **Prof. Dr. Martín Alejandro Montes - UFRPE**

Vitória de Santo Antão

Janeiro, 2014

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lígia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

M771f Monteiro, Amanda Gabriela Felix.

Filogenia de espécies do grupo willistoni de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) baseada em genes do Elemento F de Müller. / Amanda Gabriela Felix Monteiro. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2014.

xiv, 41 folhas: il.; tab.

Orientador: Claudia Rohde.

Coorientador: Martín Alejandro Montes.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Dípteros. 2. Filogenia. 3. Especiação Genética. I. Rohde, Claudia (Orientador). II. Montes, Martín Alejandro (Coorientador). III. Título.

576.58 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-006/2014

Dissertação de Mestrado apresentada por **Amanda Gabriela Felix Monteiro** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**Filogenia De Espécies Do Grupo *Willistoni* De *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) Baseada Em Genes Do Elemento F De Müller**”, orientada pela Prof.^a Dr.^a Claudia Rohde, aprovada no dia 09 de janeiro de 2014 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr.^a Mônica Lucia Adam
Núcleo de Educação Física/CAV-UFPE

Dr.^a Ana Lisa Gomes
Núcleo de Enfermagem/CAV-UFPE

Dr.^a Norma Machado da Silva
Deptº de Biologia/UFSC

Autor

Amanda Gabriela Felix Monteiro

À minha avó Aquilina de Amorim Silva (*in memoriam*).
“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha
fortaleza, e nele confiarei”.
“Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio. No Altíssimo fizeste
a tua habitação”. (Salmo 91; 2 e 9)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Obrigada senhor, por ter me proporcionado mais esta vitória em minha vida. Sem a tua presença, Deus, nada tem valor nem sentido.

À minha amada família, ao meu pai Osvaldo, a minha mãe Sandra, a minha irmã Alexandra, ao meu sobrinho Thomaz Filho e ao meu cunhado Thomaz, os quais amo muito. Agradeço todo carinho, paciência e incentivo. Pois sei como é grande o orgulho que sentem de mim! Quero sempre poder corresponder com as expectativas de todos vocês. Dedico principalmente aos meus pais, pois sei todo o sacrifício que sempre fizeram para me ver crescer como pessoa e profissional. Um dia espero poder retribuir tudo. Amo vocês com toda minha alma!

Ao meu namorado, noivo e agora esposo, Andrieverson, por toda paciência e apoio em todos os momentos que passei durante toda minha vida acadêmica e nesta grande etapa. E também pelos puxões de orelha, quando foi preciso... Desculpa-me todo este tempo que pouco me dediquei a você e apesar de tudo você sempre se preocupou comigo e cuidou de mim, obrigado amor!

Ao meu amado, esperado e lindo bebezinho, Allana, que está me dando força para concluir esta etapa na minha vida. Minha princesa linda, você é o maior presente que Deus já me deu. E farei sempre o meu melhor como profissional para lhe proporcionar sempre tudo de melhor que existir. Já te amo incondicionalmente, mesmo sem te ver, sem te tocar, mas te sinto crescer a cada dia dentro de mim...

À minha Orientadora Dra. Claudia Rohde por toda confiança que sempre teve em mim, pelos ensinamentos, incentivo, paciência. Mesmo você passando parte do meu mestrado em outro país, sempre se preocupou comigo e com o andamento do meu trabalho. Enfim, todos os momentos bons e ruins que passei serviram para meu crescimento. Agradeço por tudo, por ter me aceito no laboratório há seis anos e o mesmo se repetiu no mestrado. Trabalhar com *Drosophila* é o que sei fazer e o que gosto de fazer. Serei sempre grata por tudo!

Ao meu Coorientador Dr. Martin Montes, que é um profissional muito competente no que faz. E foi sempre fundamental para meu aprendizado durante esta etapa da minha vida acadêmica. Obrigada por todo incentivo e por ter acreditado em mim. Você, Claudia e Ana são exemplos de profissional que levarei sempre em minha vida.

À Dra. Ana Lauer que colaborou continuamente com meu trabalho e sempre se preocupou com o andamento deste, mesmo estando sempre tão ocupada com sua princesinha linda Mariana. Obrigada por todas as ajudas e dicas durante essa longa caminhada que percorri no Laboratório de Genética. Meu carinho por você será eterno, pois você foi responsável pelo meu início no caminho da ciência.

À doutoranda Zilpa das Graças, que me ensinou a caminhada no mundo da biologia molecular. Mesmo grávida sempre arrumou tempo para me ajudar, “oh mulé” obrigada por tudo! Suas risadas e palavras positivas nos momentos em que estava para baixo, foram fundamentais para que eu suportasse as dificuldades. Se Deus permitir também lhe ajudarei na sua caminhada no doutorado.

A todos meus colegas de Laboratório de Genética – CAV que sempre torceram por mim e me deram força, quando no final da noite já não suportava mais o cansaço. Principalmente as ICs Paloma e Cleciana que ajudaram na minha pesquisa.

À minha amiga e sempre companheira Gleyse Áudria, que sempre esteve comigo em todos os momentos, tanto na graduação, iniciação científica, agora no mestrado e na minha vida pessoal. Deus sempre uniu nossos caminhos. Acredito que tudo tenha um objetivo. E sem sua presença e palavras para me apoiar seria bem mais difícil ter passado por algumas barreiras. Com você aprendi a escutar a oração do Padre Marcelo Rossi e do Padre Reginaldo Manzotti. Foram muitos PCR e extração feitos, ouvindo palavras abençoadas. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida, minha amiga. Nos momentos felizes e de tristeza tivemos uma a outra para nos apoiar.

A todos os meus amigos por toda a força e apoio moral que me deram, ajudando-me a ser mais forte quando precisei.

Deus obrigada! Tu só nos dá aquilo que podemos concluir!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo Geral	2
1.2.2. Objetivos Específicos	2
1.3 Revisão da Literatura	3
1.3.1 Família Drosophilidae	3
1.3.2 <i>Drosophila</i> e subgênero <i>Sophophora</i>	4
1.3.3 Grupo e subgrupo <i>willistoni</i>	5
1.3.4 Distribuição geográfica	7
1.3.5 Identificação das espécies	9
1.3.6 Estudos de filogenia entre espécies do grupo <i>willistoni</i>	9
1.3.7 Elementos cromossômicos	11
1.3.8 Estudos com o Elemento Cromossômico F	13
CAPÍTULO 2	15
Filogenia do subgrupo <i>willistoni</i> de <i>Drosophila</i> baseada em genes do Elemento F de Müller (“dot”)	
2.1 Introdução	16
2.2 Material e Métodos	17
2.3 Resultados e Discussão	21
2.4 Conclusões	33
2.5 Referências	34
CAPÍTULO 3	37
3.1 Discussão Geral e Conclusões	37
3.2 Referências	38
3.3 Anexo	xiii

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** 3
Esquema indicando parte da classificação taxonômica da família Drosophilidae e a inserção das espécies estudadas neste trabalho.
- Figura 2.** 8
Mapa das Américas onde estão representadas (linhas e símbolos coloridos) as áreas de distribuição geográfica de cada uma das seis espécies do subgrupo *willistoni* (GARCIA, 2006).
- Figura 3.** 12
Elementos cromossômicos ancestrais de drosofilídeos sugeridos por Müller (1940) e nomeados pelas letras de A à F.
- Figura 4.** 13
Fusão do Elemento F de Müller ao Elemento E, ocorrida em *D. willistoni*. Fonte: Flybase, 2010.

Artigo

- Figura 1.** 23
Relação filogenética de cinco espécies do grupo *willistoni* (*Drosophila nebulosa*, *Dneb*; *D. willistoni*, *Dwil*; *D. tropicalis*; *D. equinoxialis*, *Dequ*; *D. paulistorum*, *Dpau*) e uma espécie do grupo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *Dmel*) considerada como grupo externo. A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining e modelo de distância Tamura-Ney, baseada no alinhamento de sequência de 838 pares de base do gene **PlexinB**. Os valores de *Bootstrap* são mostrados nos nódulos com um suporte de 90%, com 1.000 réplicas. Os dados das sequências do gene *PlexinB* das linhagens *Dwil* GK 13667 e *Dmel* NM_001258471.2 foram obtidos diretamente do *GenBank* (dados públicos dos genomas sequenciados das espécies).
- Figura 2.** 24
Relação filogenética de cinco espécies do grupo *willistoni* (*Drosophila nebulosa*, *Dneb*; *D. willistoni*, *Dwil*; *D. tropicalis*; *D. equinoxialis*, *Dequ*; *D. paulistorum*, *Dpau*) e uma espécie do grupo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *Dmel*) considerada como grupo externo. A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining e modelo de distância Tamura-Ney, baseada no alinhamento de sequência de 725 pares de base do gene **Ankyrin**. Os valores de *Bootstrap* são mostrados nos nódulos com um suporte de 90%, com 1.000 réplicas. Os dados de sequência do gene *PlexinB* da linhagem *Dwil* GK 13667 e *Dmel* NM_001169348.2 foram obtidos diretamente do *GenBank* (dados públicos dos genomas sequenciados das espécies).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** 4
Apresentação dos oito subgêneros que compõem o gênero *Drosophila*, com seu respectivo número de espécies indicado entre parênteses (BÄCHLI, 2013).
- Tabela 2.** 6
Espécies do grupo *willistoni* (incluindo as semiespécies de *D. paulistorum*) investigadas neste estudo, em ordem cronológica de descrição.
- Tabela 3.** 13
Elementos cromossômicos ancestrais sugeridos por MULLER (1940) e sua provável correspondência com os cromossomos de *Drosophila melanogaster* e *D. willistoni*.
- Artigo**
- Tabela 1.** 18
Descrição das amostras de *Drosophila* investigadas para a variabilidade dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*. A origem geográfica das populações indica o local original de coleta, cidade/estado e país. Em alguns casos, está indicado (entre parênteses) o código de registro no *stock center* ou o código de acesso no banco de dados *GenBank*.
- Tabela 2.** 27
Polimorfismo dos nucleotídeos A, T, C, G do fragmento de 838 pares de bases (pb) do gene ***PlexinB***, de cinco semiespécies de *Drosophila paulistorum* (*Dpau*): Amazônica (AM); Centro-Americana (CA); Interior (IN); Orinocana (OR); Transicional (TR); *Drosophila willistoni* (*Dwil*); *D. equinoxialis* (*Dequ*); *D. tropicalis* (*Dtro*); *D. nebulosa* (*Dneb*); *D. melanogaster* (*Dmel*). O número das posições se refere ao alinhamento feito entre as cinco espécies do grupo *willistoni* estudadas (sem *primers* e sem *D. melanogaster*). As substituições se referem às consequências dos polimorfismos nas amostras: substituição silenciosa (S) ou substituição de aminoácido (R, *replacement*). Letras vermelhas e azuis destacam as mudanças em relação à sequência consenso da maioria.
- Tabela 3.** 30
Polimorfismo dos nucleotídeos A, T, C, G do fragmento de 732 pares de bases (pb) do gene ***Ankyrin***, de cinco semiespécies de *Drosophila paulistorum* (*Dpau*): Amazônica (AM); Centro-Americana (CA); Interior (IN); Orinocana (OR); Transicional (TR); *Drosophila willistoni* (*Dwil*); *D. equinoxialis* (*Dequ*); *D. tropicalis* (*Dtro*); *D. nebulosa* (*Dneb*); *D. melanogaster* (*Dmel*). O número das posições se refere ao alinhamento feito entre as cinco espécies do grupo *willistoni* estudadas (sem *primers* e sem *D. melanogaster*). As substituições se referem às consequências dos polimorfismos nas amostras, que podem ser do tipo mutação silenciosas (S) ou substituição de aminoácido (R, *replacement*). Letras vermelhas e azuis destacam as mudanças em relação à sequência consenso da maioria.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>D.</i>	-	<i>Drosophila</i>
μL	-	Microlitro
mL	-	Mililitro
mg	-	Miligramas
$^{\circ}\text{C}$	-	Graus centígrados
min	-	Minutos
seg	-	Segundos
rpm	-	Rotações por minuto
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
MgCl_2	-	Cloreto de Magnésio
dNTPs	-	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (A, T, C, G)
PA	-	Pará
PE	-	Pernambuco
PI	-	Piauí
BA	-	Bahia
CE	-	Ceará
RO	-	Rondônia

RESUMO

A família Drosophilidae abriga mais de 4.200 espécies de pequenas moscas, sendo considerada uma das maiores da ordem Diptera, com destaque para o grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*, composto por 23 espécies. Nos estudos ecológicos realizados recentemente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética da UFPE/CAV, destacam-se as espécies crípticas *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* e a espécie não críptica *Drosophila nebulosa*. Merece destaque o fato de *D. paulistorum* ser constituída de seis semiespécies (Andino-Brasileira, Amazônica, Centro-Americana, Interior, Orinocana e Transicional) o que ilustra os diversos níveis de especiação que existem dentro do grupo, e sua importância para estudos evolutivos. Foi objetivo deste trabalho investigar a variabilidade genética dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*, presentes no elemento cromossômico F de Müller. Este cromossomo recombinante é resultante da fusão entre o cromossomo *dot* ancestral da família Drosophilidae (Elemento F) e cromossomo III (Elemento E), evento que ocorreu em todas as espécies do grupo *willistoni*. De posse dos dados de sequenciamento foram estabelecidas as relações filogenéticas entre as espécies e também entre as semiespécies de *D. paulistorum*. Fizeram parte dos estudos 28 amostras, coletadas recentemente nos biomas Floresta Amazônicas (Pará e Rondônia), Floresta Atlântica (Pernambuco) e Caatinga (Pernambuco, Ceará e Bahia), ou linhagens de *stock centers*. O gene *PlexinB* se destacou como o mais conservado dentro das espécies, enquanto *Ankyrin* foi bastante variável. Foi detectada uma deleção de 9 pares de bases em todas amostras de *D. willistoni* e outra de 3 pb em todas *D. equinoxialis*. Tanto *PlexinB* quanto *Ankyrin* permitiram a construção de um bem fundamentado fenograma, com maior similaridade genética entre as amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, depois com *D. willistoni* ou *D. tropicalis*, e então com *D. nebulosa*. A maior diversidade foi observada dentro da superespécie *D. paulistorum*. Estes resultados abrem novas perspectivas para o estudo e entendimento da dinâmica da especiação, dentro do grupo *willistoni* de *Drosophila*.

Palavras-Chave: *PlexinB*, *Ankyrin*, espécies crípticas, *D. willistoni*, populações naturais.

ABSTRACT

The *Drosophila* family is formed by more than 4,200 species of small flies. It is one of the largest families of the order Diptera, and the *willistoni* group, *Drosophila* genus, stands out with more than 23 species. In recent studies, our research group observed the prevalence of the cryptic species *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* and *D. equinoxialis* and the non-cryptic species *D. nebulosa*. Interestingly, *D. paulistorum* is composed by six semispecies (Andean-Brazilian, Amazonian, Centro-American, Interior, Orinocan, and Transitional), which illustrates the several speciation levels within the group and its importance in evolutionary studies. This study investigates the genetic variability of the genes *PlexinB* and *Ankyrin*, presents in Müller's F chromosomal element. This recombinant chromosome resulted from the fusion between the ancestral *dot* element of the Drosophilidae family (F element) and chromosome III (E element) an event recorded for all *willistoni* group species. Sequence data were used to establish the phylogenetic relationships between species and between the *D. paulistorum* semispecies. Twenty-eight samples recently collected in the biomes Amazon Forest (Pará and Rondônia states), Atlantic Forest (Pernambuco) and Caatinga (Pernambuco, Ceará and Bahia) or from stock centers were used. *PlexinB* stood out as the most conserved across species, while *Ankyrin* was highly variable. A 9 base pair deletion in *Ankyrin* gene was detected only in *D. willistoni* samples, and another 3 bp deletion was recorded only in *D. equinoxialis*. Both *PlexinB* and *Ankyrin* allowed building a well-established phenogram for *willistoni* group, which revealed higher genetic similarity between *D. paulistorum* and *D. equinoxialis*, then to *D. willistoni* or *D. tropicalis*, and then to *D. nebulosa*. The highest diversity was observed into the *D. paulistorum* super species. These results open new perspectives for the study and understanding of speciation dynamics in the *willistoni* group of *Drosophila*.

Keywords: *PlexinB*, *Ankyrin*, cryptic species, *D. willistoni*, natural populations.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

A família Drosophilidae compreende os organismos conhecidos vulgarmente como “moscas das frutas”, as quais são utilizadas como modelos biológicos para diversas investigações ecológicas, genéticas e evolutivas desde o início do século XX. O gênero *Drosophila* abriga o maior número de espécies dentro desta família, possuindo 1.177 espécies descritas, distribuídas em grupos e subgrupos. Este gênero sofreu reorganizações cariotípicas, como alterações no número cromossômico fundamental, modificações da morfologia e no conteúdo gênico dos elementos cromossômicos, reorganizados, principalmente, através de eventos do tipo inversões paracêntricas.

Dentro do gênero *Drosophila* destaca-se o subgênero *Sophophora* que abriga, entre outros, o grupo *willistoni*. Este grupo é composto por 23 espécies, distribuídas nos subgrupos *willistoni*, *alagitans* e *bocainensis*, com grande dispersão geográfica na região neotropical, desde a Flórida/EUA até o Uruguai e Norte da Argentina. O subgrupo *willistoni* está formado por seis espécies crípticas, com destaque para *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. tropicalis* e *D. equinoxialis* por serem geograficamente bastante distribuídas e por apresentarem muitas áreas de simpatria. As outras duas espécies, *D. insularis* e *D. pavlovskiana*, apresentam distribuição endêmica nas Pequenas Antilhas e na Guiana, respectivamente. Para a determinação da identidade destas espécies crípticas, caracterizadas pela alta semelhança morfológica que apresentam entre si, é necessária a análise da terminália dos machos adultos, cuja forma e estrutura são diferenciadas entre as espécies.

Do ponto de vista ecológico, a espécie *D. willistoni* pode ser encontrada em diversos ecossistemas, preferindo sempre as matas quentes e úmidas, onde costuma ser a espécie mais abundante. No estado de Pernambuco, por exemplo, tem sido coletada na Floresta Atlântica e nos Brejos de Altitude, do interior do estado. Entretanto, também já foi coletada nos Manguezais e na Caatinga, conforme dados recentes do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética da UFPE/CAV .

Baseando-se nos trabalhos já realizados com as espécies do grupo *willistoni* percebe-se uma grande carência de estudos sobre as relações filogenéticas entre as espécies e também sobre a quantidade e os padrões de diversidade de nucleotídeos de diferentes genes, especialmente entre amostras de diferentes populações naturais.

Neste trabalho apresentamos como **Revisão de Literatura**, resultados de trabalhos que utilizaram dados moleculares no estudo de espécies do grupo e subgrupo *willistoni*. O **Capítulo 2** mostra os resultados da análise dos dois genes escolhidos, *PlexinB* e *Ankyrin*, que permitiram estabelecer uma filogenia de cinco espécies do grupo *willistoni*, de diversas amostras de populações recentemente coletadas em diferentes regiões do Brasil. O conjunto dos resultados indica que os genes do elemento *dot* ancestral da família *Drosophila* aqui estudados são excelentes marcadores moleculares, capazes de diferenciar as espécies e mostrar o quanto cada uma delas é diversa através de suas populações naturais estudadas.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Estudar as relações filogenéticas entre as espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* de diferentes biomas brasileiros, reconhecendo e aprofundando estudos moleculares de genes do elemento F de Müller.

1.2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies e populações do grupo *willistoni* com base nos dados moleculares dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*;
- Analisar a variabilidade de nucleotídeos únicos (SNPs) dentro das espécies.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1. Família Drosophilidae

A família Drosophilidae (Insecta, Diptera) teve sua origem em regiões tropicais há aproximadamente 50-60 milhões de anos (THROCKMORTON, 1975). Suas espécies, conhecidas usualmente como “moscas das frutas”, são amplamente distribuídas pelo mundo, sendo encontradas desde regiões equatoriais até temperadas. São bastante diversificadas e a literatura relata a presença de pelo menos 4.216 espécies, distribuídas em 78 gêneros e duas subfamílias: *Steganinae* e *Drosophilinae* (BÄCHLI, 2013).

Diversas espécies de drosofilídeos têm se constituído em organismos-modelo ideais para os mais diferentes estudos evolutivos (MARKOW, O’GRADY, 2007). No estudo taxonômico de Drosophilidae, Grimaldi (1990) postulou a monofilia desta família. Entretanto, este resultado não tem sido compartilhado por outros autores, como Ramsen & O’Grady (2002), que realizaram um amplo estudo molecular de 41 taxa da família Drosophilidae. Os autores demonstraram monofilia para alguns dos subgêneros da família, como o subgênero *Sophophora*, e parafilia para outro subgênero importante, o *Drosophila*. Estes dois subgêneros pertencem ao gênero *Drosophila* (Figura 1). De acordo com Ramsen & O’Grady (2002), o gênero *Drosophila* também é parafilético, a partir dos dados moleculares apresentados.

Pela importância do gênero *Drosophila*, que sozinho abriga quase um terço de todas as espécies conhecidas da família Drosophilidae, Ramsen & O’Grady (2002) ainda salientam a importância da realização dos estudos focados neste gênero, incluindo revisões taxonômicas, a fim de melhor entender a história evolutiva deste grupo.

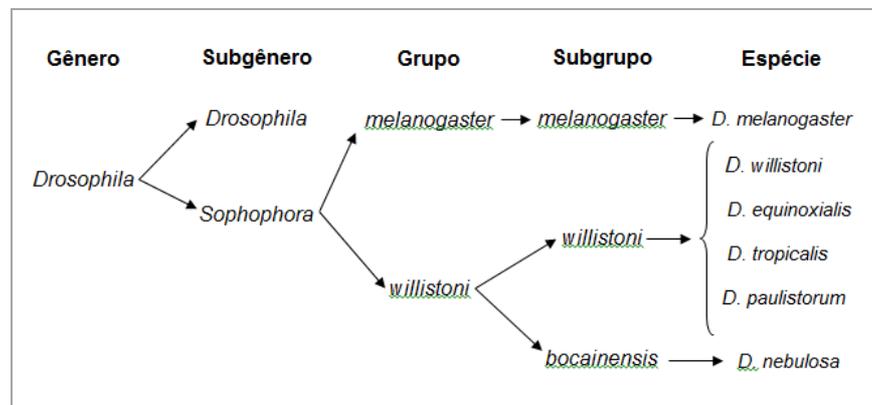


Figura 1. Esquema indicando parte da classificação taxonômica da família Drosophilidae e a inserção das espécies estudadas neste trabalho.

1.3.2. *Drosophila* e subgênero *Sophophora*

Dentro da família Drosophilidae o gênero *Drosophila* é composto por oito subgêneros, conforme descrição apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Apresentação dos oito subgêneros que compõem o gênero *Drosophila*, com seu respectivo número de espécies indicado entre parênteses (BÄCHLI, 2013).

Subgêneros do gênero <i>Drosophila</i>	Número de espécies
<i>Chusqueophila</i>	1
<i>Dorsilopha</i>	4
<i>Drosophila</i>	751
<i>Dudaica</i>	2
<i>Phloridosa</i>	7
<i>Psilodorha</i>	2
<i>Siphlodora</i>	2
<i>Sophophora</i>	335

Conforme Bächli (2013), 74 espécies não estão situadas em nenhum subgênero.

Segundo Grimaldi (1990), com base em caracteres ecológicos e morfológicos, o gênero *Drosophila* é monofilético e composto por diversos outros gêneros irmãos, tais como *Zaprionus*, *Samoaia* e *Liodrosophila*. O estudo de Throckmorton (1975) e diversos outros estudos moleculares têm restaurado a parafilia do gênero *Drosophila*, sugerindo que este gênero é, atualmente, um agrupamento artificial.

O gênero *Drosophila* possui 1.177 espécies descritas (BÄCHLI, 2013), subdivididas em oito subgêneros, sendo os subgêneros *Sophophora* e *Drosophila* os mais diversos. Acredita-se que o subgênero *Drosophila* originou-se nos trópicos do Velho Mundo a aproximadamente 40 milhões de anos, após divergir do subgênero *Sophophora* e se expandir para o Novo Mundo (THROCKMORTON, 1975; RUSSO et al., 1995). Já Tamura et al. (2004), a partir da correção de distâncias sinônimas, utilizando dados moleculares de diversos genes, sugerem que *Sophophora* e *Drosophila* divergiram há 63 milhões de anos.

Foi Sturtevant (1935) quem instituiu o subgênero *Sophophora*, o qual é formado, atualmente, por 335 espécies, e é subdividido em nove grupos (BÄCHLI, 2013). Dentre estes, destacamos o grupo *willistoni* (composto por 23 espécies), o grupo *saltans* (composto por 21 espécies) e o grupo *melanogaster* (formado por 186 espécies) (BÄCHLI, 2013). Apesar de haverem inúmeras pesquisas que se dedicam a classificar as espécies dentro de grupos e subgrupos, ainda são poucos aqueles que estudam as espécies sob o ponto de vista molecular, cujos dados são capazes de enriquecer as análises filogenéticas. Mais adiante estas investigações serão melhor abordadas para as espécies do grupo *willistoni*.

Throckmorton (1975) defendeu a hipótese que a radiação do subgênero *Drosophila* teve sua origem em níveis inferiores de ancestralidade em relação aos ancestrais da radiação *Sophophora*. Baseando-se nos estudos de Throckmorton (1962, 1975), o grupo *saltans* e o grupo *willistoni* são produtos de uma única linhagem *Sophophora*. Eles são distintos de todos os outros grupos *Sophophora*, mas muito próximos um do outro, sendo considerados clados-irmãos (O'GRADY, KIDWELL, 1998; REMSEN, O'GRADY, 2002).

1.3.3. Grupo e subgrupo *willistoni*

Entre as décadas de 40 e 50 o geneticista e evolucionista Theodosius Dobzhansky se dedicou a estudar a evolução de espécies neotropicais, e como organismo modelo ele escolheu as espécies de drosófila do grupo *willistoni*, já conhecidas como um grupo composto por diversos níveis de especiação (espécies crípticas, semiespécies e subespécies) (EHRMAN, POWELL, 1982).

O grupo *willistoni* possui 23 espécies, as quais se distribuem em três subgrupos: *alagitans* (cinco espécies), *bocainensis* (12 espécies) e *willistoni* (seis espécies). Pavan (1952) descreveu o subgrupo *willistoni* como composto por espécies crípticas: *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana* (EHRMAN, POWELL, 1982). Segundo Mayr (1963) o termo *espécies crípticas* se refere a “populações naturais morfológicamente idênticas ou muito semelhantes, mas reprodutivamente isoladas”. O interesse teórico por espécies crípticas reside no fato de elas atestarem a possibilidade da existência de isolamento reprodutivo entre espécies sem que seja acompanhado, obrigatoriamente, de mudanças morfológicas; ou que diferenças fisiológicas entre espécies possam estar presentes em indivíduos que são morfológicamente muito semelhantes (crípticos). Dobzhansky (1970) reforçou também este conceito, salientando que “as espécies são fenômenos da natureza que existem independentemente da nossa capacidade para distingui-las”.

Além de serem abundantes na natureza, quatro das espécies crípticas do grupo *willistoni* (*Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*) ocupam em simpatria vastas áreas geográficas neotropicais (SPASSKY et al., 1971) e este é, com certeza, um grande empecilho aos estudos ecológicos de identificação da distribuição das espécies (GARCIA et al., 2006), já que em uma mesma amostragem podem ser coletas as quatro espécies. Soma-se a isso o fato de que *Drosophila paulistorum* é, na verdade, uma superespécie composta de seis semiespécies: Amazônica, Andino-Brasileira, Centro-Americana, Interior, Orinocana e Transicional (DOBZHANSKY, SPASSKY, 1959). Linhagens de diferentes semiespécies de *D. paulistorum* cruzam com muita dificuldade e quando os raros híbridos são produzidos, as fêmeas são férteis e os machos são estéreis (EHRMAN & POWELL, 1982). Entre as espécies do subgrupo *bocainensis*, destacam-se a *Drosophila fumipennis*, *D. sucinea* e *D. nebulosa* como as mais conhecidas e estudadas. A **Tabela 2** mostra as espécies pertencentes ao grupo *willistoni*, que fizeram parte deste estudo, e os trabalhos que as descreveram.

Tabela 2. Espécies do grupo *willistoni* (incluindo as semiespécies de *D. paulistorum*) investigadas neste estudo, em ordem cronológica de descrição.

Espécies	Subgrupo	Descrição
<i>Drosophila nebulosa</i>	<i>bocainensis</i>	STURTEVANT (1916)
<i>Drosophila willistoni</i>	<i>willistoni</i>	STURTEVANT (1921)
<i>Drosophila equinoxialis</i>	<i>willistoni</i>	DOBZHANSKY (1946)
<i>Drosophila tropicalis</i>	<i>willistoni</i>	BURLA et al. (1949)
<i>Drosophila paulistorum</i>	<i>willistoni</i>	BURLA et al. (1949)
semiespécie Andino-Brasileira		DOBZHANSKY, SPASSKY (1959)
semiespécie Orinocana		DOBZHANSKY, SPASSKY (1959)
semiespécie Transicional		DOBZHANSKY, SPASSKY (1959)
semiespécie Amazônica		DOBZHANSKY SPASSKY (1959)
semiespécie Centro-Americana		DOBZHANSKY, SPASSKY (1959)
semiespécie Interior		PÉREZ-SALAS et al. (1970)

1.3.4. Distribuição geográfica

Drosophila willistoni é a espécie de maior distribuição geográfica dentro do grupo *willistoni*, ocorrendo desde a Flórida/EUA e México, até o norte da Argentina (SPASSKY et al., 1971; DOBZHANSKY, POWELL, 1975), sendo talvez a espécie com maior abundância (número de indivíduos proporcionalmente aos demais) em toda região equatorial, na Bolívia, no sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina (GARCIA, 2006).

Todas as espécies do subgrupo *willistoni* possuem distribuição geográfica inserida dentro da área que a *D. willistoni* abrange (**Figura 2**). A superespécie *D. paulistorum* e suas várias semiespécies, se distribuem por uma ampla área geográfica que vai desde Tikal, na Guatemala, até o Rio Grande do Sul, no sul do Brasil (SPASSKY et al., 1971; DOBZHANSKY, POWELL, 1975; SANTOS, VALENTE, 1990, GARCIA et al., 2008). Já *D. equinoxialis* estende-se das Grandes Antilhas e sul do México, até o centro e nordeste do Brasil (SPASSKY et al., 1971; DOBZHANSKY, POWELL, 1975; ROHDE et al., 2010). Para *D. tropicalis*, a ocorrência vai desde Tikal, Guatemala, Grandes Antilhas, Santa Cruz de La Sierra, na Bolívia, até Palmas, no Tocantins, que é seu limite sul de distribuição (SPASSKY et al., 1971; DOBZHANSKY, POWELL, 1975; EHRMAN, POWELL, 1982). *Drosophila nebulosa*, espécie que pertence ao grupo *bocainensis*, também tem uma ampla distribuição neotropical, que vai da América do Norte-Estados Unidos (Texas e Nebraska), México e países da América Central, até o Peru, todo Brasil e a cidade de Tandil, na Argentina (DA CUNHA et al., 1953, EHRMAN, POWELL, 1982, MONTES et al., 2011).



Figura 2. Mapa das Américas onde estão representadas (linhas e símbolos coloridos) as áreas de distribuição geográfica de cada uma das seis espécies do subgrupo *willistoni* (GARCIA, 2006).

1.3.5. Identificação das espécies

Várias técnicas têm sido propostas para a identificação das espécies do subgrupo *willistoni*, tais como cruzamentos direcionados com linhagens já conhecidas (EHRMAN, POWELL, 1982; CORDEIRO, WINGE, 1995), análise dos cromossomos politênicos (ROHDE et al., 2006), frequência do batimento das asas dos machos durante a corte sexual (GLEASON et al., 1998), migração eletroforética da enzima Fosfatase ácida-1 (*Acph-1*) (GARCIA et al., 2006) e a análise detalhada da genitália externa dos machos (MALOGOLOWKIN, 1952; SPASSKY, 1957; ROHDE et al., 2010), a mais utilizada para identificação.

Do ponto de vista molecular algumas tentativas têm sido feitas, mais recentemente, a fim de estabelecer marcadores moleculares confiáveis, capazes de identificar cada uma das espécies crípticas, e também diferenciar as semiespécies de *D. paulistorum*. Avançam os estudos de caracterização do gene mitocondrial *citocromo oxidase I (COI)* (MÜLLER et al., 2012, 2013), espécie-específico para o grupo críptico. Entretanto, *COI* não parece ser capaz de diferenciar as semiespécies de *D. paulistorum* entre si (W. Miller e colaboradores, comunicação pessoal) e este grupo ainda é um grande desafio. Aliado a isso, cabe destacar a carência de estudos sobre a variabilidade dos genes “dentro” das espécies, ou seja, entre populações naturais da mesma espécie. Nos relatos da literatura, feitas para o subgrupo *willistoni*, muito frequentemente são analisadas amostras de DNA de estoques vivos mantidos há anos ou décadas em laboratório, e que, portanto, têm sua variabilidade reduzida pelas condições intrínsecas de endocruzamentos a que são submetidas. Outras vezes, as amostras de sequência de nucleotídeos de determinados genes, como *Álcool desidrogenase (Adh)*, *period (per)* e *COI* provêm de estudos de sequenciamento já publicado nos bancos de dados públicos (NCBI ou FLYBASE) e que são, portanto, oriundos de estoques já conhecidos e previamente estudados. A coleta e inclusão de novas amostras de populações das espécies crípticas do grupo *willistoni* tem sido uma preocupação constante do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética da UFPE/CAV, que desenvolveu projetos na área da ecologia de drosofilídeos a fim de contribuir para obtenção de novas amostras das espécies (SILVA, 2010; OLIVEIRA, 2011; CABRAL, 2010; MONTEIRO, 2012; NASCIMENTO, 2013).

1.3.6. Estudos de filogenia entre espécies do grupo *willistoni*

As filogenias são representações gráficas ou textuais que refletem a história evolutiva de um grupo (MIYAKI et al., 2001), expressando as relações de ancestralidade dos grupos considerados. Spassky et al. (1971) descreveram as relações evolutivas entre as espécies crípticas do grupo *willistoni* baseados em evidências genéticas, citogenéticas, bioquímicas e biogeográficas e no grau de isolamento reprodutivo conhecidos até então, e mostrando os resultados de agrupamento em diagramas. Ayala et al. (1974) construíram um dendograma baseado na diferenciação genética em 36 loci de alozimas. Estes dois trabalhos apresentaram os primeiros dados a respeito da filogenia entre as espécies crípticas do grupo *willistoni*, embora sem suporte estatístico para as suas inferências.

Anos mais tarde, Gleason et al. (1998) analisaram as sequências de dois genes nucleares, *Adh* e *per*, e do gene mitocondrial *COI*. Os autores mostraram como resultado que *Drosophila insularis* está situada na base da filogenia do subgrupo *willistoni* acompanhada de *D. tropicalis* e *D. willistoni*, que se agruparam à *D. equinoxialis* e à *D. paulistorum*. Um pouco depois, Tarrío et al. (2000) estudaram um outro gene nuclear, a *Xantina desidrogenase (Xdh)*, e obtiveram o mesmo resultado que Gleason et al. (1998). Já as pesquisas de O'Grady & Kidwell (2002) feitas para os genes *Adh* e *citocromo oxidase subunidade II (COII)*, suportam a ideia de que *D. equinoxialis* é a espécie posicionada na base da filogenia, enquanto *D. insularis* é a espécie que agrupa com *D. willistoni* e *D. tropicalis*, as quais formam um clado, que por sua vez agrupam com *D. paulistorum* e *D. pavlovskiana*, que formam outro clado. Rohde et al. (2006) estudaram os padrões de faixas cromossômicas (bandas) de um dos cromossomos politênicos, o cromossomo IIR, e estimaram as relações evolutivas entre diferentes espécies crípticas, com base no maior ou menor compartilhamento de rearranjos fixados e/ou segregantes (inversões paracêntricas). Os resultados indicaram que *D. willistoni* diverge das demais espécies assim como *D. tropicalis*; que *D. equinoxialis* e *D. paulistorum* possuem padrões mais próximos; e que *D. insularis* é a espécie mais divergente dentro do subgrupo *willistoni*.

Tratando-se do subgrupo *bocainensis* a espécie *Drosophila nebulosa* tem sido a mais estudada entre as espécies não crípticas do grupo *willistoni*. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que incluem esta e outras espécies não crípticas em filogenias.

Se por um lado os trabalhos são concordantes quanto ao fato de que existem três grandes agrupamentos (um deles unindo *D. capricorni* e *D. sucinea*, outro unindo as seis espécies crípticas, e outro, mono específico, composto pela *D. nebulosa*) (TARRIO et al., 2000, O'GRADY, KIDWELL, 2002; POWELL et al., 2003) há diversas incongruências quando o tema são as relações filogenéticas “entre” os três grupos. Por exemplo, Tarrío et

al. (2000) relaciona *D. nebulosa* mais com as espécies crípticas do que com as demais espécies não crípticas estudadas (*D. fumipennis* e *D. sucinea*), enquanto que O'Grady & Kidwell (2002) agrupam *D. nebulosa* com o grupo *saltans* (considerado grupo-irmão do grupo *willistoni*); agrupam *D. fumipennis* com o clado *saltans-willistoni*; e agrupam o clado *D. capricorni/D. sucinea* como grupo-irmão das espécies crípticas (subgrupo *willistoni*). Por fim, Powell et al. (2003) descrevem *D. nebulosa* como uma espécie com posição variável, dependendo da abordagem filogenética, mas com maior chance dela ser espécie-irmã ao subgrupo *willistoni*. Mais recentemente, Robe et al. (2010) obtiveram um bom suporte apenas ao agrupamento *D. sucinea-D. capricorni*, enquanto *D. nebulosa/D. fumipennis* foi um agrupamento altamente instável. Todos estes relatos dão uma ideia das lacunas que ainda existem no estudo das espécies do grupo *willistoni*.

1.3.7. Elementos cromossômicos

Na área da citogenética, as espécies do grupo *willistoni* se destacam pela grande possibilidade de estudos genéticos e evolutivos dos seus cromossomos politênicos (revisão em POWELL, 1997). Estes cromossomos têm sido estudados desde sua descoberta na espécie *Drosophila 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. Painter demonstrou que as bandas destes cromossomos seguiam exatamente a sequência dos genes, conhecidos através da técnica de mapeamento genético de mutantes em *Drosophila* (LAKOVAARA, SAURA, 1972).

Os cromossomos politênicos são estruturas importantes que se formam em núcleos interfásicos, como resultado de sucessivos ciclos de replicação, sem a consequente separação das cromátides irmãs. Este fenômeno garante a politenização dos cromossomos, que se caracteriza pela presença de centenas de cópias de fitas de DNA, alinhadas. O fenômeno de politenização dos cromossomos resulta, portanto, no aumento do número de cópias dos genes e, conseqüentemente, na quantidade da síntese de proteínas necessárias para a fase larval do desenvolvimento da mosca, quando a alimentação e o crescimento são intensos (ASHBURNER, 1976).

Para cada espécie de *Drosophila*, o padrão de bandas dos cromossomos politênicos é único, sendo possível distinguir cada um dos diferentes cromossomos de acordo com a sequência das bandas e de regiões marcadoras típicas (ASHBURNER, 1976). Fotomapas são elaborados para cada cromossomo e espécie (como o da *Drosophila willistoni*,

elaborado e revisado por ROHDE, VALENTE 2012). Sequências variáveis da ordem das bandas podem ocorrer com frequências em determinadas espécies, fruto da ocorrência de inversões paracêntricas e pericêntricas.

De acordo com Müller (1940) e Patterson & Stone (1952), o número cromossômico ancestral da família Drosophilidae foi, provavelmente, constituído por cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos pontuais, com $2n=12$ ou $n=6$ (**Figura 3**). Müller definiu os cinco cromossomos acrocêntricos de Elementos A, B, C, D, e E, e o cromossomo pontual (*dot*) como Elemento F.

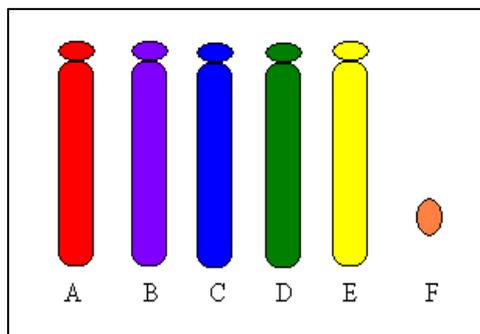


Figura 3. Elementos cromossômicos ancestrais de drosofilídeos sugeridos por Müller (1940) e nomeados pelas letras de A à F.

Müller (1940) e Patterson & Stone (1952) também sugeriram que a evolução cariotípica do gênero *Drosophila* ocorreu mediante fusões cêntricas dos elementos cromossômicos, dando origem aos cariótipos derivados das espécies atuais. Diversos permitiram estabelecer paralelismos nos estudos evolutivos e observar modificações nos distintos cariótipos das espécies de drosofilídeos. Por exemplo, o cariótipo da espécie *Drosophila melanogaster*, considerada como espécie-modelo na genética, é $2n=8$. Já a espécie *Drosophila willistoni*, de interesse neste trabalho, tem $2n=6$ (**Figura 3**).

Uma comparação das prováveis correspondências entre os elementos cromossômicos de Müller e o cariótipo destas duas espécies está apresentada na **Tabela 3**. Vale destacar que cada cromossomo, de cada espécie, pode receber uma descrição (nome ou número) diferenciado, de acordo com o autores que publicaram as descrições originais. Considerando a diversidade de espécies, que só no gênero *Drosophila* são mais mil, cada autor faz sua escolha e não há uma padronização estabelecida. Isso explica porque o cromossomo dois é descrito como 2R (R=braço direito) ou 2L (L=braço esquerdo) na espécie *D. melanogaster*, enquanto que é nomeado como IIR e IIL (em números romanos)

na espécie *D. willistoni* (**Tabela 3**). Os braços cromossômicos R e L são o testemunho da ocorrência de fusões cêntricas, que transformaram cromossomos acrocêntricos (ancestrais) em cromossomos metacêntricos (com dois braços), em certos casos. Para todas as espécies de drosófila os cromossomos metacêntricos são sempre acompanhados desta determinação, feita pelas letras R ou L.

Tabela 3. Elementos cromossômicos ancestrais sugeridos por Müller (1940) e sua provável correspondência com os cromossomos de *Drosophila melanogaster* e *D. willistoni*.

Elemento de Muller	Correspondência com os braços cromossômicos em <i>D. melanogaster</i>	Correspondência com os braços cromossômicos em <i>D. willistoni</i>
A	X	X
B	2L	IIR
C	2R	III
D	3L	XR
E	3R	III
F (dot)	4	III

Dobzhansky (1950) estudou os cromossomos politênicos de *Drosophila willistoni* e concluiu que são formados por dois pares de cromossomos metacêntricos, um par de cromossomo acrocêntricos e nenhum cromossomos pontuais (**Figura 4**).

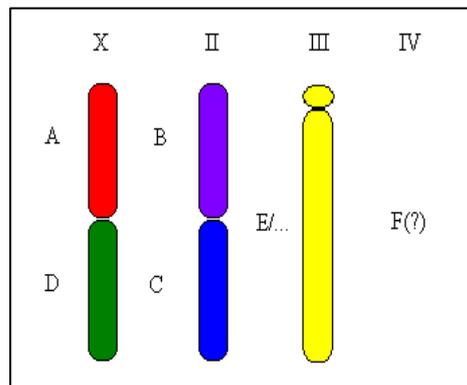


Figura 4. Fusão do Elemento F de Muller ao Elemento E, ocorrida em *D. willistoni*. Fonte: Flybase, 2010.

1.3.8. Estudos com o Elemento Cromossômico F

Estudos citogenéticos com a espécie *Drosophila willistoni* foram feitos por Dobzhansky (1950). Por muitas décadas não houve nenhuma descrição da presença do

elemento cromossômico F e essa ausência do cromossomo pontual no genoma de *D. willistoni* poderia ser interpretada como uma variante do antigo modelo de organização do cariótipo de *Drosophila*, correspondente a cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um único par de cromossomos pontuais (MÜLLER, 1940; PATTERSON, STONE, 1952). A maioria das espécies de *Drosophila* possui o cromossomo pontual livre, com exceção, por exemplo, das espécies do grupo *willistoni*, onde o *dot* se fusionou ao cromossomo III, que correspondente ao elemento E (fusão E+F).

A primeira evidência desta fusão veio do trabalho de Papaceit & Juan (1998), Os autores hibridizaram *in situ* três genes do *dot* (*Ankyrin*, *Cubitus interruptus* e *Eyeless*) sobre cromossomos politênicos da espécie *D. willistoni*, encontrando-os posicionados na base do cromossomo III e sugerindo a ocorrência de uma fusão cêntrica entre este cromossomo (elemento E) com o *dot* (elemento F). A partir daí, o cromossomo III passou a ser interpretado como resultante da fusão de dois cromossomos diferentes ancestrais (fusão E+F). Os mesmos resultados de localização *in situ*, na base do cromossomo III, foram encontrados por Powell et al. (2011) para *D. insularis*, que pertence ao grupo críptico da *D. willistoni*, e por Pita et al. (*em preparação*) para diversas outras espécies do grupo *willistoni*, como *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, e espécies não crípticas como *D. nebulosa*, *D. capricorni* e *D. fumipennis*. Assim, os genes presentes no elemento F destas espécies são fruto de um evento monofilético. Têm história evolutiva diferente dos seus ortólogos em espécies onde o cromossomo pontual permaneceu livre (como em *D. melanogaster*), ou na comparação com genes do próprio autossomo que hoje em dia os abriga, o cromossomo III.

Devido a falta de informações que ainda persiste sobre as relações filogenética das espécies do grupo *willistoni* e, especialmente, sobre o nível de variabilidade de nucleotídeos de genes nucleares cópia única em representantes de populações naturais, este trabalho se dedicou a estudar, do ponto de vista molecular, a variação encontrada nos os genes *PlexinB* (mais conservado) e *Ankyrin* (mais variável) dentre os quatro genes que conseguimos amplificar do elemento F. Cinco espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* foram escolhidos para este estudo e 25 diferentes amostras de populações.

CAPÍTULO 2

RESULTADOS

Artigo a ser submetido para revista

Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research

Filogenia do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* baseada em genes do Elemento F de Müller (“dot”)

Amanda Gabriela Felix Monteiro¹, Gleyse Áudria de França Nascimento²; Cleciana Maristela de Souza²; Paloma Silva²; Zilpa das Graças Silva de Melo²; Ana Cristina Lauer Garcia²; Martín Alejandro Montes³; Cláudia Rohde²

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); ²Laboratório de Genética, CAV-UFPE; ³Laboratório de Bioquímica Genética e Sequenciamento de DNA, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). E-mail: gabifm2@hotmail.com

Palavras chave: *PlexinB*, *Ankyrin*, espécies crípticas, *Drosophila willistoni*, populações naturais.

Abstract

The Drosophilidae family is formed by more than 4,200 species of small flies. It is one of the largest families of the order Diptera, and the *willistoni* group, from *Drosophila* genus, stands out with more than 23 species. In recent studies, our research group has collected the cryptic species *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* and *D. equinoxialis*, and the non-cryptic species *D. nebulosa*. This study investigates the genetic variability of the genes *PlexinB* and *Ankyrin*, present in Müller’s F chromosomal element. This recombinant chromosome resulted from the fusion between the ancestral *dot* element of the Drosophilidae family (F element) and chromosome III (E element) an event recorded for all *willistoni* group species. Sequence data were used to establish the phylogenetic relationships between species and their recently collected samples. Twenty-four samples collected in Brazil, in the biomes Amazon Forest (Pará and Rondônia states), Atlantic Forest (Pernambuco) and Caatinga (Pernambuco, Ceará and Bahia), as well as three other laboratory strains from stock centers were used. *PlexinB* stood out as the most conserved across species, while *Ankyrin* was highly variable. A 9 bp deletion in *Ankyrin* gene was detected only in *D. willistoni* samples, and another 3 bp deletion was recorded only in *D. equinoxialis*. Both *PlexinB* and *Ankyrin* allowed building a phylogenetic tree for *willistoni* subgroup, which revealed higher genetic similarity between *D.*

paulistorum and *D. equinoxialis*, then to *D. willistoni*, *D. tropicalis*, and *D. nebulosa*. The highest diversity was observed into the *D. paulistorum* species (eight SNPs for *PlexinB* and 15 for *Ankyrin*). These results open new perspectives for the study and understanding of speciation dynamics in the *willistoni* group of *Drosophila*.

2.1 Introdução

O grupo *willistoni* compreende 23 espécies que pertencem ao gênero *Drosophila* e subgênero *Sophophora*. De acordo com Throckmorton (1975) os grupos *willistoni* e *saltans*, (com 23 e 21 espécies descritas, respectivamente) são os únicos representantes do subgênero *Sophophora* no Novo Mundo. Este grupo de espécie é o mais bem representado nas comunidades neotropicais, sendo constituído por seis espécies crípticas e 17 espécies não crípticas (Bächli, 2013). As espécies crípticas (morfologicamente muito semelhantes) estão incluídas no subgrupo *willistoni*, e são a *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana* (não mais encontrada em estoques de laboratório). Outro subgrupo, denominado *bocainensis*, é formado por espécies bastante distintas e de mais fácil identificação, como *Drosophila nebulosa*, *D. capricorni*, *D. fumipennis*, *D. sucinea* (as mais estudadas e conhecidas deste subgrupo) e por *D. abregolineata*, *D. bocainensis*, *D. bocainoides*, *D. changuinolae*, *D. mangabeirai*, *D. parabocainensis*, *D. pseudobocainensis*, *D. subinfumata* (Bächli, 2013). Um último subgrupo, denominado *alagitans*, é formado por *D. alagitans*, *D. capnoptera*, *D. megalagitans*, *D. neoalagitans*, *D. pittieri* (Bächli, 2013).

Os estudos com as principais espécies do grupo *willistoni* têm dado enfoque a presença e diversidade de elementos transponíveis (Holyoake & Kidwell 2003; Sassi et al. 2005; Yang & Barbash 2008; Rubin et al., 2011), ao polimorfismo para inversões cromossômicas (Valente et al. 2003; Rohde et al. 2005; Salceda 2006; Rohde & Valente 2012), do uso de sequência de genes no estabelecimento da filogenia das espécies (O'Grady & Kidwell, 2002; Robe et al., 2010), e as implicações da infecção pela bactéria endossimbionte *Wolbachia* sobre a diferenciação das espécies (Miller & Riegler, 2006; Miller et al., 2010; Müller et al., 2012, 2013).

A análise genética de algumas das espécies que pertencem ao subgrupo *willistoni* foi reforçada na última década após divulgação dos resultados de sequenciamento do genoma da espécie referência do subgrupo, a *Drosophila willistoni* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007). Cabe destacar que esta espécie é a única com distribuição exclusivamente Neotropical entre as doze espécies sequenciadas, que são na sua maioria,

de distribuição cosmopolita, Neártica (América do Norte) ou Paleártica (Europa). Os resultados iniciais do projeto genoma das espécies de *Drosophila* mostraram que há grandes diferenças entre as espécies. Destacamos alguns que se referem a *Drosophila willistoni*, que sobressai se pelo grande tamanho de seu genoma; do uso de um sistema de código genético diferenciado das demais espécies (Powell et al., 2003, 2011); um alto conteúdo de sequências de elementos transponíveis (15%) e diferenciadas sequências (Yang & Barbash, 2008); além da aparente ausência de alguns tipos de proteínas, como as selenoproteínas (Vicario et al., 2007).

O estudo de genomas e da relação filogenética entre espécies drosofilídeos tem sido um tema atual e crescente, que tem trazido resposta a questões importantes sobre a relação da variabilidade genética com a diversidade ambiental onde estão inseridas as populações naturais, ou com a diversidade fenotípica presente nas espécies (Adam et al. 2000; *Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007; Schaeffer et al., 2008). Assim, *D. willistoni* é uma espécie de grande interesse, já que representa a diversidade biológica onde o Brasil está inserido, na região Neotropical, que é uma das sete regiões biogeográficas do mundo. É uma região de grande biodiversidade onde a *Drosophila willistoni* tem sido coletada na maioria dos seus ecossistemas, com destaque para a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Floresta Atlântica, o Pantanal, o Pampa e a Caatinga (Gottschalk et al., 2008; Silva, 2010; Rohde et al., 2010; Rohde & Valente, 2012; Poppe et al., 2012).

Foi objetivo deste trabalho contribuir para o entendimento da variabilidade genética e das relações evolutivas das espécies de drosofilídeos que pertencem ao subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. Para tanto, foi realizado o estudo de dois genes, *PlexinB* e *Ankyrin*, localizados no elemento F de Müller (Müller, 1940), que nestas espécies está fusionado na base no atual cromossomo III (ou elemento E).

2.2 Material e Métodos

Os drosofilídeos do grupo *willistoni* foram capturados a partir de populações naturais, conforme descrição contida na **Tabela 1**, exceto as espécies *Drosophila tropicalis* (Dtro 0801), *D. willistoni* (Dwill GK), *D. equinoxialis* (Dequ MEX), *D. paulistorum* (Dpau CA, Dpau IN, Dpau AB, Dpau OR e Dpau TR) que já vinham sendo mantidas no laboratório. As fêmeas pertencentes ao subgrupo *willistoni* foram individualmente separadas e colocadas em tubos de vidro com meio de cultivo (a base de farinha de milho, fermento e ágar) para o estabelecimento de isolinhagens. Descendentes machos adultos de cada isolinhagens foram cultivados a 25°C até a fase adulta, quando foram identificados no nível de espécie

através da análise do padrão da genitália (edeagus) seguindo descrição de Rohde et al. (2010). Diversas linhagens das espécies crípticas *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, pertencentes ao subgrupo *willistoni* puderam ser estudadas a partir desta identificação e da manutenção de estoques vivos em condições de laboratório.

Tabela 1. Descrição das amostras de *Drosophila* investigadas para a variabilidade dos genes PlexinB e Ankyrin. A origem geográfica das populações indica o local original de coleta, cidade/estado e país. Em alguns casos, está indicado (entre parênteses) o código de registro no *stock center* ou o código de acesso no banco de dados *GenBank*.

Espécie	Origem geográfica	Abreviatura	Número de linhagens
<i>D. nebulosa</i>	Serra Negra, Bezerros/PE, Brasil	Dneb SER	1
	Raso da Catarina, Paulo Afonso/BA, Brasil	Dneb RAS	1
	São Raimundo Nonato/PI, Brasil	Dneb SRN	1
<i>D. tropicalis</i>	Instituto Tropical, San Salvador, El Salvador (<i>stock center</i> 14030-0801.00)	Dtro 0801	1
<i>D. willistoni</i>	Ilha de Guadalupe/Antilhas (GenBank GK13667 e GK13612)	Dwil GK	1
	FLONA Caxiuanã, Melgaço/PA, Brasil	Dwil CAX	2
	Reserva Charles Darwin, Igarassu/PE, Brasil	Dwil DAR	1
	Usina Hidrelétrica Santo Antônio, Porto Velho/ RO, Brasil	Dwil PVH	1
	Serra Negra, Bezerros/PE, Brasil	Dwil NEG DED	1
<i>D. equinoxialis</i>	Belém/PA	Dequ BEL	1
	México	Dequ MEX	2
	FS, Panamá	Dequ FS	1
	Usina Hidrelétrica Santo Antônio, Porto Velho/ RO, Brasil	Dequ PVH	1
<i>D. paulistorum</i>	Pousada Baixa Verde, Triunfo/PE, Brasil	Dpau TRI-POU	1
	Reserva Biol. de Saltinho, Tamandaré/PE, Brasil	Dpau SAL	1
	Bananeiras, Crato/CE, Brasil	Dpau CRA	1
	FLONA Caxiuanã, Melgaço/PA, Brasil	Dpau CAX	6
	Centro-Americana, C2, Lancetilla, Honduras	Dpau CA	1
	Interior, I1, Llanos, Colômbia	Dpau IN	1
	Andino-Brasileira, MS, Mesitas, Colômbia	Dpau AB	1
	Orinocana, O11, Georgetown, Guiana	Dpau OR	1
	Transicional, MS, Santa Marta, Colômbia	Dpau TR	1
	Amazônica, A28, Belém/PA, Brazil	Dpau AM	1

Para análise do DNA, aproximadamente 15 indivíduos de cada sexo, de cada isolinhagem, foram separados e submetidos ao protocolo de extração de DNA genômico, usando o *kit* de extração de DNA da PUREGENE (QIAGEN), seguindo especificações do fabricante. Basicamente, os adultos foram triturados e incubados em tampão de lise do *kit* (300 µL) a 65°C por 60 min. Em seguida o RNA foi degradado pela enzima RNase (1,5 µL a 4mg/mL) misturado vagarosamente (aproximadamente 25 vezes) e incubado a 37°C por 60 min. As proteínas foram precipitadas com solução de precipitação de proteínas do *kit* (100 µL) a temperatura ambiente e agitado no vortex por 20 segundos (seg). O material foi transferido ao gelo por 5 min e, em seguida, centrifugado a 13.000 -14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante contendo o DNA foi coletado em um micro-tubo de 1,5 mL, contendo

100 µL de isopropanol 100% do *kit*. Após ser invertido vagarosamente (aproximadamente 50 vezes), o material foi centrifugado a 13,000 rpm por 5 min. Em seguida foi descartado o sobrenadante e o excesso de líquido, posteriormente foi adicionado 300 µL de etanol 70% e o tubo foi invertido cerca de oito vezes, para lavar o precipitado de DNA. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 3 min, o etanol foi retirado e o micro-tubo foi seco em estufa por 40 min. Por fim, foi adicionado ao material 50 µL de solução de hidratação do kit para ressuspender o DNA, incubando a amostra por 1 hora a 65°C ou durante à noite em temperatura ambiente. O material assim preparado foi armazenado a -20°C até seu uso.

De posse do DNA de machos e de fêmeas das amostras das espécies, os mesmos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific). Em seguida, foram submetidos ao processo de amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para obtenção de fragmentos dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*,

Para a confecção dos oligonucleotídeos (*primers*), inicialmente foi realizado o estudo *in silico* do genoma da *Drosophila willistoni* a fim de estabelecer os novos oligonucleotídeos capazes de amplificar uma variedade de genes do elemento F desta espécie. Foi dada preferência àqueles genes localizados em diferentes posições (mais proximal e mais distal), tomando como referência as posições conhecidas dos genes na espécie *Drosophila melanogaster* (FLYBASE, 2010). Assim Melo (2012) estabeleceu os *primers* e as condições de amplificação ideais, realizando vários testes com a espécie *Drosophila willistoni*. O gene *PlexinB* se apresentou como o mais conservado e o gene *Ankyrin* como o menos conservado. O primeiro é um gene com função de orientação dos axônios, responsável pela ligação de proteínas, e o segundo (*Ankyrin*) é um gene envolvido na estrutura do citoesqueleto, cuja proteína tem função de ligação entre espectrina e os fusos de actina (Flybase, 2010).

Utilizamos os seguintes oligonucleotídeos iniciadores em ambos os sentidos (F=*forward* e R=*reverse*): *PlexinB* (F)5'CGATGTACGGTGCGATCGGCCTGTC3', (R)5'GGCACATCAA-GGCGAATGCCCAAGG3' e *Ankyrin* (F)5' CGTGTCGGTCTTCAGG-CACAACCAG3', *Ankyrin*(R) 5'ACGATTGGCCGGAGCTGGCTAA3'. Os pares de *primers*, contendo apenas exons, foram capazes de amplificar fragmentos acima de 1.000 pares de bases para cada gene. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20 µL, com cerca de 100 ng de DNA genômico, 2,0 U/µL da enzima Taq polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1x, MgCl₂ 1mM, dNTPs 0,3 µM, *primers* F ou R a 3 µM, e água ultra pura para completar o volume. As condições físicas 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 55°C (*PlexinB*) / 57,4°C (*Ankyrin*) e 35 ciclos; extensão de 1 min a 72°C (35 ciclos); extensão final de 5 min a 72°C (1 ciclo).

Os produtos de PCR (amplicons) foram visualizados em gel de agarose 1% juntamente com corante de DNA fluorescente GelRed™ 20x (Molecular Probes, Inc.) e tampão de carregamento composto por 2x 10² g.L⁻¹ de sacarose e 1,25 g.L⁻¹ de azul de bromofenol. O tampão de corrida utilizado foi o TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X. Os amplicons foram submetidos à purificação e sequenciamento direto na empresa Macrogen (Seul-Coreia), pelo sistema *BigDye terminator* em um sequenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems, EUA). A identidade da sequência foi atestada após comparação com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. A análise da qualidade das sequências foi realizada no programa ApE A Plasmid editor (versão 2.0.30), sendo a edição, alinhamento e estabelecimento das filogenias realizadas através do programa Geneious (Biomatters) (versão 6.1.4). Sempre que as amostras de machos *forward* ou *reverse*, ou fêmeas *forward* ou *reverse*, da mesma amostra, foram idênticas, as mesmas passaram a ser consideradas como uma só amostra. Entretanto, quando houve divergência entre as quatro sequências, que foi sempre devido à ocorrência de picos duplos no mesmo cromatograma de uma amostra (resultado da diversidade entre os DNAs de vários indivíduos), as variantes encontradas foram identificadas com o nome da linhagem seguida de uma letra (a=sequência mais comum ou pico maior no cromatograma, b=sequência menor ou pico mais baixo no cromatograma) e tomadas como amostras diferentes.

As filogenias entre as cinco espécies do grupo *willistoni* foram estabelecidas pelo método Neighbor-Joining (modelo de correção Tamura-Ney), e suporte *Bootstrap* (com 1.000 réplicas e nível de confiança de 90%) a partir de comparação de sequências de nucleotídeos com tamanhos de 838 pb para o gene *PlexinB* e de 725 pb para o gene *Ankyrin*. A espécie *Drosophila melanogaster* foi incluída como grupo externo.

Os fragmentos obtidos para todas as amostras foram comparados às sequências do genoma publicado para *Drosophila willistoni*, da linhagem GdH₄, original da ilha de Guadalupe, América Central (*Drosophila 12 Genomes Consortium*, 2007), a fim de confirmar se o gene amplificado era de fato *PlexinB* ou *Ankyrin*.

2.3 Resultados e Discussão

Estudar genes da porção fusionada (Elemento F) do cariótipo das espécies nos pareceu ser uma boa estratégia para novas descobertas sobre a história evolutiva das espécies do grupo *willistoni*. Em todos os casos deste trabalho, os fragmentos dos genes amplificados foram sempre idênticos à sequência publicada no *GenBank*, correspondente às posições 1.784 até 2.623 (número de acesso GK13667) para PlexinB e às posições 905 até 1.629 (número de acesso GK13612) para Ankyrin. Algumas amostras preparadas, entretanto, não puderam ser incluídas neste estudo pois o material amplificado foi de má qualidade. Este foi o caso da espécie *D. insularis* originária da ilha de Saint Kitts/Antilhas, e de diversas amostras de *D. nebulosa* (dados não mostrados).

O alinhamento múltiplo de 26 sequências do gene *PlexinB* e 30 sequências do gene Ankyrin de amostras do grupo *willistoni* e *D. melanogaster* foram analisadas no programa Geneious. As análises filogenéticas realizadas estão representadas nas árvores das **Figuras 1 e 2**, respectivamente. Tanto para PlexinB quanto para Ankyrin, o grupo-irmão do subgrupo *willistoni* foi a espécie *D. nebulosa*, do subgrupo *bocainensis*, conforme indicado nas Figuras. Um detalhamento da variabilidade de nucleotídeos únicos (SNPs), dentro e entre espécies do grupo *willistoni*, pode ser visto nas **Tabelas 2 e 3**. As tabelas também indicam a posição de cada SNP no alinhamento e as consequências de cada troca na codificação dos aminoácidos correspondentes. Um detalhamento dos resultados, apresentado nas figuras e tabelas, está descritos a seguir.

Inferências filogenéticas derivadas dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*

A partir dos dados de sequenciamento dos genes PlexinB e Ankyrin foram elaboradas fenogramas (**Figuras 1 e 2**). Para a espécie *D. nebulosa* houve variabilidade para o gene PlexinB entre as amostras SER e RAS, esta última tendo duas variantes diferentes (a e b). As amostras se agruparam em um clado distinto (**clado A** da **Figura 1**). Uma variante foi encontrada para o gene Ankyrin entre as amostras SER e SRN (**clado A** da **Figura 2**). Infelizmente não foi possível incluir mais amostras de *D. nebulosa* nas filogenias devido a uma provável falta de homologia dos *primers* ao genoma desta espécie, que inviabilizou muitos PCRs feitos. De fato, no alinhamento das sequências, *D. nebulosa* é bastante distinta de *D. willistoni* e das demais espécies (**Tabelas 2 e 3**). Para este caso, serão elaborados novos *primers*, com base nas sequências já disponíveis para *D. nebulosa* (SRN, SER e RAS), e serão realizados novos testes.

Para a espécie *D. willistoni*, não houve nenhuma diferença entre as amostras estudadas para o gene PlexinB (**clado B da Figura 1**). Todas as seis linhagens, coletadas em diferentes locais, foram idênticas na sequência de nucleotídeos. Este fato, que foi verificado apenas para *D. willistoni*, foi uma surpresa entre os resultados, já que polimorfismos poderiam ser esperadas, pelo menos entre a amostra do sequenciamento, a linhagem GdH4 (da América Central), e as coletas recentes, como *Dwil* CAX (de Caxiuanã, Amazônia, Pará), *Dwil* PVH (da Amazônia de Rondônia) ou *Dwil* DAR (da Floresta Atlântica de Pernambuco). Também foi surpresa verificar que a mesma conservação da sequência ocorreu para o gene Ankyrin (**clado B da Figura 2**).

Para a espécie *D. equinoxialis*, houve variabilidade entre as amostras para o gene Plexin (**clado C da Figura 1**) e para Ankyrin (**clado C da Figura 2**). Neste caso, cabe destacar que a maioria das amostras estudadas nesta espécie vem sendo mantida há vários anos em laboratório. Apenas uma amostra, *Dequ* PVH (da Amazônia de Rondônia) foi recentemente coletada. Ainda assim, a espécie tem variabilidade capaz de permitir agrupamentos mais próximos entre certas amostras. No futuro, mais linhagens de coletas recentes desta espécie serão incluídas a fim de melhor estimar a diversidade da espécie e poder comparar ela com sua espécie-irmã nas filogenias, a *D. paulistorum*.

Os resultados mais diversos foram obtidos para a espécie *D. paulistorum*, tendo sido estudadas 14 linhagens para o gene PlexinB (**grupo polifilético da Figura 1**) e 12 para o gene Ankyrin (**grupo polifilético da Figura 2**). Conforme já apresentado por Nascimento (2013), esta espécie, composta por diversas semiespécies, apresenta grande variabilidade. A autora analisou 20 diferentes amostras para os mesmos genes, Plexin e Ankyrin, e elaborou árvores combinadas dos resultados. Dois nucleotídeos, marcadores para o gene Ankyrin, foram exclusivos da semiespécie Amazônica (AM), nas amostras recentes obtidas de Caxiuanã, e agrupadas com a linhagem de laboratório AM nas filogenias. Ao comparar os resultados entre as cinco espécies do grupo *willistoni*, é possível sugerir que *D. paulistorum* é a espécie com maior variabilidade, seguida de *D. equinoxialis* e de *D. nebulosa*. *Drosophila willistoni*, como já mencionado, não apresentou variabilidade.

Mesmo com o esforço feito nos últimos anos, em obter amostras recentes de espécies do grupo *willistoni*, de diferentes locais, nenhuma linhagem de *D. tropicalis* foi identificada por nosso grupo ou esteve disponível em outros laboratórios parceiros. *Drosophila tropicalis*, com apenas uma linhagem disponível para este estudo, ainda carece de informações. Segundo a distribuição geográfica apresentada por Ayala et al. (1974) esta espécie já foi encontrada na região Nordeste e do Centro do Brasil.

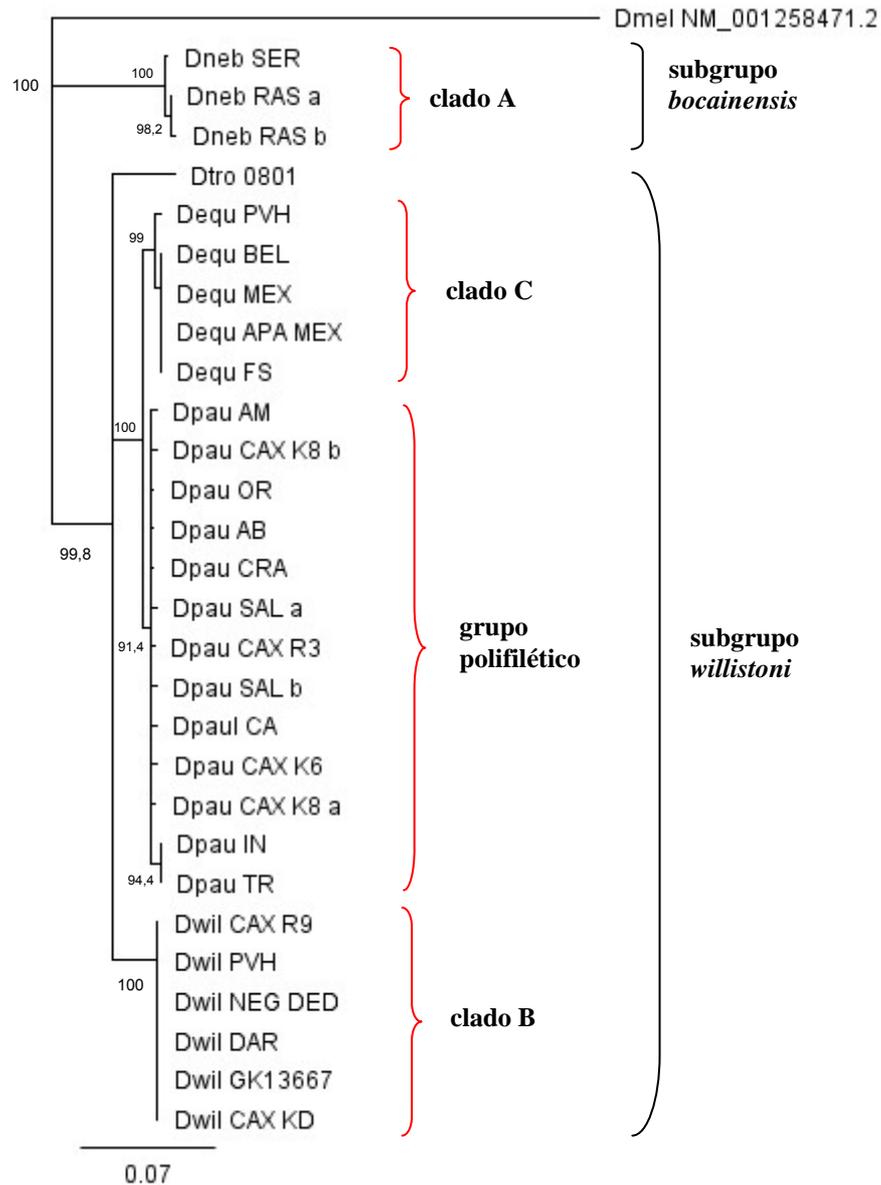


Figura 1. Relação filogenética de cinco espécies do grupo *willistoni* (*D. nebulosa*, *Dneb*; *D. willistoni*, *Dwil*; *D. tropicalis*; *D. equinoxialis*, *Dequ*; *D. paulistorum*, *Dpau*) e uma espécie do grupo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *Dmel*) considerada como grupo externo. A árvore foi construída pelo método Neighbor- Joining e modelo de distância Tamura-Ney, baseada no alinhamento de sequência de 838 pares de base do gene *PlexinB*. Os valores de *Bootstrap* são mostrados nos nós com um suporte de 90%, com 1.000 réplicas. Os dados das sequências do gene *PlexinB* das linhagens *Dwil* GK 13667 e *Dmel* NM_001258471.2 foram obtidos diretamente do *GenBank* (dados públicos dos genomas sequenciados das espécies).

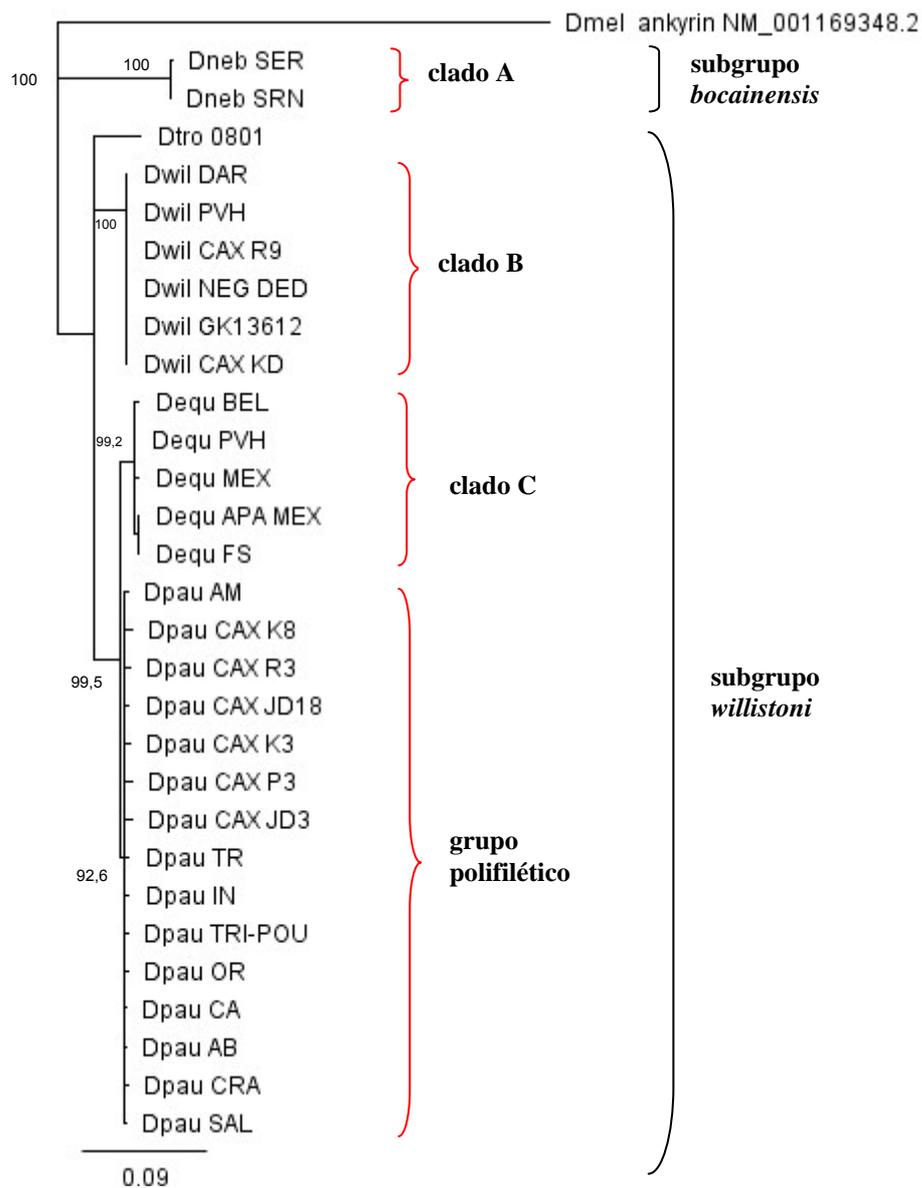


Figura 2. Relação filogenética de cinco espécies do grupo *willistoni* (*D. nebulosa*, *Dneb*; *D. willistoni*, *Dwil*; *D. tropicalis*; *D. equinoxialis*, *Dequ*; *D. paulistorum*, *Dpau*) e uma espécie do grupo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *Dmel*) considerada como grupo externo. A árvore foi construída pelo método Neighbor- Joining e modelo de distância Tamura-Ney, baseada no alinhamento de sequência de 725 pares de base do gene **Ankyrin**. Os valores de *Bootstrap* são mostrados nos nós com um suporte de 90%, com 1.000 réplicas. Os dados de sequência do gene *PlexinB* da linhagem *Dwil* GK 13667 e *Dmel* NM_001169348.2 foram obtidos diretamente do *GenBank* (dados públicos dos genomas sequenciados das espécies).

Neste trabalho as semiespécies de *D. paulistorum* formaram um clado polifilético na filogenia estimada pelos dois genes estudados. Esse agrupamento polifilético também foi observado no trabalho de Gleason et al. (1998), no estudo do gene *period* e do gene *citocromo oxidase I*, embora os autores só tenham estudado apenas as linhagens

consideradas clássicas (AM, AB, OR, CA, TR e IN). Por outro lado, na mesma filogenia apresentada pelos autores, as espécies *D. willistoni* e *D. tropicalis* formaram um clado único, diferente dos nossos resultados. O mesmo agrupamento destas duas espécies pode ser observado na filogenia estabelecida para o gene *citocromo oxidase I* (Gleason et al., 1998). E quando os autores avaliam o gene *Álcool desidrogenase*, *D. tropicalis* formou um clado com *D. willistoni*, que por sua vez formou um clado com a *D. equinoxialis/D. paulistorum*. Também O'Grady & Kidwell (2002) obtiveram agrupamento entre *D. willistoni* e *D. tropicalis*, no estudo combinado dos genes *Álcool desidrogenase* e *citocromo oxidase II*.

Ayala et al. (1974), a partir de dados biogeográficos, evidências bioquímicas, homologias de inversões cromossômicas e capacidade de produção de híbridos, apresentam o mesmo agrupamento entre *D. willistoni* e *D. tropicalis*, que por sua vez, se relacionou ao agrupamento da *D. equinoxialis/D. paulistorum*. Assim, para estes autores, *D. willistoni* primeiro forma um clado com a espécie mais relacionada ela, a *D. tropicalis*, para só então formar um clado com as espécies *D. equinoxialis/D. paulistorum*.

Resultados semelhantes foram observados por Robe et al. (2010): agrupamento polifilético dos representantes clássicos das semiespécies de *D. paulistorum*; agrupamento de *D. paulistorum* com *D. equinoxialis*; agrupamento de *D. willistoni* com *D. tropicalis* (dados com *citocromo oxidase I*, *alpha metildopa*, *hunchback* e *period*).

Para Rohde et al. (2006) que analisaram do ponto de vista citogenético o padrão de rearranjos compartilhados e segregantes do cromossomo politênico IIR, as espécies *D. willistoni* e *D. tropicalis* formam grupos distintos e não relacionados entre si ou com *D. equinoxialis/D. paulistorum*. Estas duas últimas espécies são claramente próximas e compartilham inversões fixadas e, provavelmente, ancestrais entre si.

Os resultados das análises feitas aqui com os genes PlexinB e Ankyrin, e também os resultados apresentados pelos demais trabalhos da literatura aqui citados, parecem indicar que tanto *D. willistoni* quanto *D. tropicalis* são igualmente semelhantes (ou diferentes) do grupo formado pela *D. equinoxialis/D. paulistorum*. Entretanto, este tema poderá ser melhor investigado quando novas linhagens de *D. tropicalis* estiverem disponíveis para incrementar os estudos, e quando novos genes do elemento F forem incluídos, ampliando a informação sobre a variabilidade que de fato existe nesta espécie.

Análise da variabilidade de nucleotídeos

A partir dos dados de alinhamento dos genes PlexinB e Ankyrin foi possível identificar diversos polimorfismos de nucleotídeos entre as amostras de *Drosophila* sequenciadas. A fim de comparar melhor esta variabilidade, foram construídas tabelas de

polimorfismo de nucleotídeos únicos ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), uma para PlexinB (**Tabela 2**) e outra para Ankyrin (**Tabela 3**). Com estas tabelas foi possível identificar mais claramente a quantidade e o significado dos sítios variantes dentro das espécies do grupo *willistoni*, em parte da região codificante dos genes. No topo das **Tabelas 2 e 3**, as letras S e R identificam os SNPs que ou foram considerados silenciosos (S) ou capazes de alterar o aminoácido codificado (R=*Replacement*) nas trincas em que estão inseridos. Essa estimativa da consequência de cada SNP foi possível graças ao alinhamento que foi feito das sequências aqui obtidas com o gene completo da espécie *D. willistoni*, obtida do bando de dados do sequenciamento do NCBI (alinhamento não mostrado).

De acordo com os resultados das **Tabelas 2 e 3**, foi possível detectar 139 nucleotídeos variáveis para o gene PlexinB, entre todas as amostras do grupo *willistoni*, e 134 para o gene Ankyrin. Merece destaque o fato de que apenas cinco, dos 139 SNPs de Plexin, foram capazes de modificar o aminoácido, enquanto que para Ankyrin este número foi muito maior, 44 dos 134 SNPs. Este resultado nos permite confirmar que o gene PlexinB é mais conservado ou está sob maior pressão seletiva, do que o gene Ankyrin, nas amostras aqui estudadas. Nas tabelas também é possível verificar que nas amostras de *D. paulistorum* (as de laboratório e as recentemente coletadas) houve a presença de oito SNPs para o gene PlexinB, e 15 SNPs para Ankyrin. Esta espécie foi a mais variável quanto a esta análise dos nucleotídeos polimórficos únicos. *Drosophila equinoxialis* teve quatro SNPs para *PlexinB* e três para *Ankyrin*, e *D. nebulosa* teve seis SNPs para *PlexinB* e um para *Ankyrin*.

Além dos SNPs, também foram identificadas variações entre as espécies do tipo deleção, sendo de 9 pb em *D. willistoni* e 3 pb em *D. equinoxialis*, ambos no gene Ankyrin. Este resultado nos permite sugerir que há diferenças na estrutura da proteína codificada pelo gene Ankyrin, entre *D. willistoni*, *D. equinoxialis* e as demais espécies do subgrupo *willistoni* que não possuem estas deleções. A perda de três (ou múltiplo de três) nucleotídeos indica que os efeitos destas mutações podem afetar a estrutura da proteína codificada (já que os *primers* foram construídos apenas com regiões codificantes) porém não a ponto de modificar sua função. De toda forma, estes eventos são espécie-específicos e se reproduziram em todas as amostras de *D. willistoni* e *D. equinoxialis* estudadas, indicando que não se trata de um polimorfismo, mas sim de um evento evolutivo, ou seja, uma alteração ocorrida no passado, apenas na linhagem que originou ou a espécie *D. willistoni* ou a *D. equinoxialis*.

Tabela 3. Polimorfismo dos nucleotídeos A, T, C, G do fragmento de 732 pares de bases (pb) do gene *Ankyrin*, de cinco semiespécies de *Drosophila paulistorum* (*Dpau*): Amazônica (AM); Centro-Americana (CA); Interior (IN); Orinocana (OR); Transicional (TR); *Drosophila willistoni* (*Dwil*); *D. equinoxialis* (*Dequ*); *D. tropicalis* (*Dtro*); *D. nebulosa* (*Dneb*); *D. melanogaster* (*Dmel*). O número das posições se refere ao alinhamento feito entre as cinco espécies do grupo *willistoni* estudadas (sem *primers* e sem *D. melanogaster*). As substituições se referem às consequências dos polimorfismos nas amostras, que podem ser do tipo mutação silenciosas (S) ou substituição de aminoácido (R, *replacement*). Letras vermelhas e azuis destacam as mudanças em relação à sequência consenso da maioria.

ANKYRIN																																																
Posições	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
Substituições	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		
<i>Dmel</i> NM001169348.2	G	A	A	A	T	T	T	C	T	G	T	C	T	T	C	A	A	T	T	C	T	T	C	C	A	G	A	C	C	T	T	A	T	C	T	A	A	A	G	C	T	A	T	A	C	T	T	
<i>Dneb</i> SER	C	G	G	G	C	T	A	C	C	A	T	T	C	T	T	C	T	C	T	C	C	G	T	C	C	A	C	C	G	G	T	T	A	G	G	T	T	C	T	A	T	C	T	C	T	C	T	
<i>Dneb</i> SRN	C	G	G	G	C	T	A	C	C	A	T	T	C	T	T	C	T	C	T	C	C	G	T	C	C	A	C	C	G	G	T	T	A	G	G	T	T	C	T	A	T	C	T	C	T	C	T	
<i>Dtro</i> 0801	C	T	A	G	A	T	G	C	C	G	C	C	T	A	G	T	C	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	T	G	T	A	G	A	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	
<i>Dwil</i> GK13612	C	A	A	G	A	G	G	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	G	T	C	T	A	T	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dwil</i> CAX KD	C	A	A	G	A	G	G	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	G	T	C	T	A	T	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dwil</i> CAX R9	C	A	A	G	A	G	G	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	G	T	C	T	A	T	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dwil</i> CAX PVH	C	A	A	G	A	G	G	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	G	T	C	T	A	T	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dwil</i> CAX NEG DED	C	A	A	G	A	G	G	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	G	T	C	T	A	T	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dwil</i> CAX DAR	C	A	A	G	A	G	G	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T	C	C	T	G	C	A	C	G	T	C	T	A	T	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dequ</i> BEL	G	A	A	G	T	T	G	C	C	G	C	C	C	C	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	A	T	A	T	T	G	G	G	T	C	T	C	G	C	T	C	C	
<i>Dequ</i> MEX	G	A	A	G	T	T	G	C	C	G	C	C	C	C	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	A	T	A	T	T	G	G	G	T	C	T	C	G	C	T	C	C	
<i>Dequ</i> PVH	G	A	A	G	T	T	G	C	C	G	C	C	C	C	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	A	T	A	C	T	G	G	G	T	C	T	C	G	C	T	C	C	
<i>Dequ</i> APA MEX	G	A	A	G	T	T	G	C	C	G	C	C	C	C	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C	T	C	G	C	A	T	A	C	T	G	G	G	T	C	T	C	G	C	T	C	C	
<i>Dequ</i> FS	G	A	A	G	T	T	G	C	C	G	C	C	C	C	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C	T	C	G	C	A	T	A	C	T	G	G	G	T	C	T	C	G	C	T	C	C	
<i>Dpau</i> CA	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> IN	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> TR	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> OR	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> AB	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> AM	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> TRI-POU	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> SAL	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> CRA	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	A	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> CAX K3	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> CAX K8	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	C	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C
<i>Dpau</i> CAX R3	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> CAX P3	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> CAX JD3	G	A	A	A	A	A	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	A	C	C	C	G	C	C	C	C	
<i>Dpau</i> CAX JD18	G	A	A	A	A	T	G	C	C	G	C	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	C	T	A	C	T	G	G	G	T	C	C	C	G	C	C	C	C	

Tabela 3. continuação

ANKYRIN																																								
Posições	6 1	6 1	6 1	6 1	6 1	6 2	6 2	6 2	6 2	6 2	6 3	6 3	6 4	6 4	6 4	6 5	6 5	6 5	6 5	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 7	6 7	6 7	6 7	6 8	6 8	6 8	6 8	6 9	6 9	7 0	7 1				
Substituições	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S			
Dmel NM001169348.2	A	G	A	-	T	A	A	C	C	-	T	-	C	G	-	T	A	T	T	C	-	G	C	-	-	G	A	A	T	T	A	C	C	A	A	A	T	T	G	A
Dneb SER	A	A	A	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	G	C	T	A	T	T	A	C	A	A	C	C	T	G	A	G	A	C	A	T	G	G	C	T	C	T	C
Dneb SRN	A	A	A	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	G	C	T	A	T	T	A	C	A	A	C	C	T	G	A	G	A	C	A	T	G	G	A	T	C	T	C
Dtro 0801	C	G	A	T	T	T	A	T	C	C	T	G	C	G	C	C	A	A	C	C	A	A	G	C	T	T	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dwil GK13612	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	G	C	G	T	C	A	A	T	C	T	A	A	C	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	C	T	C	A
Dwil CAX KD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	G	C	G	T	C	A	A	T	C	T	A	A	C	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	C	T	C	A
Dwil CAX R9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	G	C	G	T	C	A	A	T	C	T	A	A	C	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	C	T	C	A
Dwil CAX PVH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	G	C	G	T	C	A	A	T	C	T	A	A	C	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	C	T	C	A
Dwil CAX NEG DED	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	G	C	G	T	C	A	A	T	C	T	A	A	C	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	C	T	C	A
Dwil CAX DAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	G	C	G	T	C	A	A	T	C	T	A	A	C	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	C	T	C	A
Dequ BEL	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	-	-	-	T	C	C	A	G	A	T	C	A	A	T	G	T	G	C	A	A	A	T	C	C	A
Dequ MEX	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	-	-	-	T	C	C	A	G	A	T	C	A	A	T	G	T	G	C	A	A	A	T	C	C	A
Dequ PVH	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	-	-	-	T	C	C	A	G	A	T	C	A	A	T	G	G	G	C	A	A	A	T	C	C	A
Dequ APA MEX	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	-	-	-	T	C	C	A	G	A	T	C	A	A	T	G	T	G	C	A	A	A	T	C	C	A
Dequ FS	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	-	-	-	T	C	C	A	G	A	T	C	A	A	T	G	T	G	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CA	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau IN	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A	
Dpau TR	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A	
Dpau OR	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau AB	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau AM	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau TRI-POU	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A	
Dpau SAL	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CRA	A	G	A	T	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CAX K3	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CAX K8	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	C	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CAX R3	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CAX P3	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CAX JD3	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A
Dpau CAX JD18a	A	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	C	G	C	C	A	A	T	C	C	A	G	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	C	A

2.4 Conclusões

O sequenciamento dos genomas, publicado na última década - e os novos sequenciamentos de outras espécies que estão em andamento – são essenciais para o entendimento das relações evolutivas entre espécies de *Drosophila* e sobre os efeitos das mutações frente às pressões seletivas. Neste sentido, o estudo com drosofilídeos têm contribuído muito para o entendimento da genética e da evolução dos processos biológicos, e são inúmeras suas vantagens e facilidades como organismo modelos dos estudos a nível molecular. Entretanto, para se conhecer de fato a condição genética e a variabilidade de uma espécie se faz necessário investigar diferentes amostras de populações naturais, sob risco do conhecimento ser apenas parcial.

Este trabalho contribuiu para que dois genes do elemento cromossômico F fossem melhor entendidos quanto à variabilidade presente dentro e entre espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. Com os resultados foi possível comparar os dois genes entre si e reconhecer que *PlexinB* é mais conservado e *Ankyrin* o mais variável. O reconhecimento de nove deleções na espécie *D. willistoni* e três deleções na *D. equinoxialis*, para *Ankyrin*, demonstram ainda que a proteína pode ser bastante diferenciada entre as espécies estudadas, o que merece ser melhor investigado. Cabe destacar que a detecção das nove deleções na *D. willistoni* só pôde ser reconhecida devido à análise comparativa feita aqui entre espécies crípticas. Se tomássemos os dados da sequência completa do gene *Ankyrin*, publicada no banco de dados NCBI para a *D. willistoni* e a comparássemos com o genoma da espécie *D. melanogaster* (análise *in silico*), esta deleção teria passado despercebida já que seria confundida com os inúmeros *gaps* que existem no alinhamento desta porção do gene, que é bastante variável entre as duas espécies. Assim, a análise comparativa entre espécies próximas e a inclusão de variadas amostras é essencial para a melhoria na qualidade dos estudos e na interpretação correta de dados moleculares, decifrando o impacto das mutações presentes (se polimorfismos ou se fixados nas espécies).

Conseguimos obter cerca de 30 novas sequências dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*, de cinco espécies e diversas populações coletadas recentemente. As variações obtidas demonstram estreita relação entre *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, grande variabilidade das sequências dentro e entre as seis semiespécies de *D. paulistorum*, e nenhuma variabilidade entre seis populações de *D. willistoni* investigadas, o que foi um resultado bastante surpreendente, pois é a espécie do subgrupo *willistoni* que possui a mais ampla distribuição geográfica, estando presente nos diferentes biomas (Floresta Atlântica, Caatinga, Brejo de altitude, Manguezal).

Com nossas contribuições foi possível estabelecer que existem grandes diferenças quanto aos genes estudados entre as espécies do subgrupo *willistoni* (*D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*) apesar de as mesmas serem morfológicamente muito semelhantes e de difícil reconhecimento (espécies crípticas). As diferenças moleculares se ampliaram, na medida em que espécies não crípticas foram também estudadas, como mostrado pelos resultados com a *D. nebulosa*. Na continuidade destes estudos, novas amostras e espécies do grupo *willistoni* serão investigadas, bem como novos genes presentes no elemento cromossômico F (*Bent*, *Host Cell Factor*, *Shaven*), cujos resultados já estão em andamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem às Instituições financiadoras Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE (APQ-0796-2.02/08 para C. Rohde e APQ-0753-2.01/10 para A.C.L. Garcia), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal 482874/2011-2) e PROPESQ-UFPE. Também agradecem ao Dr. Wolfgang Miller, da Universidade Médica de Viena, pelas amostras das semiespécies de *D. paulistorum*; a Dra. Vera L.S. Valente pelas amostras de *D. tropicalis* e pela linhagem de *D. willistoni* GdH4, e às colegas do Laboratório de Genética do CAV-UFPE, Geórgia F. Oliveira e Rita D. Coutinho da Silva, pela ajuda na identificação taxonômica das linhagens deste estudo.

2.5 Referências

- Adam MD, Celniker SE, Holt RA et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Ashburner M (1967) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, v.27, p.47-63.
- Ayala FJ, Tracey M L, Hedgecock D, Richmond RC (1974) Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution* 28:576-592.
- Bächli G (2013) TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Access in 15/06/2013. Disponível em: <http://taxodros.unizh.ch/>.
- Drosophila* 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-218.
- Garcia, ACL (2006). Evolução Cromossômica da superespécie *Drosophila paulistorum* e Ecologia de populações marginais. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 173p.

- 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, Hofmann PRP, Valente VLS (2008) Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* 4 (4):485-518.
- Holyoake AJ, Kidwell MG (2003) *Vege* and *Mar*: two novel hAT MITE families from *Drosophila willistoni*. *Mol Biol Evol* 20(2):163-167.
- 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, 68p.
- Miller WJ, Riegler M (2006) Evolutionary dynamics of wAu-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1):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):1-17.
- Müller HJ (1940) Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: Huxley J (ed). *The New Systematics*. Clarendon Press, Oxford, pp 185-268.
- 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.
- 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.
- 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, Universidade de Pernambuco, 69p.
- O'Grady PM, Kidwell MG (2002) Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22(3):442-453.
- Poppe JL, Valente VLS, Schmitz HS (2012) Structure of Drosophilidae assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa biome (São Luiz Gonzaga, RS). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 52(16):185-195.
- Powell JR, Sezzi E, Moriyama EN, Gleason JM, Caccone A (2003) Analysis of a shift in codon usage in *Drosophila*. *J Mol Evol.* 57:s214–s225.
- Powell JR, Dion K, Papaceit M, Aguadé M, Vicario S, Garrick RC (2011) Nonrecombining genes in a recombination environment: The *Drosophila dot* chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 28:825-833.
- Robe LJ (2008) Relações Filogenéticas no Genêro *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae): Uma abordagem molecular. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 303p.

- 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, Degrandi TH, De Toni DC, Valente VLS (2005) *Drosophila willistoni* polytene chromosomes. I Pericentric inversion on X chromosome. *Caryologia* 3:249-254.
- Rohde C, Garcia ACL, Valiati VH, Valente VLS (2006) Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller'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, Valente VLS (2012) Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifthly different rearrangements. *Genetics and Molecular Biology* 35(4):966-979.
- Rubin PM, Loreto EL, Carareto CM, Valente VL (2011) The *copia* retrotransposon and horizontal transfer in *Drosophila willistoni*. *Genet. Res.* 93(3):175-180.
- Salceda VM (2006) Chromosomal polymorphism in a natural population of *Drosophila willistoni* (Diptera, Drosophilidae) from Laguna Verde, Veracruz, Mexico: An eight-year record. *Southw Nat* 51:320-325.
- Sassi A K, Herédia FO, Loreto ELS, Valente VLS, Rohde C (2005) Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics and Molecular Biology* 4:734-739.
- Schaeffer SW, Bhutkar A, McAllister BF *et al.* (2008) Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: The order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics* 179:1601-1655.
- Silva DMIO (2010) Levantamento taxonômico da fauna de Drosophilidae em ambientes de Floresta Atlântica e Caatinga do Estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de Pernambuco, 90p.
- Throckmorton LH (1975) The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In Robert C. King (Ed.) *Hand Book of Genetics* 3, 421-469. Plenum Publ.Corp. NY.
- Valente VLS, Goñi B, Valiati VH, Rohde C, Morales NB (2003) Chromosome inversion occurring in Uruguayan populations of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* 84:55-59.
- Vicario S, Moriyama EN, Powell JR (2007) Codon usage in twelve species of *Drosophila*. *Evolutionary Biology* 7(226):1-17.
- Yang HS, Barbash D (2008) Abundant and species-specific *DINE-1* transposable elements in 12 *Drosophila* genomes. *Genome Biology*

CAPÍTULO 3

3.1 Discussão Geral e Conclusões

Este trabalho contribuiu com uma abordagem filogenética de cinco espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*, considerado como paradigma para o estudo da evolução de espécies neotropicais de *Drosophila*.

Através dos resultados de sequenciamento dos genes *PlexinB* e *Ankyrin*, do elemento F de Müller, foi apresentada uma descrição ampla da variabilidade de nucleotídeos destes dois genes nucleares. Diferentes amostras, de diferentes populações das espécies *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. nebulosa* foram estudadas. Foram descritos, polimorfismos de nucleotídeos e deleções espécies-específicas, o que nos levou a concluir que há grande variabilidade entre as espécies, com destaque ao gene *Ankyrin*, o mais divergente.

Na continuidade deste trabalho, novas amostras serão incorporadas, como no caso da espécie *D. tropicalis*, além de outras ainda não estudadas. Além disso, novos estudos dos genes *Bent*, *Heat Shock Factor* e *Shaven* do elemento F estão em andamento. As informações destes genes, em conjunto, poderão fornecer suporte para novas filogenias combinadas, capazes de esclarecer não só as relações filogenéticas entre as espécies dos subgrupos crípticos e não críptico, dentro do grupo *willistoni*, como entre as semiespécies de *D. paulistorum*. Até o momento não há uma metodologia molecular capaz de diferenciar estas espécies, nem mesmo os genes mitocondriais clássicos, como *COI* e *COII*. Por fim, este trabalho abre caminho para uma nova linha de pesquisa, específica dos genes do elemento F de Müller e, no futuro, os mesmos poderão também ser mapeados nos cromossomos politênicos, através das metodologias conhecidas de hibridização *in situ*, e suas posições comparadas as outras espécies onde este elemento cromossômico já foi melhor estudado (*Drosophila melanogaster* e *D. virilis*).

3.2 Referências

- ASHBURNER, M. Aspects of polytene chromosome structure and function. Allfrey 1976: pp. 85-91, 1976.
- AYALA, F. J.; TRACEY, M. T.; HEDGECOCK, D.; RICHMOND, R. C. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. **Evolution** 28(4):576-592, 1974.
- BÄCHLI, G. TaxoDros: The database on Taxonomy of Drosophilidae. Base de dados pública acessível em <http://www.taxodros.unizh.ch/>. Acesso em 15 de julho, 2013.
- BURLA H.; DA CUNHA A. B.; CORDEIRO A. R.; DOBZHANSKY T.; MALOGOLOWKIN C., PAVAN C. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. **Evolution** 3:300-314, 1949.
- CABRAL W. B. M. Variação temporal na abundância e na diversidade de Drosophilidae (Diptera, Insecta) em um Brejo de Altitude no município de Bonito, Pernambuco. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas, UFPE, 2010.
- DA CUNHA, A. B.; BRNCIC, D.; SALZANO, F. M. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. **Heredity** 2(7):193-202, 1953.
- DOBZHANSKY T. Genetics of the evolutionary process. Columbia University Press, New York, 505 pp, 1970.
- DOBZHANSKY T.; SPASSKY B. *Drosophila paulistorum*, a cluster of species in statu nascendi. **Proc Natl Acad Sci** 45:419-428, 1959.
- DOBZHANSKY, T.; POWELL, J. R. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. In: King, R. C. ed. Handbook of Genetics, Plenum Publishing Corporation, New York, v. 3, pp. 589-622, 1975.
- EHRMAN, L.; POWELL, J. R. 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 2b. p.193-225, 1982.
- FLYBASE. Base de dados pública, acessível em <http://www.flybase.org>. Acesso em 03 de maio, 2010.
- GARCIA, ACL. Evolução cromossômica da superespécie *Drosophila paulistorum* e Ecologia de populações marginais. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 173p, 2006.
- GARCIA, A. C. L; ROHDE, C.; AUDINO, G. F.; VALENTE, V. L. S.; VALIATI, V.H. Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through electrophoretical mobility of acid phosphatase-1. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 44:212-216, 2006.
- GARCIA, A. C. L; VALIATI, V. H. GOTTSCHALK, M.S., ROHDE, C., VALENTE, V. L. S. Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by

- Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). **Iheringia, Série Zoologia** 98(3):329-338, 2008.
- GLEASON, J. M.; GRIFFITH, E. C.; POWELL, J. R. A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concept? **Evolution** 52:1093-1103, 1998.
- GRIMALDI, D. A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 197:103-268, 1990.
- LAKOVAARA, S.; SAURA, A. Location of enzyme loci in chromosomes of *Drosophila willistoni*. **Experientia** 28(3):355-356, 1972.
- MALOGOLOWKIN, C. Sobre a genitália dos “Drosophilidae” (Diptera). III. Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. **Revista Brasileira de Biologia** 12(1):79-96, 1952.
- MARKOW, T. A.; O`GRADY, P. M. *Drosophila* biology in the genomic age. **Genetics** 177:1269–1276, 2007.
- MAYR, E. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, 797 p., 1963.
- MELO, Z. G. S. Caracterização citogenética de genes do elemento cromossômico F em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) Dissertação de Mestrado, Universidade de Pernambuco, 2012.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução Filogenética: Introdução e o Método da Máxima Parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (ed.) Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, pp.97-107, 2001.
- MONTEIRO, L. S. Abundância e diversidade da família Drosophilidae (Insecta, Diptera) em três Brejos de Altitude de Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- MONTES, M. A.; SCHMITZ, H. J.; ROHDE, C.; VALENTE, V. L. S.; GARCIA, A. C. L. Preliminary data on the *Drosophila* fauna in the city of Tandil, Buenos Aires province Argentina. **Drosophila Information Service**, 94:120-122, 2011.
- MÜLLER, M. J.; DÖRR, N. C. D.; DEPRÁ, M.; SCHMITZ, H.; VALIATI, V. H.; VALENTE V. L. S. Reevaluating the infection status by the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila* Neotropical species from the *willistoni* subgroup. **Infection, Genetics and Evolution** 19:232-239, 2013.
- MÜLLER, M. J.; VON MÜHLEN, C.; VALIATI, V. H.; VALENTE, V. L. S. *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. **J. Invert. Pathol.** 109:152-155, 2012.
- MULLER, H. J. Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: *The New Systematics*. Huxley J (ed). Oxford, Clarendon Press, pp.185-268, 1940.
- NASCIMENTO, G. A. F. Caracterização molecular dos genes Ankyrin e PlexinB e presença do endossimbionte *Wolbachia* em populações naturais de *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Pernambuco, 2013.

- O'GRADY, P. M.; KIDWELL, M. G. Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 22:442-453, 2002.
- OLIVEIRA G. F. Diversidade de drosofilídeos (Insecta, Diptera) em manguezais de Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.
- PAINTER, T. S. A cytological map of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Science** 73:647-648, 1931.
- PAPACEIT, M.; JUAN, E. Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. **Chromosome Research** 6:49-54, 1998.
- PATTERSON, J. T.; STONE W. S. Evolution in the genus *Drosophila*. Macmillan, New York, 610 pp, 1952.
- PÉREZ-SALAS S.; RICHMOND R. C.; PAVLOVSKY O.; KASTRITISIS, C. D.; EHRMAN, L.; DOBZHANSKY, T. The Interior semiespecies of *Drosophila paulistorum*. **Evolution** 24:519-527, 1970.
- POWELL J. R.; SEZZI E.; MORIYAMA E. N.; GLEASON J. M.; CACCONI, A. Analysis of a shift in codon usage in *Drosophila*. **Journal of Molecular Evolution** 57:s214–s225, 2003.
- POWELL, J. R. Progress and prospects in evolutionary biology: the *Drosophila* model. New York: Oxford University Press, 1997.
- POWELL, J.R.; DION, K.; PAPACEIT, M.; et al. Nonrecombining genes in a recombination environment: The *Drosophila* “dot” chromosome. **Molecular Biology Evolution** 28:825-833, 2011.
- REMSEN, J.; O'GRADY, P. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 24:249-264. 2002.
- ROBE, L. J. Relações filogenéticas no gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): uma abordagem molecular. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 303p, 2008.
- ROBE, L. J.; CORDEIRO, J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). **Genetica** 138:601-617, 2010.
- ROHDE, C.; MONTEIRO A. G. F.; CABRAL W. B. M. et al. 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, 2010.
- ROHDE, C.; GARCIA, A. C. L.; VALIATI, V. H.; VALENTE, V. L. S. Chromosomal evolution of sibling species of *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B). **Genetica** 126:77-78, 2006.

- ROHDE, C.; VALENTE, V. L. S. Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifthly different rearrangements. **Genetics and Molecular Biology** 35(4):966-979, 2012.
- RUSSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Molecular Biology Evolution** 12(3):391-404, 1995.
- SANTOS, R. A.; VALENTE, V. L. S. On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae) in an urban environment: ecological and cytogenetic observations. **Evolutionary Biology** 4:253-268, 1990.
- SILVA, D. M. I. O. Levantamento taxonômico da fauna de Drosophilidae em ambientes de Floresta Atlântica e Caatinga do Estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de Pernambuco, 2010.
- SPASSKY, B. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. **University Texas Publications** 5721:48-61, 1957.
- SPASSKY, R.; RICHMOND, R. C.; PEREZ-SALAS, S. et al. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. **Evolution** 25: 129-143. 1971.
- STURTEVANT, A. H. Further data on maternal effects in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 21:556-70, 1935.
- STURTEVANT, A. H. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of 23 new species. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 9:323-343, 1916.
- TAMURA, K., SUBRAMANIAN, S.; KUMAR, S. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. **Molecular Biology Evolution** 21:36-44, 2004.
- TARRÍO R., RODRIGUEZ-TRELLES F., AYALA F. J. Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: The *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. **Molecular Phylogenetics Evolution** 16:344-349, 2000.
- THROCKMORTON, L. H. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. Stud. Gent. II. **University Texas Publications** 6205:207-343, 1962.
- THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, Ecology, and Geography of *Drosophila*. in Robert C. King (Ed.) Hand Book of Genetics v.3, p.421-469. Plenum Publishing Corporation NY, 1975.

3.1 ANEXO

Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research

Author Guidelines

Aims and Scope

The *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* (JZSER) is a peer-reviewed, international forum for publication of high-quality research on systematic zoology and evolutionary biology. The aim of the journal is to provoke a synthesis of results from morphology, physiology, animal geography, ecology, ethology, genetics, population genetics, developmental biology and molecular biology.

General Information

Types of contribution: JZSER publishes Original Articles, Reviews, Short Communications, Letters to the Editors and Book Reviews.

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Preparation of Manuscripts

The following remarks may assist you in preparing your manuscript for submission to JZSER. We strongly encourage our authors to follow these guidelines as it facilitates both the peer-review and the editorial process.

Structure of manuscripts

The first page of the manuscript should contain the following information: title, name(s) of author(s), affiliation(s) of authors (including full address, phone and fax numbers, and email addresses), indication of corresponding author and up to five keywords.

The text of original articles should be divided into the following sections: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Second Summary (if required, in German, French, Italian or Spanish language and headed by an appropriate translation of the title of the paper), References, Figure Legends, List of Supporting Information (if available), and Tables (consecutively numbered).

Short communications can depart from this structure, e.g., by combining the **Results and Discussion** sections.

Units, abbreviations and nomenclature

The S.I. System is relevant to measures. All biological and chemical names, or other technical terms, should be given according to the most recent international nomenclature. Authorities of scientific names should be cited, but only once when the name appears in the text for the first time. Alternatively, if taxon names are listed in tables (e.g., specimen list) authorities may also be included there. It is not necessary to mention authorities in the title or summaries, unless the article is specifically taxonomic. Where commercially available substances, reagents, or equipment are used, the manufacturer's name and address (city and country is sufficient) should be provided in the 'Materials and Methods' section, along

with the generally accepted common name.

Scientific botanical and zoological species names, as well as Latin terminology such as *in vitro*, *in vivo*, *de novo* etc., will be printed in italics. They should either be typed as such, or underlined with a single straight line. Unless there is risk of ambiguity, names of species can be abbreviated on being mentioned a second time and thereafter throughout the text, thus, *Heterobasidion annosum* would become *H. annosum*.

Tables and Figures

Each figure and scheme should have a legend. These should be listed together at the end of the reference section of the text file rather than being included with the drawings in the graphics files. Each figure and table must have a reference in the text. It is essential that text and image files be kept separate. Please mark the position of tables/figures in the text.

References

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Literature will be quoted in the text with the year of publication, e.g. Mayr and Bock (2002) or (Mayr and Bock 2002). If more than one reference is quoted in the text, separate them by a semicolon, e.g. (Borkin 1999; Mayr and Bock 2000). If the same author is quoted with more than one source of the same year, mark them with a, b, etc. (e.g. Bock 2000a). If the cited literature has more than two authors, it should be quoted by the first author followed by et al. (e.g. Clark et al. 1999).

The list of references should only include publications cited in the text. The references have to be entered alphabetically, and must include the name(s) and initials of the author(s), year of publication in parentheses, title of paper, name of journal (abbreviated according to international rules, without dots), volume number (bold), page numbers. References to books must include surname(s) and initials of author(s), year of publication in parentheses, editor(s), complete title of the book edition, publisher, place of publication, page numbers.

Examples:

Journals: Larsen K, Wilson GDF (2002) Tanaidacean phylogeny, the first step: the superfamily Paratanaidoidea. *J Zool Syst Evol Res* **40**:205-222.

Books: Borkin LJ (1999) Distribution of amphibians in North Africa, Europe, Western Asia, and the former Soviet Union. In: Dulleman WE (ed), *Pattern of Distribution of Amphibians: Global Perspective*. John Hopkins University Press, Baltimore and London, pp 329-420.

Editor-in-Chief at the following address:

Priv.-Doz. Dr. Elisabeth Haring
Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research
Museum of Natural History Vienna
Central Research Laboratories
Burgring 7 A-1010 Vienna Austria
Tel: +43-1-52177332
Fax: +43-1-5235254
E-mail: elisabeth.haring@nhm-wien.ac.at