



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

Ana Patrícia da Costa

**Marcadores genéticos para diferenciação intraespecífica das subespécies de
Drosophila paulistorum e *D. equinoxialis* (Diptera, Drosophilidae) com
ocorrência em florestas úmidas da região Neotropical**

Vitória de Santo Antão-PE

2019

ANA PATRÍCIA DA COSTA

Marcadores genéticos para diferenciação intraespecífica das subespécies de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* (Diptera, Drosophilidae) com ocorrência em florestas úmidas da região Neotropical

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia da Conservação

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Rohde

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

C837m Costa, Ana Patrícia da

Marcadores genéticos para diferenciação intraespecífica das subespécies de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* (Diptera, Drosophilidae) com ocorrência em florestas úmidas da região Neotropical. / Ana Patrícia da Costa. - Vitória de Santo Antão, 2020.

62 folhas; il., tab.

Orientadora: Claudia Rohde.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2020.

Inclui referências.

1. Especiação Genética. 2. *Drosophila*. 3. Floresta Úmida. I. Rohde, Claudia (Orientadora). II. Título.

576.86 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-013/2020

ANA PATRÍCIA DA COSTA

Marcadores genéticos para diferenciação das semiespécies de *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae) com ocorrência em florestas úmidas da região Neotropical

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre.

DATA DA DEFESA: 28/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cristina Lauer Garcia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Geórgia Fernanda Oliveira (Examinadora Externa)
Secretaria Estadual de Educação de Pernambuco

Dra. Zilpa das Graças Silva de Melo (Examinadora Externa)
Companhia Pernambucana de Saneamento

Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

Salmos 91:2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me proporcionado equilíbrio e força espiritual, por ter sido minha luz, meu guia e minha força para que essa conquista fosse alcançada, na certeza de que sem tua presença nada disso seria possível.

A minha família, em especial a minha mãe pelo amor, pelas orações e compreensão. Não existem palavras que descrevam todo o amor que lhe tenho. Obrigada por ter sido porto e fortaleza para que eu chegasse até aqui. Agradeço também ao meu pai (*in memoriam*) que mesmo que sua passagem tenha sido tão cedo, dedico também a ti, pela certeza que onde estiveres também tens me transmitido força para seguir firme nos meus propósitos.

A minha Orientadora Claudia Rohde pela oportunidade e confiança a mim depositadas, pela acolhida, pelas palavras de incentivo e parceria em todos os momentos e, principalmente, por seus ensinamentos que serviram para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Agradeço a Deus por termos nos encontrado, e que a parceria e amizade construída permaneçam, afinal não encontro palavras que descrevam a admiração, gratidão e a importância que a senhora tem na minha vida. Obrigada professora, por tudo.

A minha querida amiga Zilpa Melo, por ter me ensinado desde o início a caminhar no mundo das drosófilas na biologia molecular. Saber que a caminhada por todo esse trajeto tem muito de ti, me faz a cada dia ter a certeza de que as pessoas não cruzam nossos caminhos por acaso, que tudo está nos propósitos de Deus. Obrigada Zilpa, por todo o ensinamento e parceria, pelas risadas contagiantes, pelas palavras positivas nos momentos difíceis, saiba que tudo isso foi fundamental, foi força para que eu chegasse aqui.

Ao professor Amaro Castro do IPA (Instituto Agronômico de Pernambuco), pela recepção e acolhida no laboratório, pelo apoio e ensinamentos que foram fundamentais na realização desse trabalho. Assim como a Flávia Araújo pela ajuda incansável e disponibilidade durante a realização dos processos experimentais, pela amizade sincera e palavras de apoio e incentivo em todos os momentos.

A minha amiga Marcela Oliveira, que cruzou minha vida durante a graduação, obrigada por ter sido força, quando ninguém acreditava em mim, por me

fazer enxergar que minha capacidade estava além do que eu imaginava, pelo apoio em todos os momentos. Você tinha razão, as coisas acontecem para aqueles que acreditam e lutam pelo que querem, não importa as circunstâncias. Agradeço a Deus por sua amizade sincera e que ela permaneça por toda a nossa vida.

A Marília Arruda que sempre esteve comigo desde a graduação e me incentivou nos meus objetivos. Muito obrigada por tudo, sua amizade quero levar por toda a vida.

Agradeço também a todos que fazem parte do Laboratório de Genética, especialmente a Anadeje Silva pela parceria, por ter estado sempre comigo em todas as etapas. Compartilhamos juntas todos os momentos, os de felicidade, assim como os de dificuldade que, no final, nos ajudaram a crescer. Obrigada por tudo.

Agradeço também a Rita Coutinho Silva e a Érima Amorim, pela presença e certeza de poder sempre contar com vocês, pela ajuda e incentivo, que me foram muito importantes nessa caminhada. A Aleson Silva, por sua amizade, por toda a ajuda e por sempre se mostrar prestativo, muito obrigada.

A Elaine Carvalho pelas palavras de reflexão e por suas orações que sempre trouxeram força espiritual para realização deste trabalho.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

O grupo *willistoni* de *Drosophila* é composto por espécies muito abundantes nas comunidades neotropicais da família Drosophilidae. O grupo inclui 24 espécies, sendo seis delas pertencentes ao subgrupo *willistoni*, constituído por espécies crípticas, semiespécies ou subespécies. Diversos estudos podem ser encontrados para *Drosophila paulistorum*, que é considerada uma superespécie, composta por seis subespécies (Amazônica, Andino-Brasileira, Centro-Americana, Interior, Orinocana e Transicional). Os estudos acerca das divergências evolutivas entre estas subespécies são realizados há décadas. As abordagens comportamentais (isolamento reprodutivo), de variações dos caracteres morfológicos taxonômicos, dos padrões diferenciados dos cromossomos, da sequencias de nucleotídeo de genes, e efeito de endossimbiontes, ilustram bem a importância de *D. paulistorum* para os estudos evolutivos. Nesse contexto, foi objetivo deste trabalho estabelecer marcadores moleculares para auxiliar em futuras investigações das subespécies de *D. paulistorum*, com enfoque em populações naturais, recentemente coletadas em florestas úmidas do Brasil. Diante dos resultados de sequenciamento, *Drosophila equinoxialis* foi também incluída nas análises dos genes COI, COII, Ankyrin e PlexinB, e na caracterização inicial do endossimbionte *Wolbachia pipientis*. Diante da variabilidade encontrada nas espécies aqui estudadas, os resultados sugerem que diferentes genes são úteis para a diferenciação de diferentes níveis taxonômicos (espécies e subespécies), tomando como referência as amostras de indivíduos recentemente coletados em florestas úmidas do Brasil.

Palavra-chave: Floresta Amazônica. Genes mitocondriais. Genes nucleares. Subespécies. Especiação.

ABSTRACT

The *willistoni* group of *Drosophila* is composed of very abundant species in the neotropical communities of the family Drosophilidae. The group includes 24 species, six of which belonging *willistoni* subgroup and consists of cryptic, semi-species or subspecies. Several studies can be found for *Drosophila paulistorum*, which is considered a superspecies, composed of six subspecies (Amazonian, Andean-Brazilian, Central American, Interior, Orinocana and Transitional). Studies on the evolutionary divergences between the subspecies have been conducted for decades. Behavioral approaches (reproductive isolation), variations in taxonomic morphological characters, differentiated chromosome patterns, nucleotide gene sequences, and endosymbiont effects illustrate the importance of *D. paulistorum* for evolutionary studies. In this context, the objective of this work was to establish molecular markers to assist in future investigations of *D. paulistorum* subspecies, focusing on natural populations recently collected from Brazilian rainforests. Given the sequencing results, *Drosophila equinoxialis* was also included in the analysis of the COI, COII, Ankyrin and PlexinB genes, and in the initial characterization of the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Given the variability found in the species studied here, the results suggest that different genes are useful for the differentiation of different taxonomic levels (species and subspecies), taking as reference the samples of individuals recently collected in Brazilian rainy forests.

Keywords: Amazon rainforest. Mitochondrial genes. Nuclear genes. Subspecies. Speciation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema filogenético entre os principais grupos do gênero <i>Drosophila</i> (FLYBASE, 2010).	18
Figura 2. Distribuição geográfica do subgrupo <i>willistoni</i> .	19
Figura 3. Fêmea de <i>Drosophila paulistorum</i> .	21
Figura 4. Distribuição geográfica da superespécie <i>D. paulistorum</i> (linha pontilhada) e das subespécies (pontos coloridos).	23
Figura 5. Hipandrium das espécies do subgrupo <i>willistoni</i> de <i>Drosophila</i> .	24
Figura 6. Gel de eletroforese revelado para a enzima Fosfatase ácida-1 para identificação ao nível de espécie do subgrupo da <i>willistoni</i> de <i>Drosophila</i> .	24
Figura 7. Imagens de microscopia de luz da genitália de machos (hipandrium) das subespécies de <i>Drosophila paulistorum</i> .	25
Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de hipandrium de machos das subespécies de <i>Drosophila paulistorum</i> .	25
Figura 9. Imagem da endobactéria <i>Wolbachia pipientis</i> (em vermelho) infectando células do sistema reprodutivo de uma fêmea hospedeira <i>Aedes aegypti</i> .	26
Figura 10. Árvore de inferência Bayesiana baseada em dados morfológicos, genes nucleares (<i>Adh</i> , <i>kl-3</i> , <i>Hb</i> , <i>Ddc</i> , <i>per</i>) e genes mitocondriais (<i>COI</i> , <i>COII</i> , <i>Cytb</i>) obtidos por Zanini <i>et al.</i> (2018) para amostras cultivadas de espécies e subespécies do grupo <i>willistoni</i> (subgrupos <i>willistoni</i> e <i>bocainensis</i>) de <i>Drosophila</i> .	28
Artigo 1	
Figura 1. Imagens do hipandrium obtidas de machos das isolinhagens estabelecidas a partir da coletada em Marituba (MRI), Pará. MRI 5, 3, 1 e 9 são <i>Drosophila equinoxialis</i> e MRI 8 é <i>D. paulistorum</i> .	35
Figura 2. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene <i>COI</i> para 22 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> . Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.	36
Figura 3. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene <i>COII</i> para 18 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> . Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.	37
Figura 4. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene <i>Ankyrin</i> para 18 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> . Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.	38
Figura 5. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene <i>PlexinB</i> para 30 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> . Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.	39

Figura 6. Nucleotídeos variáveis (em cores) para o gene COI, entre as 22 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> .	40
Figura 7. Nucleotídeos variáveis (em cores) para o COII entre as 18 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> .	40
Figura 8. Nucleotídeos variáveis (em cores) para o gene Ankyrin entre as 18 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> .	41
Figura 9. Nucleotídeos variáveis (em cores) para o gene PlexinB entre as 30 amostras de <i>D. paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> .	42
Figura 10. Nucleotídeos variáveis (em cores) para todos os genes nas amostras de <i>D. equinoxialis</i> .	43

Artigo 2

Figura 1. Gel de agarose 1,5%, com resultados da amplificação parcial do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia pipientis</i> , com cerca de 700 pares de bases, em amostras de <i>Drosophila paulistorum</i> (AM, Amazônica, linhagem MRI 8; AB, Andino-Brasileira, Mesitas; OR, Orinocana, O11) e <i>D. equinoxialis</i> (linhagens MRI 1, MRI 3, MRI 5, MRI 9), coletadas em Marituba, Pará, Brasil, além de amostras de <i>Drosophila willistoni</i> (GUA, Reserva de Guaribas, Paraíba) e água destilada (H ₂ O). DNA Ladder de 1 kb (Kasvi) como marcador de tamanho de fragmentos.	52
---	----

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Descrição das amostras de *Drosophila paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. pavlovskiana*, do subgrupo *willistoni* investigadas para a variabilidade dos genes Citocromo oxidase subunidade I (COI), Citocromosoma oxidase II (COII), Ankyrin e PlexinB. A origem geográfica das populações está representada pelo nome do local original de coleta, a cidade e/ou estado (PE=Pernambuco, CE=Ceará, SP=São Paulo, RO=Rondônia, PA=Pará), seguido do país. **33**

Tabela 2. Descrição dos *primers* utilizados para amplificar os genes mitocondriais Citocromo oxidase I (COI), Citocromo oxidase II (COII) e os genes nucleares Ankyrin e PlexinB nas amostras de *Drosophila paulistorum* e *Drosophila equinoxialis*. **44**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus centígrados

µL - microlitro

Ank – gene Ankyrin

COI – gene Citocromo c oxidase subunidade I

COII – gene Citocromo c oxidase subunidade II

D. - *Drosophila*

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados (A, T, C, G)

Ma – Milhões de anos

mg - miligramas

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

min - minutos

mL - mililitro

PCR - Reação em cadeia polimerase

Plx – gene PlexinB

Rpm - Rotação por minuto

seg - segundos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1 O gênero <i>Drosophila</i>	17
4.2 Grupo <i>willistoni</i>	18
4.3 <i>Drosophila equinoxialis</i>	20
4.4 <i>Drosophila paulistorum</i>	21
4.5 Metodos de identificação de <i>Drosophila paulistorum</i> e suas subespécies.....	23
4.6 <i>Wolbachia pipientis</i> como agente de especiação em <i>Drosophila</i>	25
4.7 Estudos de genes mitocondriais e nucleares	26
5 RESULTADOS.....	30
Artigo 1: Caracterização genética de subespécies de <i>Drosophila paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> com ocorrência em Florestas úmidas do Brasil.....	30
Artigo 2: Análise de <i>Wolbachia</i> em amostras recentes de <i>Drosophila paulistorum</i> e <i>D. equinoxialis</i> da Floresta Amazônica do Pará, Brasil	49
6 CONCLUSÃO GERAL	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Os subgêneros *Sophophora* e *Drosophila* correspondem a 90% da riqueza de espécies do gênero *Drosophila*, o qual é o mais especioso dentro da família Drosophilidae (BÄCHLI, 2019). O gênero *Drosophila* é o mais abundante e de interesse em estudos genéticos dentro desta família, abrangendo o grupo *willistoni*, composto por 24 espécies, distribuídas nos subgrupos *willistoni*, *alagitans* e *bocainensis*, com grande dispersão geográfica na região neotropical, que compreende desde a Flórida/EUA até o Uruguai e Norte da Argentina (VAL *et al.*, 1981).

Dentro do subgrupo *willistoni* há seis espécies crípticas, denominadas *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. insularis*, *D. tropicalis*, *D. equinoxialis* e *D. pavlovskiana* (CUNHA *et al.*, 1950). Diversas metodologias têm sido propostas para auxiliar na identificação destas espécies crípticas, entre elas, destacam-se a análise dos cromossomos politênicos (ROHDE *et al.*, 2006), e da genitália dos machos (ROHDE *et al.*, 2010; ZANINI *et al.*, 2015). Em qualquer uma destas opções, as dificuldades são grandes por envolver um trabalho minucioso de diferenciação, ou um bom conhecimento do pesquisador sobre estruturas morfológicas ou cromossômicas, ou recursos financeiros e equipamentos custosos para a aplicação de metodologias moleculares, envolvendo o sequenciamento de genes marcadores e detecção de variabilidade espécie-específica. Esta realidade tem dificultado o avanço dos estudos genético-evolutivos envolvendo as espécies do subgrupo *willistoni* e outras tantas encontradas especialmente nas florestas úmidas da região Neotropical.

O sequenciamento completo dos genomas de 12 espécies do gênero *Drosophila* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007) teve papel relevante no conhecimento genético de diversas espécies de drosofilídeos, entre elas *Drosophila willistoni*, a única espécie com ocorrência exclusiva na região neotropical investigada neste trabalho.

Uma de suas espécies crípticas, *Drosophila paulistorum* é de muito interesse evolutivo, e seu genoma também está sendo sequenciado no momento (Miller, comunicação pessoal). *D. paulistorum* se caracteriza como uma *superespécie*, composta por diversas subespécies (ZANINI *et al.*, 2018), algumas com capacidade

de gerar híbridos entre si (AMADON, 1967). Estudos sistemáticos de cruzamento entre diferentes linhagens de *D. paulistorum* revelaram a existência de seis subespécies como sugerido por Zanini *et al.* (2018), que estão, aos poucos, sendo melhor investigadas com metodologias modernas de sequenciamento e análise de genes, além de microscopia de varredura das estruturas da genitália (ZANINI *et al.*, 2018). As seis subespécies são denominadas Andino-Brasileira, Amazônica, Centroamericana, Orinocana, Transicional e Interior (DOBZHANSKY; SPASSKY, 1959), e embora tenham sido descritas como morfologicamente muito semelhantes, exibem um isolamento taxonômico definido por diversos fatores, tais como os etológicos envolvidos no cruzamento (DOBZHANSKY; SPASSKY, 1959; EHRMAN; POWELL, 1982), os cromossômicos (como ordem e presença de inversões específicas) (ROHDE *et al.*, 2006), a presença de endossimbiontes subespécie-específicos (MILLER *et al.*, 2010), entre outros.

2 JUSTIFICATIVA

Devido a dificuldade de identificar taxonomicamente indivíduos oriundos de coletas recentes, e considerando a complexidade evolutiva existente dentro do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, principalmente dentro da superespécie *Drosophila paulistorum*, há uma exigência de mais estudos para resolver incertezas taxonômicas e obter conclusões mais completas e definitivas sobre esses indivíduos (KASTRITSIS, 1967; DOBZHANSKY; POWELL, 1975).

É sabido que as duas espécies com maior número de subespécies reconhecidas, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, estão espalhadas em uma ampla região geográfica, compartilhando entre si uma extensa área simpátrica, principalmente na região amazônica do Brasil, a mais estudada. Isso torna este rico bioma um local ideal para estudos de especiação no subgrupo *willistoni*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer marcadores genéticos eficientes para identificação das subespécies de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar padrões dos marcadores moleculares de genes mitocondriais (COI e COII e nucleares (PLEX B e ANK) para amostras recentes das subespécies que compõe as espécies crípticas *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis*;
- ✓ Contribuir para a melhoria na caracterização das subespécies, dos seus níveis de divergência evolutiva, e da sua ocorrência nas florestas úmidas do Brasil.
- ✓ Analisar a ocorrência do endossimbionte *Wolbachia pipientis* em amostras de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* em uma amostra recente da Floresta Amazônica;

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

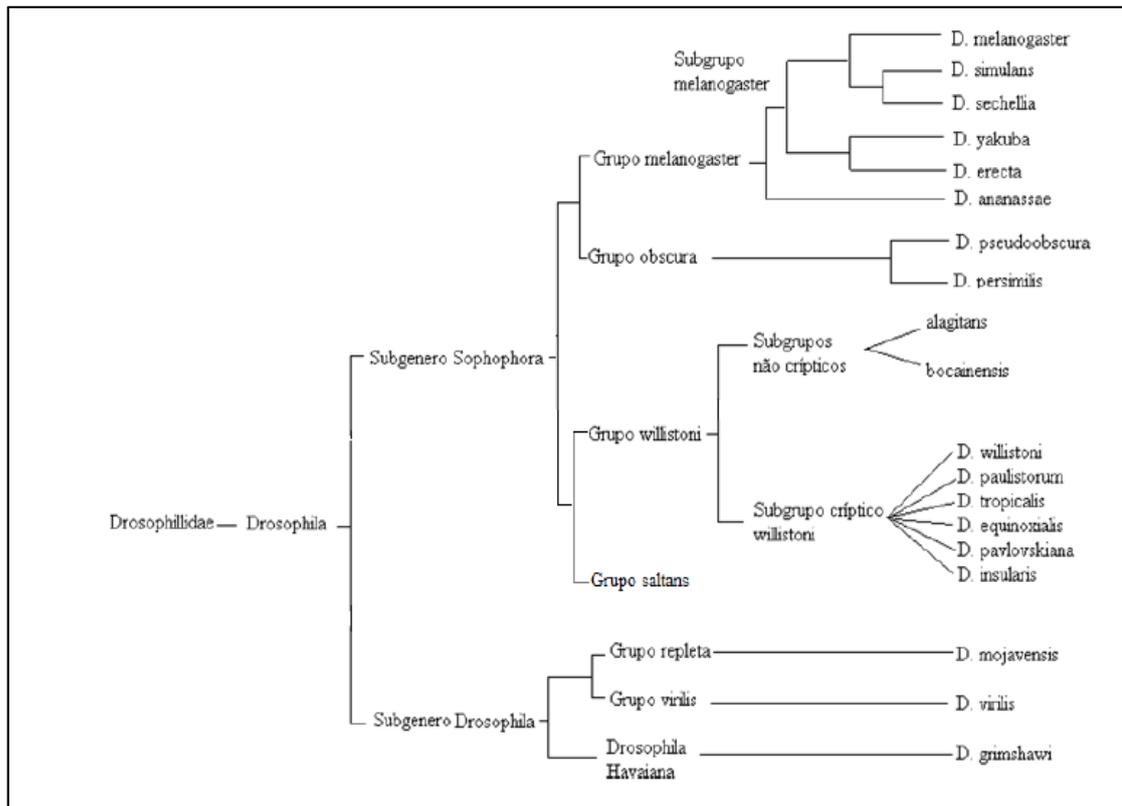
4.1 O gênero *Drosophila*

Dos 78 gêneros que compoem a família Drosophilidae, com suas mais de 4 mil espécies conhecidas, encontra-se o gênero *Drosophila* FALLEN 1823 (**Figura 1**). O gênero *Drosophila* é o maior não só em número de espécies conhecidas, com mais de 1200, como o mais amplamente distribuído geograficamente, dentro da família Drosophilidae (BÄCHLI, 2019). Este se divide em oito subgêneros: *Chusqueophila*, *Dorsilopha*, *Drosophila*, *Dudaica*, *Phloridosa*, *Psilodorha*, *Siphlodora* e *Sophophora* (BÄCHLI, 2019). Dois subgêneros de *Drosophila* são os de maior destaque em estudos genéticos e evolutivos, *Drosophila*, constituído por pelo menos 775 espécies conhecidas, e *Sophophora*, com 340 (BÄCHLI, 2019). Estes dois subgêneros correspondem a aproximadamente 90% das espécies da família Drosophilidae e são, por isso, os subgêneros mais estudados (MARKOW; O'GRADY, 2005).

Nesse cenário, a espécie de drosofilídeo mais conhecida é, sem dúvida, *Drosophila melanogaster*, que vem sendo estudada desde o início dos anos 1900 pelo famoso grupo de Thomas Morgan, sendo a primeira espécie do gênero a ter seu genoma totalmente sequenciado (ADAMS *et al.*, 2000).

Ainda que um grupo super estudado é relevante dizer que devido a sua elevada abundância nos mais variados ambientes tropicais em que ocorrem, especialmente na região Neotropical, sua contagem e identificação taxonômica são tarefas árduas para os grupos de pesquisadores que se dedicam a realizar coletas em campo e realizar estudos genéticos e evolutivos em laboratório.

Figura 1. Esquema filogenético entre os principais grupos do gênero *Drosophila*



Fonte: (FLYBASE, 2010).

4.2 Grupo *willistoni*

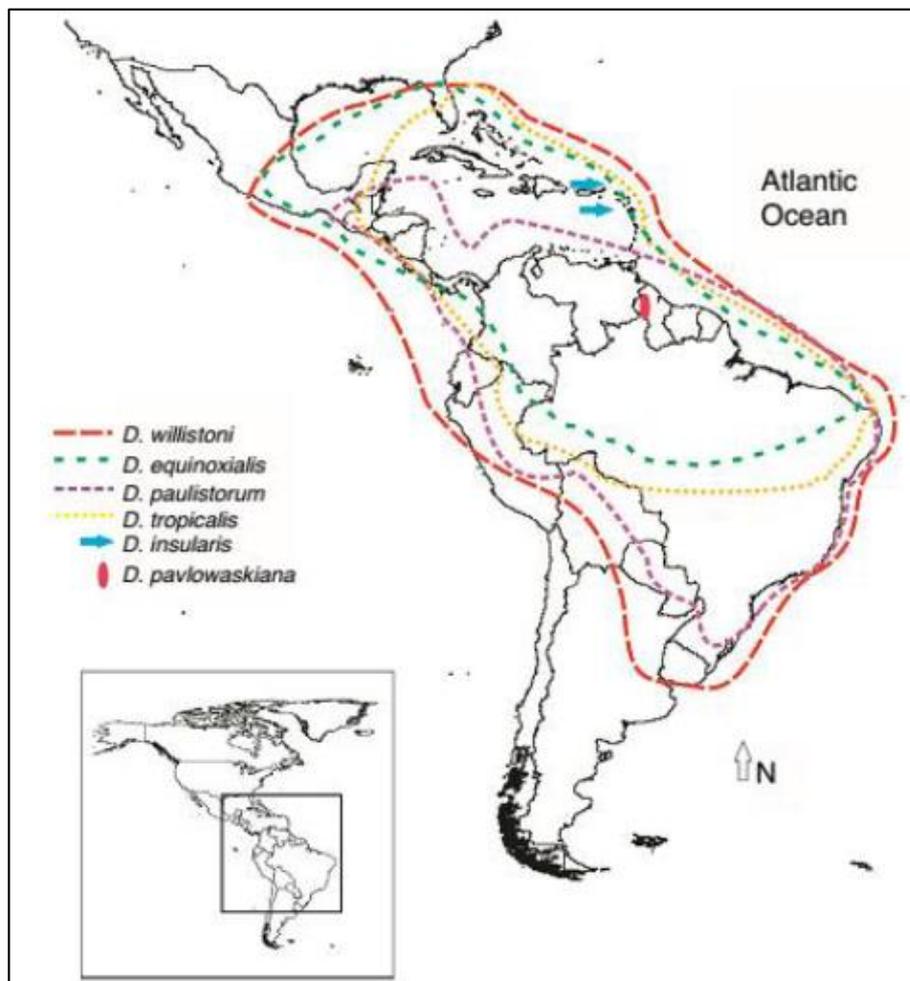
O grupo *willistoni* pertence ao subgênero *Sophophora*. Este subgênero foi consolidado por Sturtevant (1939) como o segundo maior dentro do gênero *Drosophila*, tendo atualmente 340 espécies conhecidas, que se organizam nos grupos *dentíssima*, *dispar*, *fima*, *melanogaster*, *obscura*, *populi*, *saltans*, *setifemur* e *willistoni* (BACHLI, 2019) tendo como os seus quatro grupos principais – *melanogaster*, *obscura*, *saltans* e *willistoni* (POWELL, 1997).

O grupo *willistoni* é um dos mais abundantes na região Neotropical e inclui 24 espécies, divididas em três subgrupos: *alagitans*, *bocainensis* e *willistoni* (BÄCHLI, 2019). O subgrupo *willistoni* é composto por espécies que têm sido modelos para muitos estudos evolutivos desde a segunda metade do século passado (SPASSKY *et al.*, 1971). Engloba espécies em vários níveis taxonômicos e em estágios evolutivos distintos, caracterizados pelos diferentes graus de isolamento reprodutivo (SPASSKY *et al.*, 1971). O grupo *willistoni* como um todo possui desde espécies

com ampla distribuição Neotropical, como *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* e *D. tropicalis* (subgrupo *willistoni*), até espécies restritas geograficamente, como *D. insularis* e *D. pavlovskiana* (**Figura 2**).

Segundo Garcia *et al.* (2006) o subgrupo *willistoni* é um dos mais notáveis e abundantes grupos de drosofilídeos da região neotropical. *Drosophila willistoni* é uma das mais abundantes espécies em florestas quentes e úmidas, apresentando significativas flutuações sazonais (HOENIGSBERG *et al.*, 1977; SENE *et al.*, 1980; VALENTE *et al.*, 1981; BIZZO; SENE, 1982; MARTINS, 1987; GARCIA *et al.*, 2014; ROQUE *et al.*, 2017; COUTINHO-SILVA *et al.*, 2017). Da mesma forma, *D. paulistorum* é uma espécie bem representada nas florestas úmidas (MONTEIRO *et al.*, 2016), e até mesmo na Caatinga (GARCIA *et al.*, 2014), respondendo rapidamente às mudanças ambientais, com declínio de suas frequências associado a ambientes mais perturbados e com menor umidade (GARCIA *et al.*, 2008).

Figura 2. Distribuição geográfica do subgrupo *willistoni*.



Fonte: Zanini *et al.*, (2015).

O subgrupo *willistoni* se constitui por seis espécies crípticas, denominadas *Drosophila willistoni* Sturtevant (1916), *D. paulistorum* Dobzhansky e Pavan (BURLA *et al.*, 1949), *D. equinoxialis* Dobzhansky (1946), *D. tropicalis* Burla e Cunha (BURLA *et al.*, 1949), *D. insularis* Dobzhansky (DOBZHANSKY *et al.*, 1957) e *D. pavlovskiana* Kastritsis e Dobzhansky (1967) (VAL *et al.*, 1981). De acordo com Mayr *et al.* (1953), espécies crípticas são duas ou mais populações Mendelianas ou espécies que não cruzam entre si, mas cujos indivíduos são muito similares morfologicamente.

Este subgrupo mostra vários níveis taxonômicos, com sucessivos graus de isolamento reprodutivo (ERHMAN; POWELL, 1982). Por exemplo, *D. willistoni* apresenta duas subespécies, *willistoni* e *quechua* (AYALA, TRACEY, 1973); *D. tropicalis* apresenta as subespécies *tropicalis* e *cubana* (TOWNSEND, 1954) e *D. equinoxialis*, as subespécies *equinoxialis* e *caribbensis* (AYALA *et al.*, 1974). Desde o trabalho de Dobzhansky e Spassky (1959) é demonstrado que *D. paulistorum* é uma superespécie composta de seis subespécies: Amazônica, Andino-Brasileira, Centro-Americana, Interior, Orinocana e Transicional.

4.3 *Drosophila equinoxialis*

Dobzhansky (1946) descreveu *Drosophila equinoxialis*, ressaltou a sua alta similaridade com *D. willistoni* e com isso a incluiu no grupo *willistoni*, naquele momento composto pelas espécies *D. capricorni*, *D. sucinea*, *D. nebulosa*, *D. fumipennis* e *D. subinfumata*, além de *D. paulistorum* e *D. willistoni*. Foi separado *D. equinoxialis* em duas subespécies, *D. e. equinoxialis* (AYALA *et al.*, 1974) e *D. e. caribbensis* (AYALA *et al.*, 1974), a segunda sendo encontrada apenas nas ilhas de Porto Rico, Hispaniola e Costa Rica. Segundo os autores, tanto aspectos genéticos quanto reprodutivos diferenciam as duas subespécies de *D. equinoxialis*. Os resultados encontrados indicam uma genética na formação de subespécies (AYALA, TRACEY; 1973).

Tanto *D. equinoxialis* como sua espécie críptica *D. tropicalis* possuem preferência por habitats de florestas mais secas como as savanas, ou as encontradas na costa caribenha da Colômbia, Venezuela e Guiana (SPASSKY *et al.*,

1971). E nos ambientes de algumas ilhas das Antilhas, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis* convivem com a espécie endêmica *Drosophila insularis* (SPASSKY *et al.*, 1971).

As espécies *D. willistoni*, *D. tropicalis*, *D. equinoxialis* e *D. paulistorum* ocorrem em simpatria desde a Guatemala até o Brasil Central. Recentemente, na região Nordeste do Brasil foi descrita a ocorrência de *D. equinoxialis*, juntamente com *D. willistoni* e *D. paulistorum*, em algumas localidades do Estado de Pernambuco (ROHDE *et al.*, 2010).

4.4 *Drosophila paulistorum*

Drosophila paulistorum (**Figura 3**) não é uma espécie unificada, mais sim um complexo de raças geográficas ou de espécies em *statu nascendi* que formam a superespécie *D. paulistorum* (DOBZHANSKY; SPASSKY, 1959). Segundo Mayr (1963, 1969) e Amadon (1967), superespécie é definida como “um grupo monofilético de espécies intimamente relacionadas e em grande parte ou inteiramente alopátricas” ou “um grupo de táxons inteira ou essencialmente alopátricos que foram outrora raças de uma única espécie, mas que agora atingiram o status de espécies”. As formas que compõem uma superespécie devem ser denominadas “semiespécies” quando parecem ser subespécies, mas se aproximam ou talvez já tenham atingido o estado de espécie (AMADON, 1967).

Zanini *et al.* (2018) realizaram ampla abordagem de caracteres morfológicos e moleculares, optando por definir as semiespécies como subespécies. Essa definição mais atual de subespécie, será utilizada ao longo deste texto, para referenciar *D. paulistorum* Andino-Brasileira, Amazônica, Centro-Americana, Orinocana, Transicional (DOBZHANSKY; SPASSKY, 1959) e Interior (PÉREZ-SALAS *et al.*, 1970). As subespécies foram descritas como morfológicamente idênticas, contudo apresentam um forte isolamento etológico (EHRMAN; POWELL 1982).

Figura 3. Fêmea de *Drosophila paulistorum*.

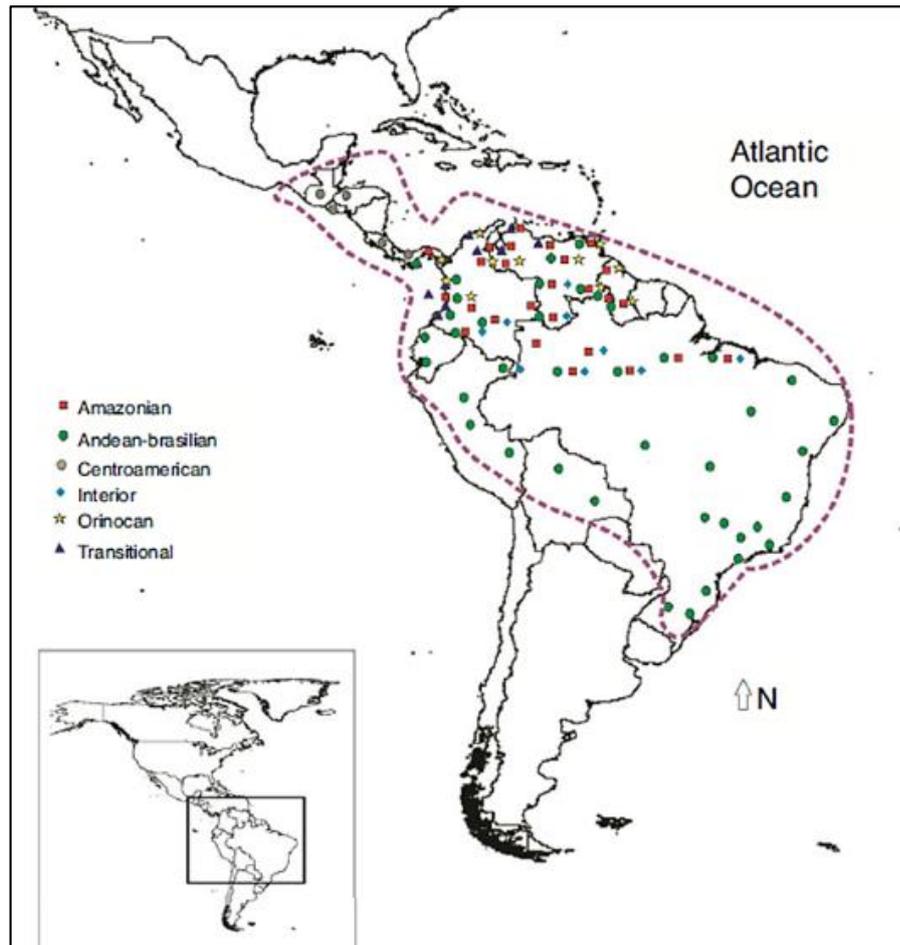


A subespécie Andino-Brasileira é relatada como a de maior distribuição geográfica (EHRMAN; POWELL 1982), sendo encontrada desde o Noroeste da Colômbia e parte adjacente da Venezuela, Trinidad e Guiana central até o sul do Brasil (Rio Grande do Sul); e do lado oriental dos Andes até a costa Atlântica do Brasil. Ocorre em simpatria com as subespécies Amazônica, Interior e Orinocana, principalmente ao norte do rio Amazonas e na nascente do Orinoco (SPASSKY *et al.*, 1971; ZANINI *et al.*, 2015).

A subespécie Amazônica se distribui do Panamá e Trinidad, na América Central, até o estuário do Amazonas e Tocantins, no Brasil. Esta subespécie tem uma ampla ocorrência e maior abundância nas bacias dos rios Negro e Orinoco, assim como ao longo do rio Amazonas. Vive em simpatria com Andino-Brasileira, Orinocana e Interior (SPASSKY *et al.*, 1971). A subespécie Interior vive ao sul de Llanos, na Colômbia; nas proximidades do Rio Negro, na nascente do Orinoco e na nascente do Amazonas e seus afluentes.

A subespécie Orinocana parece estar confinada à costa caribenha do Norte da Colômbia e Venezuela e não ocorre em simpatria com Interior (SPASSKY *et al.*, 1971). A subespécie Centro-Americana ocorre na Guatemala, Honduras, El Salvador, Costa Rica e oeste do Panamá. É simpátrica com Amazônica e Orinocana na região central do Panamá (Zona do Canal e áreas adjacentes). Por fim, a subespécie Transicional é encontrada na costa Oeste úmida da Colômbia e juntamente com Orinocana no maciço de Santa Marta e com Andino-Brasileira e Amazônica no Norte da Venezuela (**Figura 4**).

Figura 4. Distribuição geográfica da superespécie *D. paulistorum* (linha pontilhada) e das suas subespécies (pontos coloridos).



Fonte: Zanini *et al.*, (2015).

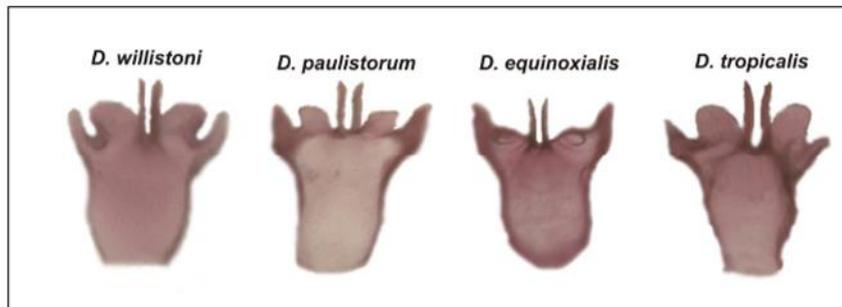
4.5 Metodos de identificação de *Drosophila paulistorum* e suas subespécies

Muitos métodos têm sido propostos para a identificação das espécies do subgrupo *willistoni*, tais como cruzamentos direcionados com linhagens conhecidas (CORDEIRO; WINGE, 1995), análise dos cromossomos politênicos (BURLA *et al.*, 1949; ROHDE *et al.*, 2006), e avaliação do padrão sonoro emitido pelo batimento das asas dos machos durante a corte sexual (RITCHIE; GLEASON, 1995). A genitália masculina é muito utilizada para a identificação das espécies crípticas do gênero *Drosophila* (ZANINI *et al.*, 2015), conforme indicado na **Figura 5**.

Apesar de eficientes, todos os métodos são muito trabalhosos e a identificação de um grande número de indivíduos é demorada. Garcia *et al.*, (2006) apresentaram um método mais rápido para a identificação das espécies do subgrupo *willistoni*, baseado na migração eletroforética da enzima Fosfatase ácida-1

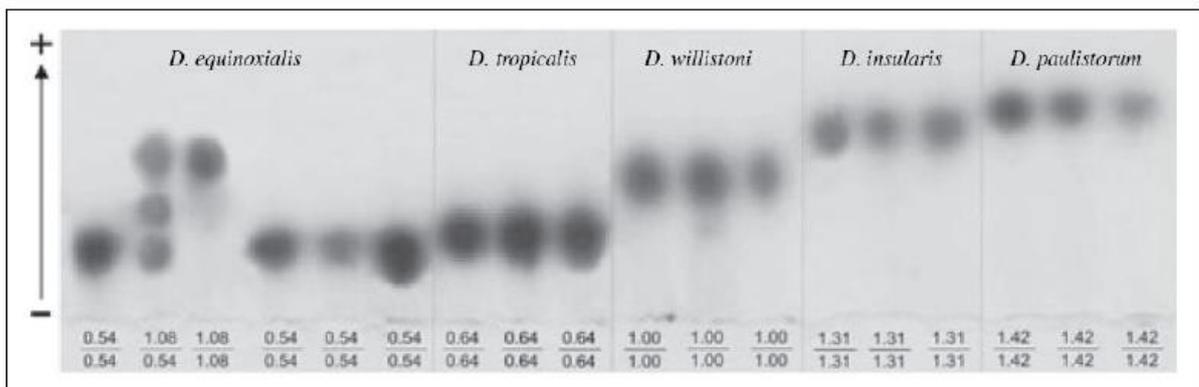
(AcpH-1). A metodologia revela alelos diagnósticos (**Figura 6**) para cada espécie críptica. Essa metodologia, no entanto, não permite diferenciar as subespécies de *D. paulistorum* ente si.

Figura 5. Hipandrium das espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*.



Fonte: Rohde *et al.* (2010).

Figura 6. Gel de eletroforese revelado para a enzima Fosfatase ácida-1 para identificação ao nível de espécie do subgrupo da *willistoni* de *Drosophila*.



Fonte: Garcia *et al.* (2006).

Novas abordagens, com enfoque nas características da genitália de machos das subespécies de *D. paulistorum* têm sido propostas por Zanini *et al.* (2015), com técnicas combinadas de microscopia de luz (**Figura 7**) e eletrônica (**Figura 8**).

Segundo os autores, machos de *D. paulistorum* Andino-Brasileiro apresentam hipândrio com a forma quadrada e dentes muito próximos, que são até duas vezes a altura dos lobos. Centroamericana apresenta um hipândrio retangular, que é o mais alongado no subgrupo de *D. willistoni*, lóbulos em forma irregular, dentes muito próximos. Interior é semelhante à Andino-Brasileira, porém as extensões laterais não são contínuas com os lobos e não existe intervalo entre os dentes e os lobos. Em

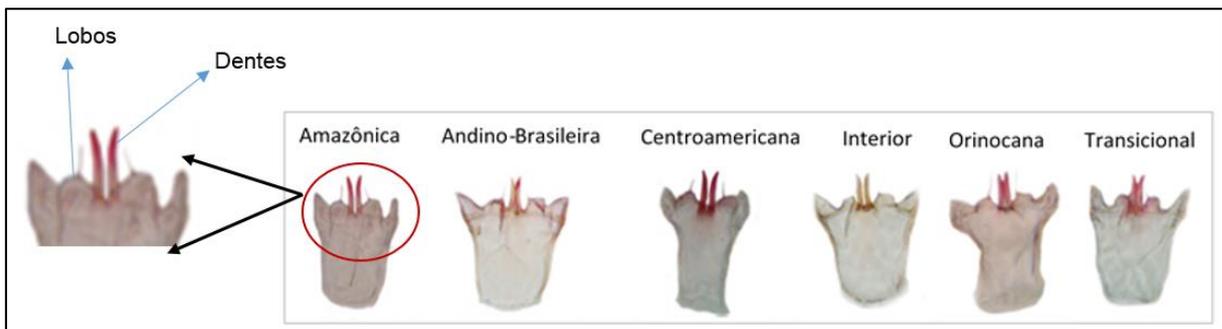
Orinocana o hipândrio é o menor do subgrupo, tem forma quadrada com pequenos lobos redondos. Transicional apresenta um hipandrium quadrado, pequenos lobos redondos, próximos dos dentes.

Figura 7. Imagens de microscopia de luz da genitália de machos (hipandrium) das subespécies de *Drosophila paulistorum*.



Fonte: Modificada de ZANINI *et al.* (2015).

Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de hipandrium de machos das subespécies de *Drosophila paulistorum*.



Fonte: Modificada de Zanini *et al.*, (2015).

4.6 *Wolbachia pipientis* como agente de especiação em *Drosophila*

Embora existam várias classificações descritas, e diversos termos empregados, há atualmente a ideia global de que as interações simbióticas são fontes de inovações evolutivas (ALMERÃO, 2009). Existem muitos exemplos de interações simbióticas entre os mais variados táxons (PARECER; AHMADJIAN, 2000), dentre os simbiontes, *Wolbachia pipientis* destaca-se por ter uma ampla distribuição, variedade de hospedeiros (RIEGLER; O'NEILL, 2006; FRYDMAN, 2007; HAMM *et al.*, 2014). É um dos patógenos que infectam o sistema reprodutivo dos insetos (**Figura 9**), sendo transmitido, através de herança materna. Hertig; Wolbach (1924) foram os primeiros a detectar *W. pipientis* em ovários do mosquito

Culex pipiens, caracterizada como organismo pertencente ao filo das Proteobactérias, classe das Alphaproteobactérias, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae.

Figura 9. Endobactéria *Wolbachia pipientis* (em vermelho) infectando células do sistema reprodutivo de uma fêmea hospedeira *Aedes aegypti*.



Fonte: <http://agencia.fapesp.br/bacteria-pode-atuar-como-vacina-para-dengue/16274/>.

Drosophila paulistorum tem sido relatada como um dos exemplos com efeitos significantes da interferência de *W. pipientis* na escolha das fêmeas durante o acasalamento (MILLER *et al.*, 2010). Por ser um complexo de seis subespécies, existe um estreito relacionamento evolutivo entre elas, com chance de produção de híbridos interespecíficos em certas condições. Três mecanismos de isolamento entre as subespécies são conhecidos: o isolamento sexual antes da cópula (pré-zigótico) devido ao comportamento sexual, a esterilidade dos híbridos, e a inviabilidade dos descendentes após a cópula (EHRMAN; KERNAGHAN, 1971). Segundo Miller *et al.* (2010) as subespécies de *D. paulistorum* apresentam entre si variantes de *W. pipientis* que são capazes de induzir o isolamento pré-zigótico entre indivíduos que possuem diferentes variantes desta bactéria.

4.7 Estudos de genes mitocondriais e nucleares

O material genético das mitocôndrias é constituído de uma molécula de DNA circular, presente em várias cópias. Entre os seres vivos, existe muita variação referente ao tamanho do DNA mitocondrial (DNAMt), porém o seu conteúdo e organização são muito conservado (MATIOLI, 2001).

O genoma mitocondrial codifica dois RNAs ribossomais (rRNA), 22 RNAs transportadores e 13 RNAs mensageiros (mRNA), que codificam enzimas da cadeia

respiratória e componentes da membrana interna. Segundo Simon (1994), enquanto as taxas evolutivas dos genes mitocondriais de rRNA variam consideravelmente ao longo da molécula, genes de tRNA evoluem, em geral, mais lentamente que os genes mitocondriais codificadores. Ainda segundo o autor, o DNAm_t evolui mais rapidamente, em cerca de 5 a 10 vezes do que o genoma nuclear. Isso possibilita a análise de sequências de nucleotídeos de evolução rápida no estudo de polimorfismos nas populações e, especialmente, entre espécies muito próximas filogeneticamente (POWELL, 1983).

Entre os genes mitocondriais mais estudados, os genes Citocromo oxidase subunidade I (COI) e Citocromo oxidase subunidade II (COII) que codificam para as subunidades I e II do citocromo C respectivamente, possuem um papel fundamental na construção da proteína transportadora de elétrons, que é muito importante durante a respiração celular (ROBE, *et al.*, 2010). O gene COI possui características que o tornam adequado como marcador molecular para estudos evolutivos (LUNT *et al.*, 1996). Primeiramente, COI tem sido bem estudado bioquimicamente e o seu tamanho e estrutura parecem ser conservados em todos os organismos investigados (SARASTE, 1990). Segundo, COI é o maior gene das subunidades da citocromo c oxidase, e quando comparado as subunidades II e III apresenta aproximadamente o dobro de tamanho destas (LUNT, *et al.* 1996).

Com base na sua importância para estudos filogenéticos, genes mitocondriais vêm sendo utilizados em vários estudos com diversos grupos de drosofilídeos. Como a espécie *Drosophila saltans*, *D. obscura* (O'GRADY, 1999), *D. takahashii* e *D. montium* (GOTO *et al.*, 2000) e *D. buzzatii* (MANFRIN *et al.*, 2001). Goto e Kimura (2004) em seus estudos filogenéticos com *D. melanogaster* destacam a utilidade destes marcadores para estabelecimento de filogenias.

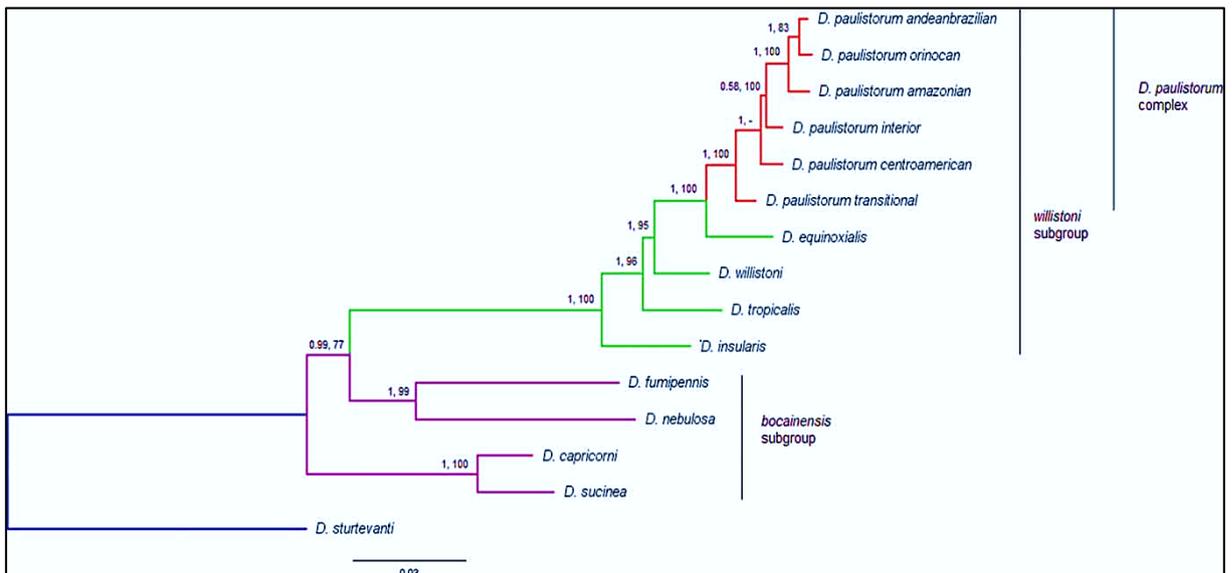
Oliveira (2016) utilizou os genes COI e COII para investigar a diversidade genética entre diferentes populações geográficas de *Drosophila nebulosa* (subgrupo *bocainensis*, grupo *willistoni*). Com base em seus resultados a autora aponta o uso desses genes como um eficiente marcador molecular na identificação taxonômica da espécie, visto sua baixa diferenciação em *D. nebulosa*.

De acordo com estudo de Robe *et al.*, (2010) foram retomadas as avaliações evolutivas para as espécies do grupo *willistoni*, a partir do sequenciamento dos genes mitocondriais Citocromo c oxidase subunidade I (COI) e Citocromo c oxidase

subunidade II (COII), e também quatro genes nucleares, Álcool desidrogenase (Adh), Alpha metildopa (Amd), Hunchback (Hb) e Period (Per).

Estudo recente de Zanini *et al.*, (2018) estabeleceu relações filogenéticas e o tempo de divergência entre espécies do subgrupo *willistoni*, combinando sequências de fragmentos de três genes mitocondriais: (COI, COII e Citocromo oxidase b) e cinco fragmentos de genes nucleares, sendo eles Álcool desidrogenase (Adh), Dopa-decarboxilase (Ddc), Hunchback (Hb), Fator de fertilidade masculina localizado no braço curto do cromossomo Y (KI-3) e Period (Per). O trabalho estabeleceu uma árvore de filogenia para reconstruir as relações evolutivas entre algumas subespécies de *D. paulistorum*, juntamente com outras espécies do grupo *willistoni* (Figura 10).

Figura 10. Árvore de inferência Bayesiana baseada em dados morfológicos, genes nucleares (Adh, kl-3, Hb, Ddc, per) e genes mitocondriais (COI, COII, Cytb) obtidos por Zanini *et al.*, (2018) para amostras cultivadas de espécies e subespécies do grupo *willistoni* (subgrupos *willistoni* e *bocainensis*) de *Drosophila*.



Zanini *et al.*, (2018) estabeleceram o tempo de divergência do subgrupo *willistoni*, indicando que iniciou por volta de 7,3 Ma, com a ramificação de *D. insularis*. Na sequência, *D. tropicalis* ramificou-se em torno de 5,5 Ma; *D. willistoni* cerca de 4,8 Ma; *D. equinoxialis* ramificou-se em aproximadamente 3,1 Ma e o complexo de subespécies de *D. paulistorum* iniciaram seu processo de divergência

em torno de 2,1 Ma, com a deriva de *D. paulistorum* Transicional. A divisão entre *D. paulistorum* Interior e *D. paulistorum* Centro-Americana ocorreu por volta de 1,1 Ma, seguido por *D. paulistorum* Amazônia em torno de 0,7 Ma. A mais recente divisão ocorreu em torno de 0,33 Ma, entre *D. paulistorum* Orinocan e *D. paulistorum* Andino-Brasileira (Zanini *et al.*, 2018).

Trabalhos como estes demonstram uma riqueza de abordagens que podem ser realizadas com espécies do subgrupo *willistoni*. Por terem elevado número de subespécies, tanto *D. paulistorum* quanto *D. equinoxialis*, são excelentes modelos biológicos para o estudo da especiação (SPASSKY *et al.*, 1971; CORDEIRO; WINGE, 1995; POWELL, 1997). E por ocorrerem em simpatria, principalmente na região Amazônica do Brasil, coletas recentes neste rico bioma são ideais para serem obtidas amostras que representem a variabilidade e diferenciação dessas espécies.

Um entendimento completo de como os fatores ecológicos conduzem a fixação das mudanças genéticas durante a especiação no subgrupo *willistoni* ainda é necessário. Como bem destaca Yassin (2017) drosofilídeos podem ser modelos de estudo para estabelecer as etapas de especiação, e enriquecer a falta de modelos apropriados com história natural bem definida.

5 RESULTADOS

Artigo 1: Caracterização genética de subespécies de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* com ocorrência em Florestas úmidas do Brasil

Em preparação, a ser submetido a:

Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research (A2)

Caracterização genética de subespécies de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* com ocorrência em Florestas úmidas do Brasil

Ana Patrícia da Costa, Gleyse Áudria de França Nascimento, Anadeje Celerino dos Santos Silva, Rita Dayane Coutinho-Silva, Claudia Rohde

Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Resumo

Drosophila paulistorum possui uma ampla distribuição Neotropical, com clara preferência por ambientes quentes e úmidos como as florestas. Em 2007, sua espécie críptica, *Drosophila willistoni*, teve o genoma sequenciado e, com isso, ampliaram-se as possibilidades de estudos moleculares e evolutivos com todas as espécies crípticas do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. Esse subgrupo é composto por seis espécies que ainda carecem de estudos moleculares, para melhor entender sua evolução, especiação e diversificação na região Neotropical. Entre as questões de grande interesse está a caracterização e a investigação da diversidade genética entre as variadas subespécies, que ocorrem em *Drosophila equinoxialis*, *D. willistoni* e, especialmente, em *D. paulistorum*. Abordagens têm sido realizadas em linhagens cultivadas em laboratório por longos anos, porém, os estudos de populações naturais, recentemente coletados, nas florestas tropicais e ambientes associados, é sem dúvida o melhor material biológico a fim de entender os processos evolutivos relacionados à especiação. Diante disso, foi objetivo deste estudo investigar e também estabelecer padrões de diversidade genética de *D. paulistorum*, em coletas recentes realizadas na Floresta Atlântica e Amazônica do Brasil. Os resultados permitiram identificar duas subespécies de *D. equinoxialis*. A análise das sequências parciais de dois genes mitocondriais e dois nucleares permitiram definir alguns bons marcadores moleculares para os futuros estudos.

Palavras chave: Subespécies, Neotropical, grupo *willistoni*, espécies crípticas.

Introdução

As espécies crípticas *Drosophila willistoni* Sturtevant, *D. paulistorum* Dobzhansky; Pavan, *D. equinoxialis* Dobzhansky e *D. tropicalis* Burla; Da Cunha são as de maior distribuição geográfica na região neotropical, dentro do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* (BURLA *et al.*, 1949). Fazem parte deste pequeno grupo de espécies também *D. pavlovskiana* e *D. insularis*, porém elas têm distribuição muito restrita (VAL *et al.*, 1981).

Drosophila willistoni, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis* são espécies simpátricas em uma área que inclui a América Central (desde a Guatemala) até a região Norte e Central do Brasil, incluindo-se aí a região da Floresta Amazônica e Cerrado (Burla *et al.*, 1949; Spassky *et al.*, 1971; Ayala *et al.*, 1974a, b; Gottschalk *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2014; Roque *et al.*, 2015). Na região Nordeste do Brasil têm sido encontradas apenas as espécies *D. willistoni*, *D. paulistorum* (as duas mais abundantes, segundo Garcia *et al.*, 2014) e *D. equinoxialis*, com alguns poucos registros (Burla *et al.*, 1949; Rohde *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2016).

Análises da morfologia, feitas com microscopia eletrônica tem sido uma proposta eficiente para a diferenciação dessas espécies (Zanini *et al.*, 2015) e alguns marcadores morfológicos, como o formato do hipandrium e aedeagus (na terminália masculina) são os mais utilizados (Malogolowkin, 1952; Spassky, 1957). Zanini *et al.* (2015) destacam que o hipandrium é o melhor marcador para diferenciar as espécies crípticas. A diferenciação pode também ser feita por experimentos de isolamento reprodutivo (Spassky *et al.*, 1971), pelo padrão de bandamento diferencial dos cromossomos politênicos (Rohde *et al.*, 2006), o padrão de migração eletroforética da enzima Fosfatase ácida (Acph-1) (Garcia *et al.*, 2006) etc. Em 2007, *D. willistoni* teve seu genoma sequenciado e, com isso, ampliaram-se as possibilidades de estudos moleculares e evolutivos de espécies do subgrupo *willistoni* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007).

Drosophila paulistorum é, na verdade, um complexo de várias espécies incipientes, ou um conjunto de seis raças ou espécie em *statu nascendi* (Dobzhansky; Spassky, 1959). Indivíduos da mesma subespécie (Andino-Brasileira, Orinocana, Amazônica, Interior, Transicional e Centro-Americana) acasalam facilmente e produzem híbridos férteis, enquanto estirpes diferentes exibem forte

isolamento etológico (sexual), e os híbridos F1 são formados por fêmeas férteis e machos estéreis (Dobzhansky; Pavlovsky, 1966). Recentemente, Zanini *et al.* (2018) apresentaram evidências genéticas para o uso da classificação de “subespécie” a cada uma das diferentes estirpes de *D. paulistorum*.

A especiação é um processo contínuo que culmina a evolução do isolamento reprodutivo completo e diferenças genéticas fixas entre espécies nascentes (Yassin, 2017). Uma vez que a especiação esteja completa, as populações acumulam diferenças devido à mutação e à deriva genética, bem como à seleção contínua (Seehausen *et al.*, 2014). De acordo com estimativas de Robe *et al.* (2010), o subgrupo *willistoni* iniciou sua diversificação há cerca de 5,7 milhões de anos atrás, enquanto as subespécies de *D. paulistorum* divergiram mais recentemente, há 0,9 milhão de anos. Na avaliação de Zanini *et al.* (2018), que se basearam na análise molecular de sequências parciais de oito genes, a diversificação subgrupo *willistoni* é mais antiga, em cerca de 7,3 milhões de anos (com a separação de *Drosophila insularis*) e separação da superespécie *D. paulistorum* é de 2,1 milhões de anos, e de suas subespécies entre 0,3 e 1,0 milhão de anos. As amostragens, entretanto, se restringem a um representante (linhagem) de cada categoria taxonômica, e que serão aqui denominadas de linhagens “clássicas”. Estas vêm sendo mantidas em cultivo em laboratórios de todo o mundo, por várias décadas, e são padrões clássicos nos mais variados estudos.

Outro exemplo da presença de subespécies dentro do subgrupo *willistoni* ocorrem em *Drosophila equinoxialis* (*D.e.*), que consiste de duas subespécies: *D. e. caribbensis*, com ocorrência na América Central (Costa Rica e sudeste do México) e nas Grandes Antilhas, e *D. e. equinoxialis* Dobzhansky, no Panamá e na América do Sul continental (Ayala, 1973; Ayala *et al.*, 1974b; Ayala; Tracey, 1973).

Material e Métodos

A descrição dos locais das amostras das espécies e linhagens estudadas estão apresentados na **Tabela 1**. Na mesma tabela está a descrição detalhada da origem e nomenclatura das linhagens clássicas das subespécies de *D. paulistorum* (linhagens clássicas, dos estudos de Lee Ehrman) aqui estudadas.

Tabela 1. Descrição das amostras de *Drosophila paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. pavlovskiana*, do subgrupo *willistoni* investigadas para a variabilidade dos genes Citocromo oxidase subunidade I (COI), Ciotocromosomo oxidase II (COII), Ankyrin e PlexinB. A origem geográfica das populações está representada pelo nome do local original de coleta, a cidade e/ou estado (PE=Pernambuco, CE=Ceará, SP=São Paulo, RO=Rondônia, PA=Pará), seguido do país.

Espécie	Origem geográfica	Código	Genes investigados			
			COI	COII	Ank	Plx
<i>D. pavlovskiana</i>	Georgetown, Guiana	Dpav		x		
<i>D. equinoxialis</i>	Apazapan, Veracruz, México	Dequ MEX	x	x	x	x
	Panamá	Dequ MI	x			
	Fort Sherman, Colon, Panamá	Dequ FS	x		x	x
	Porto Velho/Rondônia, Brasil	Dequ PVH	x	x	x	x
	Marituba/PA, Brasil	Dequ MRI	x	x	x	x
	Belém/PA, Brasil	Dequ BEL			x	x
	Amazonas, Brasil	Dequ Tefé		x		
<i>D. paulistorum</i>	Jaton Sacha, Tena, Equador	Dpau ECU	x			
	Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço/PA, Brasil	Dpau CAX	x		x	x
	Belém/PA, Brasil	Dpau BEL		x		
	Marituba/PA, Brasil	Dpau MRI	x	x	x	x
	Usina Hidrelétrica Santo Antônio, Porto Velho/RO, Brasil	Dpau PVH	x			x
	Pousada Baixa Verde, Triunfo/PE, Brasil	Dpau TRI			x	x
	Parque Dois Irmãos, Recife/PE, Brasil	Dpau PDI		x		
	Brejo dos Cavalos, Caruaru/PE, Brasil	Dpau BJC		x		
	Estação Experimental de Itapirema, Goiana/PE, Brasil	Dpau GOI				x
	Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré/PE, Brasil	Dpau SAL	x	x	x	x
	Bananeiras, Crato/CE, Brasil	Dpau CRA				x
	São Paulo/SP, Brasil	Dpau JAI		x		
	Ribeirão Preto/SP, Brasil	Dpau RIB	x			
<i>D. paulistorum</i> Clássicas	I1 – Interior, Llanos, Colômbia (Lee Ehrman)	Dpau IN (coleta: 1958)	x	x	x	x
	SM – Transicional, Santa Marta, Colômbia (Lee Ehrman)	Dpau TR (coleta: 1956)	x	x	x	x
	C2 - Centro-Americana, Lancetilla, Honduras (Lee Ehrman)	Dpau CA (coleta: 1954)	x	x	x	x
	A28 – Amazônica, Belém/PA, Brasil (Lee Ehrman)	Dpau AM (coleta: 1952)	x	x	x	x
	O11 - Orinocana Georgetown, Guiana (Lee Ehrman)	Dpau OR (coleta: 1957)	x	x	x	x
	MS - Andino-Brasileira, Mesitas, Colômbia (Lee Ehrman)	Dpau AB (coleta: 1962)	x	x	x	x

Para as análises moleculares (amplificação, sequenciamento e alinhamento dos genes), foi feita, primeiramente, a extração do DNA de cinco isolinhagens recentes, coletadas em Marituba. Sequências previamente produzidas por nosso grupo de pesquisa, foram adicionadas a este estudo, assim como material publicado no GenBank por outros autores, para o gene COII. Para a extração do DNA de cada isolinhagem, cerca de 10 indivíduos foram selecionados e submetidos a extração com o kit de DNA da Puregene (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. O DNA foi purificado e submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) seguindo as descrições de Nascimento (2013) e Melo (2018).

Os *primers* utilizados para amplificar cada gene estão descritos na **Tabela 2** e foram preparados por Melo (2012). Para as análises foram escolhidos dois genes mitocondriais (Citocromo oxidase I – COI, e Citocromo oxidase II, COII) e dois genes nucleares (Ankyrin - Ank, e PlexinB - Plx).

Tabela 2. Descrição dos *primers* utilizados para amplificar os genes mitocondriais Citocromo oxidase I (COI), Citocromo oxidase II (COII) e os genes nucleares Ankyrin e PlexinB nas amostras de *Drosophila paulistorum* e *Drosophila equinoxialis*.

Genes	Direção	Sequência (5' » 3')	Tamanho dos fragmentos F+R
COI	Forward	ATTCAGAATATCTATGTTTCAG	681 pb
	Reverse	TTTAATTTTACCTGGATTTGG	
COII	Forward	ATGGCAGATTAGTGCAATGG	601 pb
	Reverse	GTTTAAGAGACCAGTACTTG	
Ankyrin	Forward	CGTGTCGGTCTTCAGGCACAACCAG	733 pb
	Reverse	ACGATTGGCCGGAGCTGGCTAA	
PlexinB	Forward	CGATGTACGGTGCGATCGGCCTGTC	804 pb
	Reverse	GGCACATCAAGGCGAATGCCCAAGG	

As sequências amplificadas foram purificadas e sequenciadas na Coréia, pela empresa MacroGen. As análises e edições das sequências foram feitas manualmente, através dos programas ApeA Plasmid Editor e Geneious 6.1.4. O método de análise para a construção das árvores filogenéticas iniciais foi Neighbor-Joining, feito no Geneious, que identifica os vizinhos que sequencialmente, e minimiza o tamanho total da árvore.

Para comparar a identidade das sequências finais obtidas foi utilizada a ferramenta BLASTn, que confirmou a identidade dos genes nos bancos de dados da espécie *Drosophila willistoni* do GenBank. Diversas sequências já publicadas nessa plataforma para o gene COII foram incorporadas nas análises, a fim de enriquecer os agrupamentos com as informações publicadas até o momento para as espécies *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* (O'Grady; DeSalle, 2008; O'Grady; Kidwell, 2002; Robe *et al.*, 2010; Zanini *et al.*, 2018). Apenas umas das sequências, identificada no GenBank como *D. equinoxialis* AF474096 (O'Grady; Kidwell, 2002), que não correspondeu à espécie, não pode ser utilizada. Por outro lado, os mesmos autores publicaram a sequência COII da espécie *D. pavlovskiana* (AF474101) e, por ela ser muito relacionada filogeneticamente com *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, foi incluída em nossa análise. Os genes Ank e Plx são novas contribuições do nosso

grupo (Nascimento, 2013; Monteiro, 2014; Melo 2018; este trabalho) e para estes dois genes não há sequências disponíveis no GenBank para as espécies do grupo *willistoni*, exceto as do sequenciamento de *D. willistoni*.

Resultados

Conforme indicado na **Figura 1**, as análises do *hipandrium* das amostras MRI 5, 3, 1 e 9, indicaram padrão mais similar a *D. equinoxialis*, considerando imagens de Malogolowkin (1952) e Zanini *et al.*, (2015). A classificação final da espécie pode ser feita pela abordagem molecular, que incluiu além das cinco amostras de Marituba, outras 83 sequências, exclusivas de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, recuperadas de outros estudos, para os genes COI, COII, Ank e Plex.

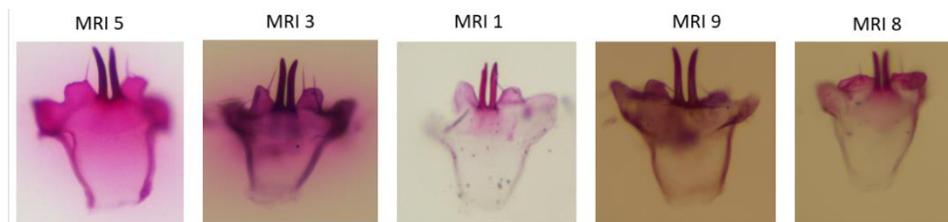


Figura 1. Imagens do hipandrium obtidas de machos das isolinhagens estabelecidas a partir da coletada em Marituba (MRI), Pará. MRI 5, 3, 1 e 9 são *Drosophila equinoxialis* e MRI 8 é *D. paulistorum*.

O número total de nucleotídeos de cada gene, obtidos após a finalização manual dos alinhamentos, foi: 681 para COI (22 amostras agrupadas), 601 para COII (28 amostras), 733 para Ank (18 amostras), e 804 para PlexB (30 amostras). As imagens das **Figuras 2 a 5** demonstram o agrupamento por distância das sequências dos genes aqui estudados.

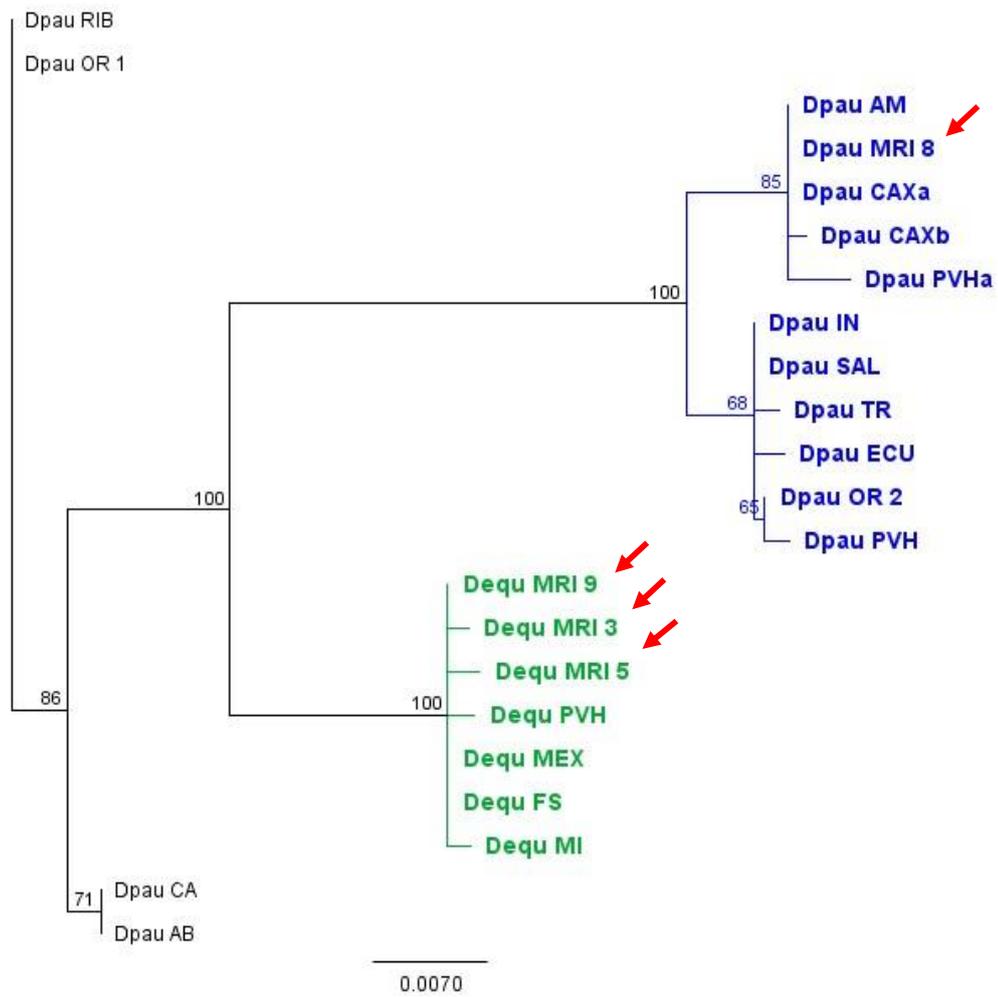


Figura 2. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene COI para 22 amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.

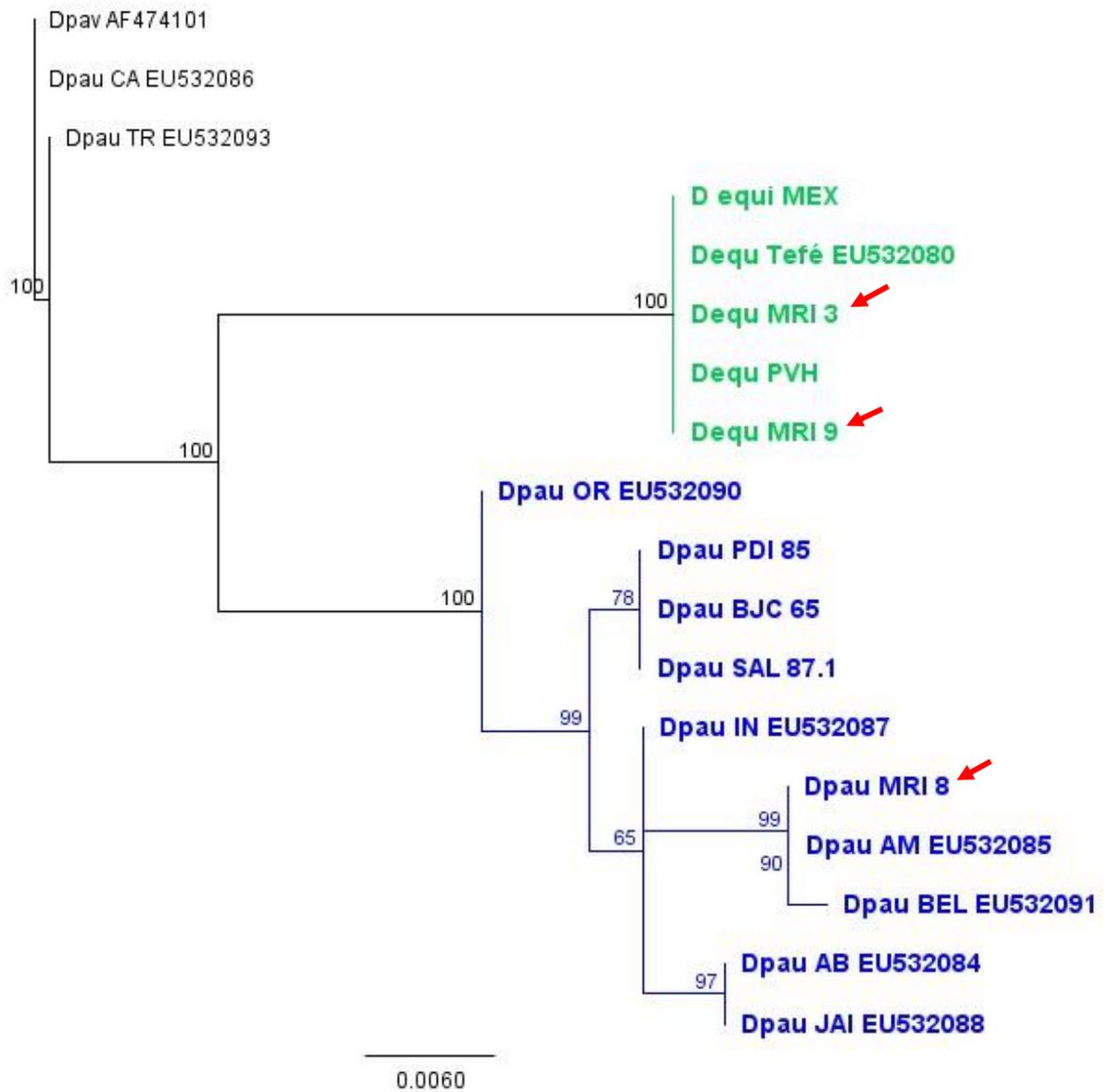


Figura 3. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene COII para 18 amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas inclusões das amostras deste estudo.

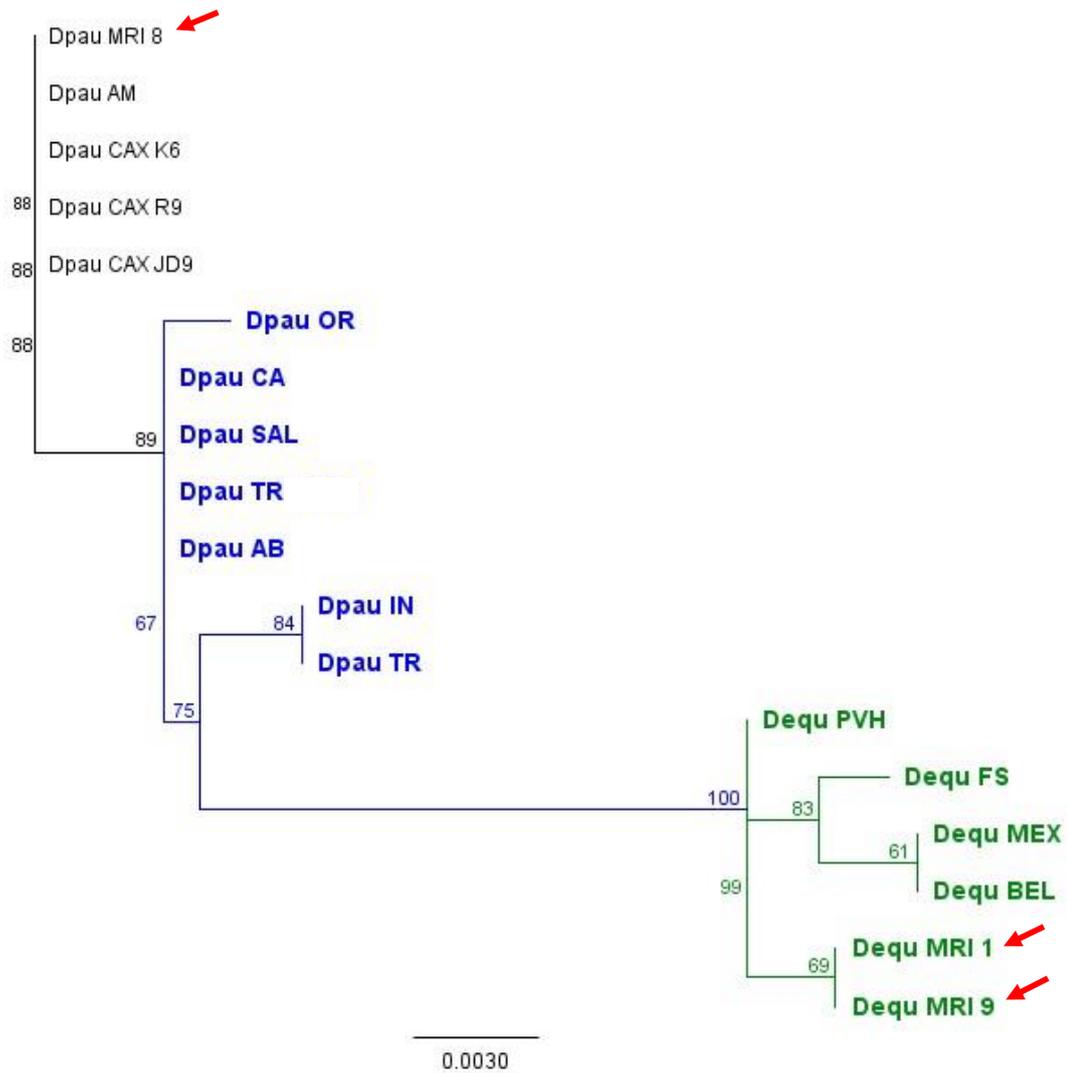


Figura 4. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene Ankyrin para 18 amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.

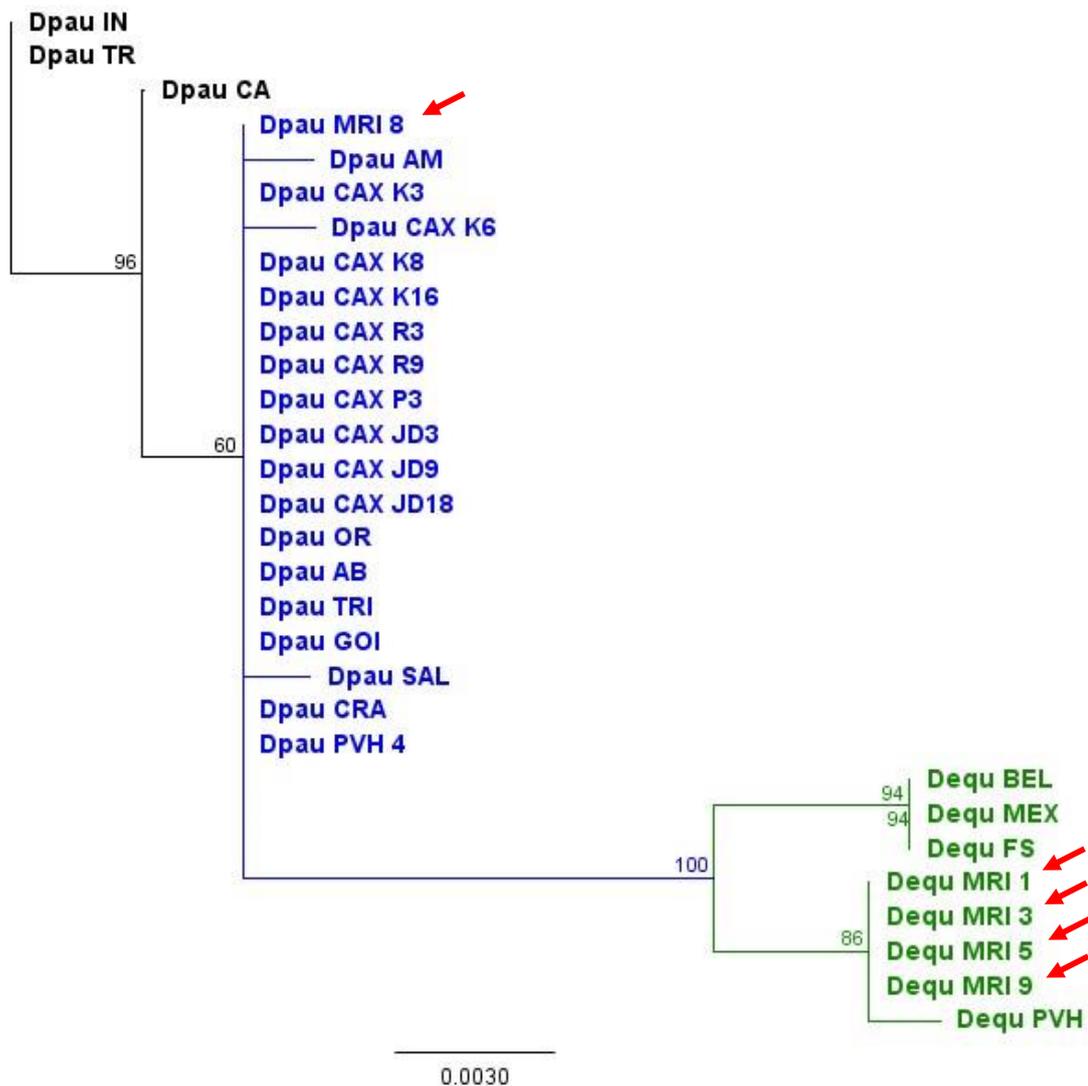


Figura 5. Agrupamento por distância genética das sequências parciais do gene PlexinB para 30 amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Locais de coleta e os respectivos códigos estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Setas vermelhas representam as novas contribuições deste estudo.

O número e a variação específica de nucleotídeo encontrada entre as amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*, para os quatro genes investigados, estão mostrados nas **Figuras 6 a 9**. Nas respectivas figuras foram deletadas as colunas nos alinhamentos, para as quais não houve variação entre as amostras, restando apenas as colunas com variabilidade.

Nas **Figuras 6 e 7** abaixo os retângulos verticais pretos indicam nucleotídeos exclusivos de *D. equinoxialis*, enquanto os retângulos vermelhos indicam nucleotídeos exclusivos de algum grupo de amostras ou de subespécie, como indicado pelo símbolo de chave junto ao nome das amostras de *D. paulistorum*.

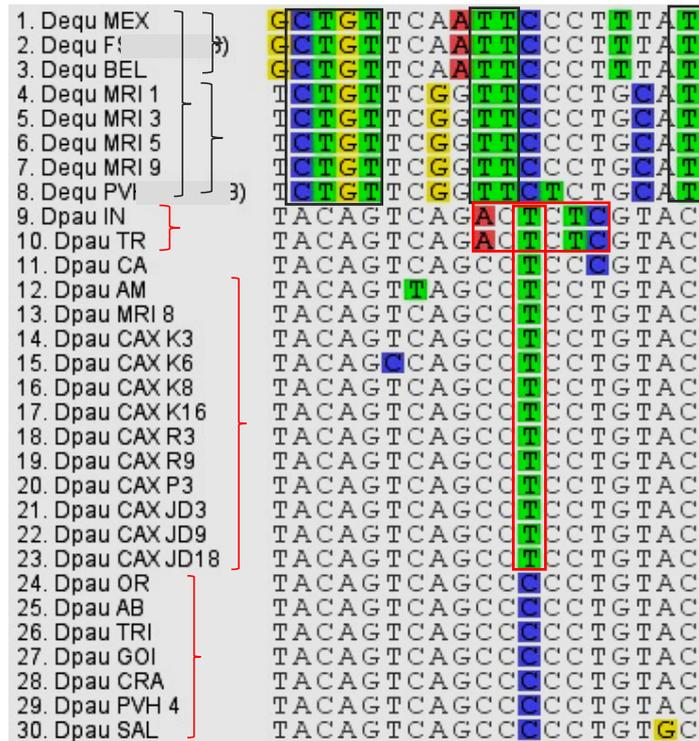


Figura 9. Nucleotídeos variáveis (em cores) para o gene PlexB entre as 30 amostras de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*.

Também na imagem da **Figura 9** fica clara a diferença entre *D. equinoxialis* e *D. paulistorum*, com presença de 12 nucleotídeos exclusivos em *D. equinoxialis*. Um destaque deve ser dado à variabilidade gerada pelo gene PlexinB capaz de diferenciar as subespécies de *D. equinoxialis*.

Como indicado na **Figura 10**, cinco nucleotídeos variaram dentro da espécie e formaram dois agrupamentos. Portanto, é possível que as linhagens MEX, FS e BEL pertençam a subespécie *D. e. caribbensis*, enquanto que as demais sejam *D. e. equinoxialis*. Esta sugestão se baseia, em parte da distribuição geográfica das amostras: *D. e. caribbensis* Ayala, registrada na América Central (Costa Rica e sudeste do México) e nas Grandes Antilhas, e *D. e. equinoxialis* Dobzhansky, no Panamá e na América do Sul continental (Ayala, 1973; Ayala; Tracey, 1973).

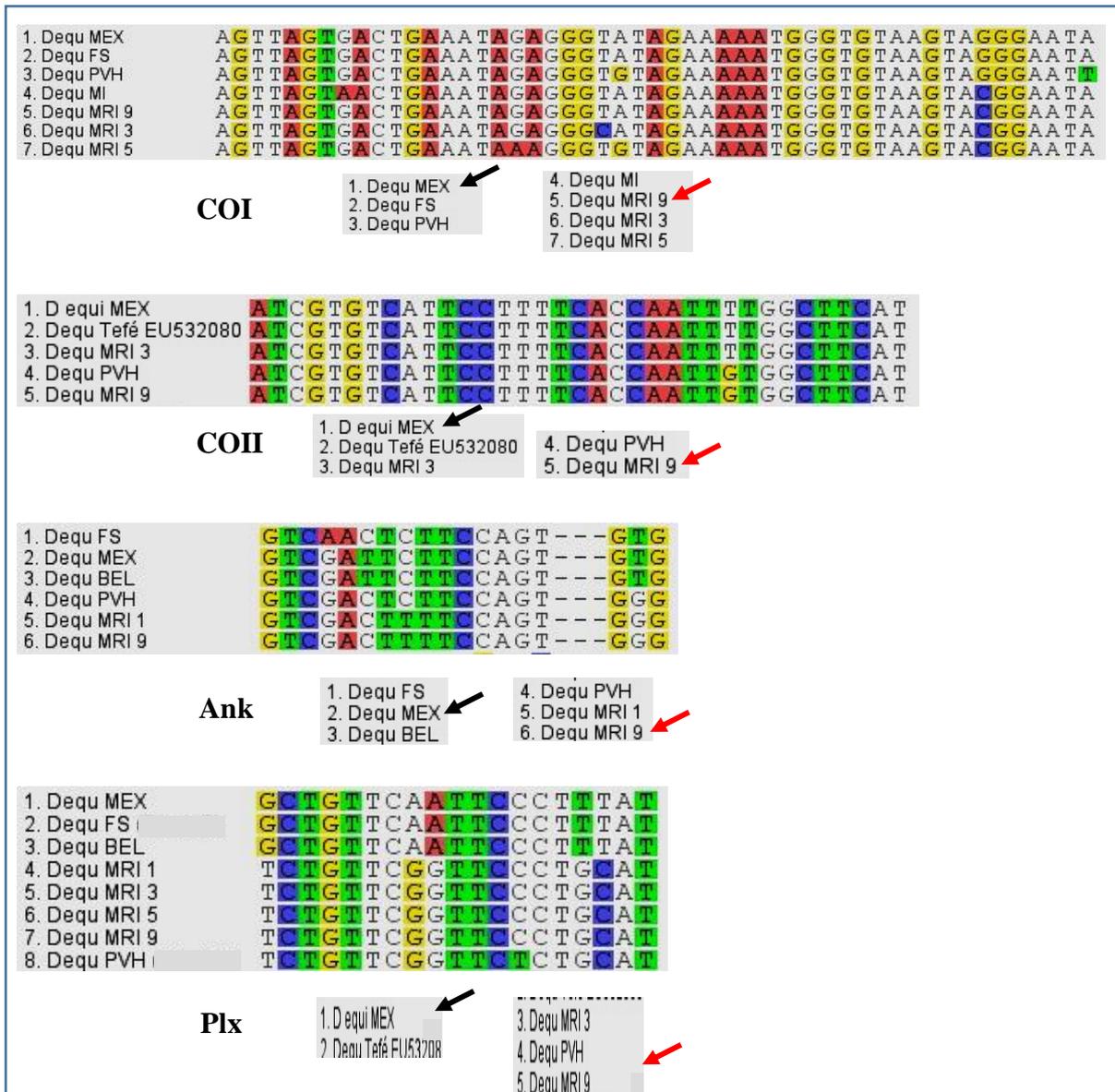


Figura 10. Nucleotídeos variáveis (em cores) para todos os genes nas amostras de *D. equinoxialis*, as setas pretas estão indicando as *D. equinoxialis caribbensis* e as setas vermelhas *D. e. equinoxialis*.

A análise comparativa dos agrupamentos formados entre amostras de *D. equinoxialis* reforçam a hipótese de que este material contém as duas subespécies. Além disso, indicam que houve concordância de 100% para MEX (representante de *D. e. caribbensis*) e para MRI 9 (representante de *D. e. equinoxialis*) se agruparem em ramos distintos em todas as análises.

Discussão e Conclusões

A especiação é um processo evolutivo fundamental, cujo conhecimento é crucial para entender as origens da biodiversidade (Seehausen *et al.*, 2014) e muito do entendimento da genética básica de especiação vem de estudos em moscas do gênero *Drosophila* (Yassin, 2017). Além das abordagens genômicas terem cada vez mais importância no campo da pesquisa, os estudos modernos revelaram que diferentes forças agem diferentemente em várias partes do genoma (Seehausen *et al.*, 2014).

Espécies reprodutivamente isoladas, portanto, frequentemente diferem em características que evoluíram sob seleção ecológica e outras que evoluíram sob seleção sexual, e também podem ter incompatibilidades intrínsecas. Uma tarefa central da genética da especiação é reconstruir a sequência na qual essas diferentes barreiras se originaram, de modo a distinguir entre causas e consequências da especiação (ZANINE *et al.* 2018). Para conseguir isso, é ideal que se tenha uma visão imparcial do genoma inteiro em todos os estágios do mesmo processo de especiação. No entanto, a especiação raramente pode ser estudada em tempo real em populações naturais de organismos multicelulares que se reproduzem sexualmente. As estimativas de variação entre os loci no momento e magnitude do fluxo gênico poderiam ajudar a determinar a ordem na qual as barreiras reprodutivas emergiram, mas tais inferências são desafiadoras e os métodos atuais não são precisos o suficiente (ZANINE *et al.* 2018).

Diante da possibilidade de classificação das subespécies de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* por meio dos marcadores moleculares aqui apresentados, abrem-se perspectivas para a continuidade dos estudos, focando em novas caracterizações genéticas, com destaque para os preparados dos, (1) cromossomos politênicos, (2) presença do endossimbionte *Wolbachia pipientis* observados após PCR e corrida eletroforética em gel de agarose, e pela análise do, (3) padrão de bandas do elemento transponível P, tanto em gel de agarose quanto de poliacrilamida. E, retornando às origens dos estudos com drosofilídeos para a definição do status de espécie, (4) realizar cruzamentos interespecíficos melhor direcionados, a fim de observar possíveis barreiras evolutivas pós-zigóticas atuando para a ocorrência de novas espécies.

Sendo assim, este trabalho de análise de sequências parciais de genes mitocondriais e nucleares ampliaram resultados prévios do nosso grupo de pesquisa e permitiram sugerir possíveis marcadores, mas teria que testar com maior número de amostras como este enfoque, novos marcadores moleculares para os futuros estudos com enfoque nas subespécies de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos financiamentos recebidos da FACEPE, CNPq, PROPESQ-UFPE e aos colegas do Laboratório de Genética que, gentilmente, participaram das variadas etapas deste trabalho.

Referências

- Ayala FJ. 1973. Two new subspecies of the *Drosophila willistoni* group. Pan Pacific Entomologist 49:273-279.
- Ayala FJ, Tracey ML. 1973. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. VIII. Genetic differentiation and reproductive isolation between two subspecies. Journal Heredity 64:120-124.
- Ayala FJ, Tracey MI, Barr LG, McDonald JF, Pérez-Salas S. 1974a. Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. Genetics 77(2):343-384.
- Ayala FJ, Tracey M, Barr LG, *et al.* 1974b. Genetic and reproductive differentiation of the subspecies *D. equinoxialis caribbensis*. Evolution 28:24-41.
- Bächli, G., 2018. TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em: <<http://taxodros.unizh.ch/>> Acesso em 15/06/2018.
- Burla H, Cunha AB, Cordeiro Ar, Dobzhansky T, Malogolowkin C, Pavan C. 1949. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. Evolution 3:300-314.
- Dobzhansky T, Spassky B. 1959. *Drosophila paulistorum* a cluster of species in *statu nascendi*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 45:419-428.
- Dobzhansky T, Pavlovsky O. 1966. Spontaneous origin of an incipient species in the *Drosophila paulistorum* complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 55: 727-733.

- Drosophila 12 Genomes Consortium. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450:203-218.
- Garcia ACL, Rohde C, Audino GF, Valente VLS, Valiati VH. 2006. Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretic mobility of acid phosphatase-1. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44:212-216.
- Garcia ACL, Silva DMIO, Monteiro AGF, Oliveira GF, Montes MA, Rohde C. 2014. Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 107: 975-982.
- Gleason JM, Griffith EC, Powell JR. 1998. A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflict between species concepts? *Evolution* 52:1093-1103.
- Gottschalk MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* 4(4):485-518.
- Kastritsis CD. 1967. A comparative study of the chromosomal polymorphs in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 23:180-202.
- Kastritsis CD. 1969. A cytological study on some recently collected strains of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 23:663-675.
- Lima EP, Rohde C. 2014. Registro de espécies da família Drosophilidae no estado de Rondônia e variabilidade genética das espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UFPE - CONIC, 2014, Recife/PE. Resumos. Recife/PE: Universidade Federal de Pernambuco, v. 1. p. 2-2.
- Malogolowkin C. 1952. Sobre a genitália dos Drosophilidae (Diptera). III grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Rev. Bras. Biol.* 12:79-96.
- Melo ZGS. 2012. Caracterização citogenética de genes do elemento cromossômico F em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) Dissertação (Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco.

- Melo ZGS. 2018. Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis*. Tese (Genética), Universidade Federal de Pernambuco.
- Monteiro AGF. 2014. Filogenia de espécies do grupo willistoni de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) baseada em genes do Elemento F de Müller. Dissertação (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco pp. 55.
- Monteiro LS, Garcia ACL, Oliveira GF, Rohde C. 2016. High diversity of Drosophilidae in High-Altitude wet forests in Northeastern Brazil. *Neotropical Entomology* 45:265-273.
- 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.
- O'Grady P, DeSalle R. 2008. Out of Hawaii: the origin and biogeography of the genus *Scaptomyza* (Diptera: Drosophilidae). *Biology Letters* 4(2):195-199.
- Nascimento GAF. 2013. Caracterização molecular dos genes Ankirina e PlexinB e presença do endossimbionte *Wolbachia* em populações naturais de *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). Dissertação (Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade Pernambuco.
- 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, 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.
- Roque F., Mencarini L., Tidon R. 2015. Revised list of drosophilid species recorded in the Brazilian Savanna. *Drosophila Information Service*, 98:70-74.

- Seehausen O, Butlin RK, Keller I, Wagner CE, Boughman JW, Hohenlohe PA, Peichel CL, Saetre G-P, Bank C, Brännström A, *et al.* 2014. Genomics and the origin of species. *Nat Rev Genet* 15:176-192.
- Silva P. 2016. Variabilidade e mapeamento de genes do elemento cromossômico F de Müller no subgrupo da *Drosophila willistoni*. Dissertação (Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade Pernambuco.
- Spassky B, Richmond RC, Perez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T, Ayala FJ. 1971. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25:129-143.
- Spassky B. 1957. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Univ. Texas Pub.* 5721:48-61.
- Tarrío R, Rodriguez-Trelles F, Ayala Fj. 2000. Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: the *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. *Molecular and Phylogenetic Evolution*, 16:344-349.
- Yassin A. 2017. *Drosophila yakuba mayottensis*, a new model for the study of incipient ecological speciation. *Fly* 11(1):37-45.
- Zanini R, Deprá M, Valente VLS. 2015. Can sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup be recognized through combined microscopy techniques? *Revista Brasileira de Entomologia* 59:323-331.
- Zanini R, Müller MJ, Vieira GC, Valiati VH, Deprá M, Valente VLS. 2018. Combining morphology and molecular data to improve *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae) taxonomic status. *Fly* 12(2):81-94.

Artigo 2: Análise de *Wolbachia* em amostras recentes de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* da Floresta Amazônica do Pará, Brasil

Em preparação, a ser submetido a:

Drosophila Information Service

Análise de *Wolbachia* em amostras recentes de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* da Floresta Amazônica do Pará, Brasil

Ana Patrícia da Costa e Claudia Rohde

Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Introdução

Wolbachia pipientis, que pertencente à classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae (Lo *et al.*, 2007) é um organismo endossimbionte. Sua transmissão nestes organismos se dá por meio da herança transovariana, pelas fêmeas hospedeiras, através dos ovos fecundados (Hilgenboecker *et al.*, 2008).

É reconhecido que uma parcela muito grande de artrópodes e nematoides está infectado por *W. pipientis*. Estudos estimaram que a incidência de infecções em espécies artrópodes varia de 20 a 75% em diferentes sistemas (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug; Hammerstein, 2012). Não é por acaso que essa infecção é uma condição de sucesso na natureza, em cerca de 85% de espécies de animais no planeta. É comprovado que o endossimbionte impulsiona seus altos padrões de dispersão por conta da indução de uma variedade de alterações reprodutivas nos hospedeiros, como a incompatibilidade citoplasmática (O'Neill; Karr, 1990).

Muitos estudos têm mostrado que a incompatibilidade citoplasmática contribui para a melhora na aptidão adaptativa de fêmeas infectadas por *W. pipientis*, em comparação com as não infectadas (Telschow *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2019). A infecção tem, portanto, um grande significado evolutivo,

demonstrado em algumas espécies de drosofilídeos e outros insetos, ao interferir nos padrões e escolhas de parceiros sexuais, na viabilidade dos descendentes, na chance de sucesso reprodutivo, no direcionamento da especiação, e na maior resistência a infecção por outros organismos parasitas, como os patógenos microbianos e eucarióticos (Telschow *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2015; Johnson, 2015; Arbuthnott *et al.*, 2016). Há também relatos em outro sentido, que comprovam a ineficiência dessa associação positiva endossimbiótica, sem alteração com certos grupos de patógenos (Wong *et al.*, 2011). Nesse cenário, espécies de *Drosophila* têm sido organismos-modelos para entender as interações entre o hospedeiro e o patógeno *Wolbachia*.

Em drosofilídeos, alguns autores têm se dedicado a estudar o papel da *W. pipientis* na seleção e especiação de espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, em especial nas subespécies que compõe a superespécie *Drosophila paulistorum* Dobzhansky e Pavan (Miller; Riegler, 2006; Miller *et al.*, 2010; Baião *et al.*, 2019; Schneider *et al.*, 2019). Essa espécie, juntamente com *D. equinoxialis* Dobzhansky, *D. willistoni* Sturtevant, *D. tropicalis* Burla; Da Cunha, *D. pavlovskiana* Kastritsis; Dobzhansky, e *D. insularis* Dobzhansky, compõem o grupo de seis espécies crípticas do subgrupo *willistoni* (grupo *willistoni*) do subgênero *Sophophora*.

Neste trabalho, analisamos a infecção por *W. pipientis* em duas espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, em amostras coletadas em ambiente de Floresta Amazônica.

Material e Métodos

Cinco linhagens de drosofilídeos, coletados na Floresta Amazônica, em Marituba, Pará, Brasil (1°25'59.6"S / 48°19'22.2"O) foram criadas em um meio de cultura padrão, até a extração do DNA e análise molecular da presença de *Wolbachia pipientis*. Os cultivos foram mantidos e temperatura constante de 24°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Após a coleta em campo, realizada em abril/2015, as moscas foram cultivadas por várias gerações até que seu DNA foi isolado.

A extração do DNA foi feita a partir de um *pool* de 10-13 machos adultos, utilizando o kit Puregene (Qiagen) e seguindo as especificações do fabricante. Para

amplificação da região genômica do gene da proteína de superfície (*wsp*) de *W. pipientis*, foi realizada a amplificação em cadeia da polimerase (PCR) com os dois primers Wsp-F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA-3' e Wsp-R 5'-AAAAATTA AACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3' (Jeyaprakash; Hoy, 2000).

Foram amplificadas sequências do gene *wsp*, seguindo especificações de Miller *et al.*, (2010) e Müller *et al.* (2013). As reações de PCR ocorreram em volumes de 10 µL, usando 1 µL de DNA genômico e 9 µL do mix de PCR (0,4 U Taq DNA polimerase, 4,75 µL de água, 2 µL de tampão da enzima 1x, 1 µL de MgCl₂ a 2,5 mM, 0,18 µL de dNTPs a 35 µM, e 0,5 µL de cada primer a 0,5 µM). As condições de PCR seguiram a descrição contida em Miller *et al.*, (2010).

Quando positiva, a reação da PCR gera um fragmento do gene de cerca de 650 pares de bases (pb) de nucleotídeos (Jeyaprakash; Hoy, 2000). As condições da PCR utilizadas foram: desnaturação a 95°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 55°C durante 1 min, extensão a 72°C durante 1 min, e extensão final 72°C durante 5 min. Os fragmentos gerados após PCR foram observados em gel de agarose a 1,5 %, sendo o DNA corado com GelRed (Biotium) e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta.

Como controle negativo da reação foi utilizada água ultrapura, e como grupos controle positivos foram utilizadas linhagens da espécie *Drosophila willistoni*, previamente caracterizadas por Melo (2018), além de três linhagens de *D. paulistorum*, cada uma pertencente a uma subespécie diferente: AM, Amazônica (linhagem A28); AB, Andino-Brasileira (linhagem Mesitas); OR, Orinocana (linhagem O11), as quais foram obtidas de grupos colaboradores, que receberam as linhagens da Dra. Lee Ehrman, (Doblensky , 1982).

Resultado

Conforme indicado na **Figura 1**, todos os fragmentos esperados no grupo controle positivo foram obtidos, enquanto que as novas amostras não apresentaram bandas identificáveis. Os resultados ainda são preliminares, porém estão de acordo com a literatura ao indicar que a ocorrência do endossimbionte não é igual entre todas as espécies crípticas do subgrupo *willistoni* e nem entre as subespécies de *D. paulistorum*.

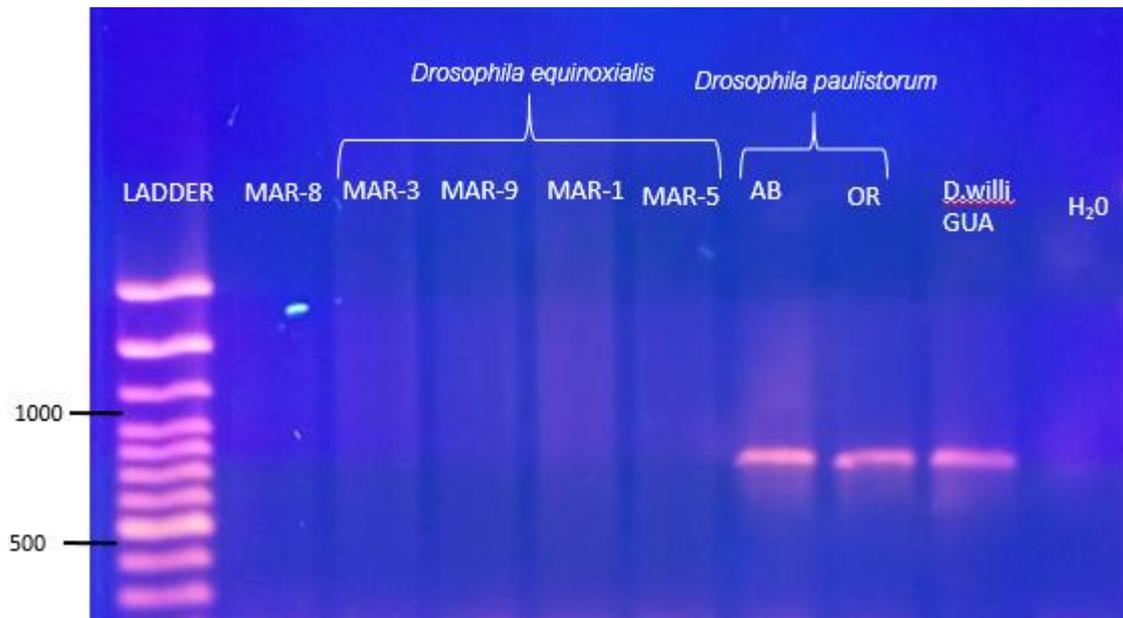


Figura 1. Gel de agarose 1,5%, com resultados da amplificação parcial do gene *wsp* de *Wolbachia pipientis*, com cerca de 700 pares de bases, em amostras de *Drosophila paulistorum* (AM, Amazônica, linhagem MRI 8; AB, Andino-Brasileira, Mesitas; OR, Orinocana, O11) e *D. equinoxialis* (linhagens MRI 1, MRI 3, MRI 5, MRI 9), coletadas em Marituba, Pará, Brasil, além de amostras de *Drosophila willistoni* (GUA, Reserva de Guaribas, Paraíba) e água destilada (H₂O). DNA Ladder de 1 kb (Kasvi) como marcador de tamanho de fragmentos.

Discussão

Entre as espécies de simbioses herdadas pela linhagem materna de artrópodes hospedeiros, *W. pipientis* é a mais comum. Entretanto, diferenças da presença desses organismos são bem claras entre subespécies de *Drosophila paulistorum* e espécies crípticas dentro do subgrupo *willistoni*, como relatado por Miller *et al.*, (2010). Os autores registraram presença de banda forte em amostras da subespécie Orinocana e Andino-Brasileira, e ausência de banda em Amazônica.

Neste trabalho a ausência de *W. pipientis* nas quatro amostras recentes de *D. equinoxialis* de Marituba, Pará (denominadas MRI 1, MRI 3, MRI 5 e MRI 9), e na linhagem de *D. paulistorum* (MRI 8) concordam ou reforçam os achados de Mille . A ausência detectável de *W. pipientis* na amostra MRI 8 reforça achados de Costa *et al.*, (em preparação), que observou por meio de análise molecular de genes, que indivíduos dessa linhagem pertencem a subespécie Amazônica. E conforme Miller *et al.*, (2010) essa subespécie tem baixa titulação do endossimbionte.

A natureza mutualista da associação entre *W. pipientis* e *D. paulistorum* é apoiada pela sua presença em todas as subespécies testadas até agora, embora a titulação da infecção possa variar de alto para apenas algumas células do endossimbiontes por mosca. Resultados prévios de nosso grupo, feito por GA Nascimento, para amostras também do Pará, da Floresta Nacional de Caxiuanã (*dados não publicados*), também relatam o mesmo resultado de baixa titulação para *D. paulistorum* Amazônica, observada em gel de agarose.

Os resultados obtidos aqui para *D. equinoxialis*, classificada como pertencente a esta espécie por Costa *et al.*, (*em preparação*) por análises de genes mitocondriais e nucleares, concorda com trabalhos prévios, que são para esta espécie. Miller; Riegler (2006), por exemplo não detectaram *Wolbachia* em quatro amostras analisadas (Apazapan, Veracruz, México; Gigante, Panamá; Gamboa, Panamá; FS; Colon, Panamá), cultivadas em laboratório por algumas décadas (desde 1998, 1997, 2002 e 2002, respectivamente). Outro estudo, feito por Mateos *et al.*, (2006), não registrou ocorrência de *W. pipientis* e duas linhagens testadas de *D. equinoxialis*, de La Hina, Honduras (Stock center no. 14030-0741.00) e de Tefé, Amazonas, Brasil (14030-0741.01) mantidas por décadas em cultivo.

Por fim, Müller *et al.*, (2013) também relatam a ausência deste endossimbionte em várias amostras de *D. equinoxialis* recentes do Pará, em 2011. Os autores, entretanto, puderam identificar baixas titulações em experimentos adicionais de PCR em tempo real, determinando que a linhagem de *W. pipientis* a qual era a mesma da linhagem (WMel) previamente descrita em *D. paulistorum* Amazônica (linhagem A28). Isso indica, ao nosso ver, tratar-se de uma associação entre subespécies de duas espécies crípticas muito relacionadas (*D. paulistorum* e *D. equinoxialis*). E isso pode significar estreita relação evolutiva quanto à presença de *Wolbachia*, e o que merece ser melhor estudado em futuras investigações de sequenciamento.

Embora o número amostral ainda seja pequeno em nosso estudo, outras amostras recentes feitas na região Amazônica, e em cultivo no laboratório, serão investigadas seguindo essa mesma metodologia e poderão ajudar ainda mais no conhecimento da presença e da cepa de *W. pipientis* presente nas amostras recentes, o passo inicial para futuros estudos envolvendo a interação evolutiva entre

o hospedeiro e seu endossimbionte em espécies e subespécies do subgrupo *willistoni*.

Agradecimentos

Os autores agradecem os financiamentos recebidos da FACEPE (Auxílio Pesquisa e Bolsa de Mestrado) e à colaboração dos colegas do Laboratório de Genética, nos experimentos e nas discussões.

Referências

- Arbuthnott D, Levin TC, Promislow DE (2016) The impacts of *Wolbachia* and the microbiome on mate choice in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 29:461-468.
- Baião GC; Schneider DI; Miller WJ, Klasson L (2019) The effect of *Wolbachia* on gene expression in *Drosophila paulistorum* and its implications for symbiont-induced host speciation. *BMC Genomics* 20(465):2-29.
- Costa AP *et al.* Caracterização genética de subespécies de *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* com ocorrência em florestas úmidas do Brasil (*em preparação*).
- Ehrman L, Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. *In*: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr JN, editors. *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3b. New York: Academic Press Inc; 1982. p. 193–220.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322(5902):702.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281:215-220.
- Jeyaprakash A, Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 4:393-405.
- Johnson KN (2015) The Impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes. *Viruses* 7:5705-5717.
- Mateos M, Castrezana SJ, Nankivell BJ, Estes AM, Markow TA, Moran NA (2006). Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics* 174:363-376.

- Miller WJ, Ehrman L, Schneider D (2010) Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. PLoS Pathog. 6(12):e1001214.
- Miller WJ, Riegler M (2006) Evolutionary dynamics of wAu-like *Wolbachia* variants in Neotropical *Drosophila* species. Appl. Environ. Microbiol. 72:826-835.
- Müller MJ, Dörr NCD, Deprá M, Schmitz HJ, 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.
- O'Neill SL and Karr TL (1990) Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. Nature 348:178-180.
- Osborne SE, Leong YS, O'Neill SL, Johnson KN (2009) Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. PLoS ONE 5(11):e1000656.
- Stevanovic AL, Arnold PA, Johnson KN (2015) *Wolbachia*-mediated antiviral protection in *Drosophila* larvae and adults following oral infection. Applied and Environmental Microbiology 81(23):8215-8223.
- Telschow A, Flor M, Kobayashi Y, Hammerstein P, Werren JH (2007) *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. PLoS ONE 2(8):e701.
- Wong ZS, Hedges LM, Brownlie JC, Johnson KN (2011) *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. PLoS ONE 6(9):e25430.
- Zug R, Hammerstein P (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PLoS ONE 7(6):e38544.

6 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho de coleta e análise de populações das espécies *Drosophila paulistorum* e *D. equinoxialis* da Floresta Amazônica, aponta para a necessidade de estabelecer marcadores adequados para a finalidade desejada, para a correta identificação taxonômica, visto que é difícil identificar as espécies por meio da genitália de machos adultos;

Os resultados indicam ocorrência de variabilidade de nucleotídeos nas amostras recentes de subespécies do subgrupo *willistoni* de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*;

Resultados preliminares aqui apresentados indicaram genes candidatos para uma identificação ao nível de subespécies, o que merece ser investigado em maior número de amostras;

Por sua importância nos processos de especiação, *Wolbachia pipientis* deve ser caracterizada em amostras recentes de espécies do subgrupo *willistoni*, dando suporte aos futuros estudos de sequenciamento e caracterização das diferentes subespécies para este endossimbionte.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.D.; CELNIKER, S.E.; HOLT, R.A.; EVANS, C.A.; GOCAYNE, J.D.; *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, Philadelphia PA, p.2185–2195, 2000.
- ALMERÃO, M.P. **Primeiro registro de *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales) em isópodos terrestres na América do Sul:** prevalência, aspectos filogenéticos de suas linhagens e seu possível impacto sobre a estrutura populacional estimada através de um loco mitocondrial em duas espécies do gênero *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea). 2009. 147 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Program de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, 2009.
- AMADON D. The superspecies concept. **Syst Zool**, Oxford, v .15, p.245-249, 1967.
- AYALA, F. J., TRACEY, M.L. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. VIII. Genetic differentiation and reproductive isolation between two subspecies. **J Hered**, New York, p. 120–124, 1973.
- AYALA, F. J., TRACEY, M.L., BARR, L.G., EHRENFELD, J.G. Genetic and reproductive differentiation of the subspecies *D. equinoxialis caribbensis*. **Evolution**, Malden, v.28, p.24–41, 1974.
- BÄCHLI, G. (Ed.). **Taxodros:** the database on taxonomy of Drosophilidae. Versão 1.04. [S. l.]: [s. n.], c2019. Disponível em: <http://www.taxodros.unizh.ch>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- BIZZO, N.M.V.; SENE, F.M. Studies on the natural populations of *Drosophila* from peruíbe, SP, Brazil. **Rev Biol**, São Paulo, v.42, p.539-544, 1982.
- BURLA, H., DACUNHA, A.B., CORDEIRO, A.R., DOBZHANSKY, T., Malogolowkin, C., Pavan, C. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. **Evolution**, Malden, v.3, p. 300–314, 1949.
- CORDEIRO A.R.; WINGE, H. Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. *In*: LEVINE, L (ed) **Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky**. New York: Columbia University Press, 1995. p. 262-280.
- COUTINHO-SILVA, R.D.; MONTES, M.A.; OLIVEIRA, G.F.; CARVALHO-NETO, F.G.; ROHDE, C.; GARCIA, A.C.L. Effects of seasonality on drosophilids (Insecta, Diptera) in the northern part of the Atlantic Forest, Brazil. **Bull Entomol Res**, London, v.2, p.1-11, 2017.
- CUNHA, A. B.; BURLA, H.; DOBZHANK, T. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. **Evolution**, Malden, v.4, p.212-235, 1950.

DOBZHANSKY, T. Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. **Evolution**, Malden, v.11, p.280-293, 1957.

DOBZHANSKY, T., POWELL, J.R. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. In: KING, R.C. (Ed.). **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Press, 1975. p. 589–622

DOBZHANSKY, T., SPASSKY, B. *Drosophila paulistorum* a cluster of species in statu nascendi. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, U.S.A. v.45, p. 419–428, 1959.

DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. **Nature**, London, v. 450, p. 203-218, 2007.

EHRMAN, L., POWELL, J. R. The *Drosophila willistoni* species group. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, J.N. **The Genetics and Biology of Drosophila**. New York: Academic Press, 1982. v. 3b, p.193-225.

FLYBASE. A Database of Drosophila Genes & Genomes. [S. l.]: National Human Genome Research Institute, c2010. Disponível em: <http://www.flybase.org>. Acesso em: 03 maio 2010.

FRYDMAN, H. *Wolbachia* bacterial infection in *Drosophila*. **J Vis Exp: JoVE**, Boston, v.2, 2007.

GARCIA, A.C.; SILVA, D.M.; MONTEIRO, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MONTES, M.A.; ROHDE, C. Abundance and richness of cryptic species of the *willistoni* group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the biomes Caatinga and Atlantic Forest, Northeastern Brazil. **Ann Entomol Soc Amer**, Oxford, v. 107, n. 5, p. 975-982, 2014.

GARCIA, A.C.L. **Evolução cromossômica da superespécie *Drosophila paulistorum* e ecologia de populações marginais**. 2006. 182 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 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 the electrophoretic mobility of acid phosphatase-1. **J Zool Syst Evol Res**, Berlin, v.44, p. 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 Sér Zool**, Porto Alegre, v. 98, n 3, p. 329-338, 2008.

GOTO, S.G.; KITAMURA, H.W.; KIMURA, M.T. Phylogenetic relationships and climatic adaptations in the *Drosophila takahashii* and *montium* species subgroups. **Mol Phylogenet Evol**, San Diego, v.15, p.147-156, 2000.

HAMM, C.A.; BEGUN, D.J.; VO, A.; SMITH, C.C.; SAELAO, P.; SHAVER, A.O.; TURELLI, M. *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection

polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. **Mol Ecol**, Oxford, v.23, n.19, p.4871-4885, 2014.

HERTIG, M.; WOLBACH, S.B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. **J Med Res**, Boston, v.44, p.329-374, 1924.

HOENIGSBERG, H.F.; PALOMINO, J.J.; CHIAPPE, C.; ROJAS, G.G.; CAÑAS, B.M. Populations genetics in the American tropics. XI Seasonal and temporal variations in relative frequencies of species belonging to the *willistoni* group in Colombia. **Oecologia**, Berlin, v.7445, p.1-10, 1977.

KASTRITSIS, C. D. A Comparative study of the chromosomal polymorphs in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. **Chromosoma**, Berlin, 23:180-202, 1967.

KASTRITSIS, C.D.; DOBZHANSKY, T. *Drosophila pavlovskiana*, a race of a species? **Amer. Midl. Nat.** v.78, p.244-247, 1967.

LUNT, D.H.; ZHANG, D.X.; SZYMURA, J.M.; HEWITT, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. **Insect Mol Biol**, Oxford, v.5, p.153-165, 1996.

MANFRIN, M.H.; DE BRITO, R.O.A.; SENE, F.M. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. **Ann Entomol Soc Am.**, College Park, v.94, p.333-346, 2001.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. **Drosophila: A Guide to Species Identification and Use**. Cambridge: Academic Press, 2005.

MARTINS, M. Variação especial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de mata isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). **Bol. Mus Par. Emílio Goeldi, Sér. Zool.**, Belém, v.3, p.533-546, 1987.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Holos, 2001.

MAYR, E. **Animal Species and Evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963.

MELO, Z.G.S. **Caracterização citogenética de genes do elemento cromossômico F em espécies do grupo willistoni de Drosophila (Diptera, Drosophilidae)**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2012.

MELO, Z. G. S. **Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e sua infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis***. 2018. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

MILLER, W. J. Bugs in transition: The dynamic world of Wolbachia in insects. **PLoS Genetics**, San Francisco, v.9, p.12, 2013.

MILLER, W.J.; J. EHRMAN, L.; SCHNEIDER, D. Infectious speciation revisited: Impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. 1001-1214, 2010.

MONTEIRO, L.S.; GARCIA, A.C.L.; OLIVEIRA, G.F.; ROHDE, C. High diversity of Drosophilidae in High-Altitude wet forests in Northeastern Brazil. **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v.45, n.3, p.265-273, 2016.

MONTEIRO, A.G.F. **Filogenia de espécies do grupo willistoni de Drosophila (Diptera, Drosophilidae) baseada em genes do Elemento F de Müller**. 2014. 55p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

O'GRADY, P.M. Reevaluation of phylogeny in the *Drosophila obscura* species group based on combined analysis of nucleotide sequences. **Mol Phylogenet Evol**, San Diego, v.12 p.124-139, 1999.

OLIVEIRA, G.F.; ROHDE, C.; GARCIA, A.C.L. Montes MA, Valente VLS A Contributions of dryland forest (Caatinga) to species composition, richness and diversity of Drosophilidae. **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v. 45, p. 537–547, 2016.

PARECER, S.; AHMADJIAN, V. **Symbiosis. Na introduction to Biological associations**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

PÉREZ-SALAS, S.; RICHAMOND, R.C.; PAVLOVSKY, O.; KASTRITISIS, C.D.; EHRMAN, L.; DOBZHANSKY, T. The Interior semi-species of *Drosophila paulistorum*. **Evolution**, Malden, v. 24, p.519-527, 1970.

POWELL, J.R. Interspecific cytoplasmatic gene flow in the absence of nuclear gene flow: Evidence from *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 80, p.492-495, 1983.

POWELL, J.R. **Progress and prospects in evolutionary biology: The Drosophila model**. Oxford, UK: Oxford University,; 1997.

RIEGLER, M.; O'NEILL, S.L. The genus *Wolbachia*. In The prokaryotes. **Springer** New York, p. 547-561, 2006.

RITCHIE, M.G.; GLEASON, J.M. Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. **J Evol Biol.**, Basel, v.8, p. 463–479, 1995.

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**, São Paulo, v. 138, p. 601–617, 2010.

ROHDE, C.; GARCIA, A.C.L.; VALIATI, V.H.; VALENTE, V.L.S. Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B). **Genetica**, São Paulo, v. 126, p. 77–88, 2006.

ROHDE, C.; MONTEIRO, A.G.F.; CABRAL, W.B.M.; SILVA, D.M.I.O.; OLIVEIRA, G.F.; MONTES, M.A.; GARCIA, A.C.L., The importance of the identification of the

willistoni subgroup of *Drosophila* at the species level: the first evidence of *D. equinoxialis* in the Northeast region of Brazil. **Drosoph. Inf. Serv.**, US, v. 93, p.118–122, 2010.

ROQUE, F.; LEÃO, B.F.D.; TIDON, R. Spatio-temporal distribution of the cryptic flies of the *Drosophila willistoni* (Diptera: Drosophilidae) subgroup in a Neotropical forest. **Ann. Entomol. Soc. America**, College Park, v.110, n. 4, p. 1–5, 2017.

SARASTE, M. Structural features of cytochrome oxidase. **Quart Rev Biophys**, v.23, p.331–366, 1990.

SENE, F.M.; VAL, F.C.; VILELA, C.R.; PEREIRA, M.A.Q.R. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Papéis Avulsos Zool.**, Sao Paulo, v.33, p.315-226, 1980.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial genes sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. America**, College Park, v.87, p.651–701, 1994.

SPASSKY, B.; RICHMOND, R.C.; PEREZ-SALAS, S.; PAVLOSKY, O.; MOURÃO, C.A.; HUNTER, A.S.; HOENTGSBERG, H.; DOBZHANSKY, T.. AYALA, F.J. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. **Evolution**, Malden, v. 25, p.129-143, 1971.

STURTEVANT, A.H. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, College Park, v.9, p.323-343, 1916.

STURTEVANT, A.H.; NOVITSKI, E. The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. **Genetics**, São Paulo, v.26, p.517-541, 1939.

TOWNSEND, J.I. Cryptic subspeciation in *Drosophila* belonging to the subgenus *Sophophora*. **Am. Nat.**, Chicago, v.88, p.339-351, 1954.

VAL, F.C., VILELA, C.R., MARQUES, M.D. Drosophilidae of the Neotropical region. *In*: ASHBURNER, M., CARSON, H.L., THOMPSON, J.N. (Eds). **The Genetics and Biology of Drosophila**. London: Academic Press, 1981.

VALENTE, V.L.S.; SARRAVEDA, C.; MORALES, N.; ARAÚJO, A.M. Observations on the attraction of *Drosophila* species for different baits and chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. **Drosoph. Inf. Serv.**, São Paulo, v.56, p.147-149, 1981.

YASSIN, A. *Drosophila yakuba mayottensis*, a new model for the study of incipient ecological speciation. **Fly**, London, v. 1, n. 1, p. 37-45, 2017.

ZANINI, R., DEPRÁ, M., VALENTE, V.L.S. Can sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup be recognized through combined microscopy techniques? **Rev. Brasil. Entomol.**, Curitiba v. 59, p. 323-331, 2015.

ZANINI, R., MÜLLER, M.J.; VIEIRA, G.C.; VALIATI, V.H.; DEPRÁ, M., VALENTE, V.L.S. Combining morphology and molecular data to improve *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae) taxonomic status. **Fly**, London, v. 7, p. 1-14, 2018.