



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

ANADEJE CELERINO DOS SANTOS SILVA

**ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COMO UMA
FERRAMENTA IMPORTANTE NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE
GENÉTICA DO SUBGRUPO *willistoni* DE *Drosophila***

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2019**

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

ANADEJE CELERINO DOS SANTOS SILVA

**ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COMO UMA
FERRAMENTA IMPORTANTE NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE
GENÉTICA DO SUBGRUPO *willistoni* DE *Drosophila***

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

Área de Concentração: Biologia da Conservação

Orientadora: Dra. CLAUDIA ROHDE

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2019

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Fernanda Bernardo Ferreira CRB4/2165

S586e Silva, Anadeje Celerino dos Santos
Eletroforese em gel de Poliacrilamida como uma ferramenta importante na análise da diversidade genética do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. / Anadeje Celerino dos Santos Silva. - Vitória de Santo Antão, 2020.
49 folhas; il., fig., 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, anexos e apêndices.

1. *Drosophila*. 2. Padrões Polimórficos. 3. Especiação Genética. 4. Subgrupo *willistoni*. I. Rohde, Claudia (Orientadora). II. Título.

576.58 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-016/2020

ANADEJE CELERINO DOS SANTOS SILVA

**ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COMO UMA FERRAMENTA
IMPORTANTE NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO SUBGRUPO
willistoni DE *Drosophila***

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

Aprovado em: 16/09/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Zilpa das Graças Silva de Melo (Examinadora Externa)
Compesa – GNR Mata Norte

A meus pais Antonio e Lucinha, irmãos (Dido, Fio e Jéh),
meu marido André, tia Eli, mas especialmente
a minha princesa Ana Vitória, Te amo infinito.

Família, meu tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por me proporcionar a oportunidade de poder concluir o curso de mestrado, pois sei que se estou aqui hoje, é devido sua permissão, confesso que sem Ele nada sou, faço. Tudo depende dEle e foi quem me capacitou e me ajudou a chegar até aqui. Sem Ele não sei o que seria de mim!

Aos meus pais, Antonio Alves dos Santos e Maria Lucia Celerino dos Santos que lutaram e fizeram de tudo para que eu pudesse estudar. Pessoas humildes, mas de um coração tão puro que só posso agradecer a Deus a permissão de ser filha de vocês. Saibam que os amo muito e incondicionalmente.

Aos meus irmãos Adeildo Celerino dos Santos, Jessica Celerino dos Santos e Jefferson Celerino dos Santos. Obrigada pelos conselhos, apoio em todas as minhas escolhas, ajuda nas horas difíceis e por estarem comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido pelo amor, companheirismo, apoio e compreensão nos meus dias mais chatos e estressantes.

A minha filha Ana Vitória, minha Jóia preciosa e benção enviada a mim pelo Criador. Meu mais lindo e inexplicável presente!

À toda minha família, avós, tios e tias, em especial à tia Eli, uma mulher guerreira, que sempre cuidou de mim e me ajudou com minha baby. Uma segunda mãe, ou melhor, uma irmã que estava ali quando precisasse, em todas situações e correrias diárias na vida acadêmica. Sem vocês não teria chegado até aqui. Essa conquista é nossa. Amo vocês!

À minha orientadora Dra. Claudia Rohde, por ter aceitado me orientar nessa etapa do mestrado. Por compreender minha ausência e todos os meus maus momentos. Obrigada pelos ensinamentos, tanto acadêmicos quanto os para a vida, a senhora nunca mediu esforços para ajudar a mim, como também a minha família. Jamais esquecerei todo o seu cuidado e carinho, com o qual acolheu não só a mim, mas André, Jessica e também sua mais nova filha, Ana Vitória! Obrigada por se preocupar tanto conosco, como se fôssemos parte de sua família! Minha eterna gratidão por TUDO!

Aos meus colaboradores Prof. Dr. Amaro de Castro Lira Neto, do Laboratório de Genômica (IPA), e da doutoranda Flavia Tadeu de Araújo, do Departamento de Genética (UFPE), responsável pelo treinamento para construção da matriz do gel poliacrilamida.

A família do Laboratório de Genética do CAV- UFPE, pelo apoio e auxílio no decorrer dessa jornada. Que prazer e felicidade conhecer e passar um pouco dos dias passageiros dessa vida com vocês, cada um marcou do seu jeitinho especial! Principalmente Ana Patrícia da Costa, companheira incansável de trabalho e idas ao IPA e a querida Zilpa Melo que várias vezes se deslocou para me auxiliar nos ajustes para os PCRs e géis. Aos demais companheiros do laboratório: Jorge, Rita, Gleyse, Érima, Danubia, Ícaro, Samuel, Jéssica, André, Rafaela, e tantos outros que passaram pelo laboratório, meu muito obrigada.

À Universidade Federal de Pernambuco, orgulho de ter feito parte dessa instituição.

Aos responsáveis pelo curso de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA), aos professores de cada uma das disciplinas ministradas e por cada conhecimento compartilhado. Feliz e grata por ter feito parte da última turma que o programa formou.

Aos meus queridos colegas de turma do mestrado pela troca de experiência e apoio na leitura de artigos.

Aos Órgãos de Fomento CNPq, CAPES, FACEPE e PROPESQ-UFPE.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a cada um que fez parte de mais uma etapa na minha vida. São muitos os ensinamentos e experiências que levo comigo e que me ajudaram a ser mais forte hoje. OBRIGADA a todos, OBRIGADA DEUS!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

A eletroforese em gel de poliacrilamida representa uma técnica valiosa para separação e caracterização dos fragmentos de DNA. Esta metodologia pode ser aplicada após a reação em cadeia da polimerase (PCR) para caracterizar marcadores genéticos, como *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). O principal objetivo neste trabalho foi implementar a metodologia para melhorar a definição dos padrões e da variabilidade dentro e entre populações brasileiras de *Drosophila willistoni*. Pertencente ao gênero *Drosophila* Fallen 1823, *D. willistoni* é a espécie de drosofilídeo que possui a maior distribuição geográfica, versatilidade ecológica, e capacidade de explorar diversos tipos de habitats, tais como matas, formações abertas e cidades. A metodologia aqui testada consistiu-se na separação de fragmentos ISSR com o uso dos primers 844 (CT₈RC) e 868 (GAA₆). A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi feita na concentração de 6%, com 1 mm de espessura, não desnaturante, e com revelação em Nitrato de Prata. Os resultados permitiram o reconhecimento de fragmentos polimórficos nas populações de *D. willistoni* estudadas. A metodologia foi também testada para definição de padrões espécie-específicos do elemento transponível P em duas espécies crípticas a *D. willistoni*. Os resultados confirmam a hipótese de que a PAGE é eficaz para visualização, definição de padrões para espécies e de populações de *Drosophila*, abrindo perspectivas para mais estudos acerca dos padrões genéticos de espécies neotropicais.

Palavras-chave: *Drosophila*, Padrões polimórficos, PAGE, Subgrupo *willistoni*.

ABSTRACT

Polyacrylamide gel electrophoresis represents a valuable technique for separation and characterization of DNA fragments. This methodology can be applied after polymerase chain reaction (PCR) to characterize genetic markers such as Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). The main objective of this work was to implement the methodology to improve the definition of patterns and variability within and among Brazilian populations of *Drosophila willistoni*. Belonging to the genus *Drosophila* Fallen 1823, *D. willistoni* is the species of drosophilid that has the largest geographical distribution, ecological versatility, and the ability to explore diverse habitat types such as forests, open formations, and cities. The methodology tested here was the separation of ISSR fragments using primers 844 (CT₈RC) and 868 (GAA₆). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed at a concentration of 6%, 1 mm thick, non-denaturing, and Silver Nitrate staining. The results allowed the recognition of polymorphic fragments in the *D. willistoni* populations studied. The methodology was also tested to define species-specific patterns of the transposable element P in two cryptic species to *D. willistoni*. The results confirm the hypothesis that PAGE is effective for visualization, pattern setting for *Drosophila* species and populations, opening perspectives for further studies on the genetic patterns of Neotropical species.

Keywords: *Drosophila*, Polymorphic patterns, PAGE, *willistoni* subgroup.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Imagens da morfologia externa de uma fêmea e um macho de *Drosophila willistoni*. Fonte: www.flybase.org.br, acesso em julho/2015. 20

Figura 2 -Distribuição geográfica das espécies do subgrupo willistoni. Compilação de Zanini et al. (2015), de acordo com dados Spassky et al. (1971); Winge (1971); Dobzhansky e Powell (1975); Ehrmann e Powell (1982); Santos e Valente (1990). 21

ARTIGO 1

Figura 1 - Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelação com Nitrato de Prata, indicando os padrões de bandas ISSR amplificadas por PCR com o *primer* 844 (CT_3RC). As amostras de populações naturais de *Drosophila willistoni* foram: MRI= Marituba/PA, SAL= Saltinho/PE, BJC= Brejo dos Cavalos/PE, ALD= Aldeia/PE, JEQ= Jequiriçá/BA, BRA= Brasília/DF, RIO= Rio de Janeiro/RJ, OSS= Rio Grande do Sul/RS. LAD=marcador DNA ladder 100 pb. 34

Figura 2 - Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelação com Nitrato de Prata, indicando os padrões de bandas ISSR amplificadas por PCR com o *primer* 868 (GAA)₆. As amostras de populações naturais de *Drosophila willistoni* foram: SAL= Saltinho/PE, BJC= Brejo dos Cavalos/PE, ALD= Aldeia/PE, JEQ= Jequiriçá/BA, OSS= Rio Grande do Sul/RS. LAD=marcador DNA ladder 100 pb. 34

ARTIGO 2

Figura 1- Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelação com Nitrato de Prata, indicando os padrões de bandas de elemento transponível P em amostras de *Drosophila willistoni* (A), *D. paulistorum* (B) e *Drosophila equinoxialis* (C). BRA=Brasília, MRI= Marituba-Pará, RIO= Rio de Janeiro, PDI= Parque Dois Irmãos-Pernambuco, RON= Rondônia. LAD=marcador DNA ladder 100 pb. 40

Figura 2 - Detalhe da imagem da Figura 1, para tamanhos de bandas entre 500 e 1000 pb, com indicação da conservação de bandas entre as amostras de cada espécie (linhas horizontais azuis); da variabilidade de bandas observadas em algumas amostras da espécie (quadrados brancos); e da ausência de bandas em algumas amostras (quadrados vermelhos). 40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Locais de coleta da espécie *Drosophila willistoni* nos diferentes biomas do Brasil e número de linhagens estabelecidas para este estudo. 33

Tabela 2 - Sequência dos *primers* ISSR e as temperaturas de anelamento. 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BJC	Parque Municipal João Vasconcelos Sobrinho - PE
BRA	Reserva Biológica IBGE – DF
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (A, T, C, G)
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
GUA	Reserva Biológica de Guaribas - PB
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
JEQ	Município de Jequiçá -BA
MRI	Maranhão- MA
OSS	Morro do osso – RS
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia polimerase
PDI	Parque Estadual de Dois Irmãos - PE
RIO	Parque Nacional Serra dos Órgãos - RJ
Rpm	Rotação por minuto
SAL	Reserva Biológica de Saltinho - PE
seg	Segundos
SER	Serra da Canastra – MG

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	144
2 OBJETIVOS	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Família Drosophilidae e gênero <i>Drosophila</i>	17
3.2 Grupo e subgrupo <i>willistoni</i>	18
3.3 <i>Drosophila willistoni</i>	19
3.4 <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (ISSR)	21
3.5 Elemento transponível P	22
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	24
4 ARTIGO 1.....	26
5 ARTIGO 2.....	36
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As moscas pertencentes ao subgrupo *willistoni* de *Drosophila* do subgênero *Sophophora* se distribuem principalmente na região Neotropical, que apresenta condições ideais para estudos acerca da complexidade e das interações entre os seres vivos e o ambiente. Apesar da sua ampla ocorrência em florestas tropicais úmidas, a diversidade e a variabilidade genética entre populações das espécies do grupo *willistoni* ainda são pouco estudadas. Dados da literatura mostram que, para *Drosophila willistoni* Sturtevant 1916, esta abordagem foi feita apenas para marcadores enzimáticos, do tipo aloenzimas (AYALA, 1975), e cromossômicos, do tipo inversões (ROHDE; VALENTE, 2012), o que aponta para a necessidade de uma maior investigação nesse campo de pesquisa.

Os marcadores moleculares exercem papel importantíssimo para caracterização da diversidade genética de uma espécie. Eles são capazes de revelar polimorfismos o que facilitam a comparação de indivíduos, populações ou espécies diferentes (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). Além disso, existem diversos marcadores genéticos disponíveis para analisar populações naturais com o intuito de verificar a estruturação das mesmas, a presença de fluxo gênico e a ocorrência de adaptação e evolução associado a eventos ecológicos. Portanto, os marcadores moleculares são mecanismos capazes de contar a história evolutiva de uma espécie (KIMBERLY et al., 2006).

Entre os marcadores moleculares que podem ser estudados por meio da eletroforese está o ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) que é capaz de diferenciar indivíduos próximos evolutivamente. Tem como característica genética uma taxa de evolução rápida, alto grau de polimorfismo, e associação com regiões não necessariamente codificantes do genoma, que se encontram posicionadas entre dois blocos de microssatélites consecutivos (AVISE, 2004).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é frequentemente denominada de PAGE, sendo uma abreviação de *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*. O gel de poliacrilamida é formado pela polimerização de monômeros de acrilamida na presença de bis-acrilamida (N,N'-methylene-bisacrylamide). Essa polimerização é um exemplo de reação catalisada por radicais livres, iniciada pela adição de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine). Géis de poliacrilamida são frequentemente usados para

análises de alta resolução (sequenciamento de DNA/RNA) que requerem maior definição das bandas.

Melo (2018) apresentou pela primeira vez em uma espécie da família Drosophilidae, uma análise populacional de ISSR. Os resultados indicaram elevado índice de diversidade genética em oito populações brasileiras de *Drosophila willistoni*. Porém, o marcador ISSR não foi capaz de diferenciar as populações entre si. Nesta proposta apresentamos resultados do uso do gel de poliacrilamida em espécies do subgrupo *willistoni* para estudo do marcador ISSR e outras sequências de DNA com a finalidade de definir melhor a variabilidade dentro e entre populações.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a metodologia em gel de poliacrilamida como melhor método de análise para diferenciação de populações de *Drosophila willistoni* que ocorrem em diferentes regiões do Brasil, utilizando o marcador genético *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR).

2.2 Específicos

- a) Aprimorar a metodologia de análise do marcador ISSR, testando as amostras de populações naturais de *D. willistoni* por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- b) Analisar os padrões de fragmentos polimórficos de *D. willistoni* obtidos pelo marcador ISSR através da PAGE;
- c) Implementar a metodologia em gel de poliacrilamida como rotina do laboratório para melhor separação dos fragmentos de DNA, possibilitando o estudo de variabilidade e mudanças genéticas de populações naturais de drosofilídeos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Drosophilidae e gênero *Drosophila*

Os drosofilídeos, também conhecidos como moscas das frutas ou mosca do vinagre, compõem a ordem Diptera, da classe Insecta. Esta ordem possui mais de 150.000 espécies distribuídas em todo o globo terrestre, é o quarto grupo com maior riqueza de espécies no mundo sedo, portanto, bons representantes para análises ecológicas (YEATES; WIEGMANN, 2005). De acordo com Bächli (2018) a família Drosophilidae (Insecta: Diptera) inclui pelo menos 4.417 espécies distribuídas em 75 gêneros atuais e três gêneros extintos (YASSIN, 2013), sendo *Drosophila* o gênero mais expressivo dentro do grupo, com 1.207 espécies (BÄCHLI, 2018) e o mais estudado (VICARIO et al., 2007; SCHAEFFER et al., 2008; RAND, 2010).

No Brasil foram descritas mais de 300 espécies, e a cada ano, novas são descritas ou registradas nos diversos ecossistemas estudados (MEDEIROS; KLACZKO, 2004; GOTTSCHALK et al., 2008). O gênero *Drosophila* FALLEN 1823 se subdivide nos subgêneros *Drosophila* (com maior número de espécie), com aproximadamente 775 espécies conhecidas, e subgênero *Sophophora* com 340, sendo este último o mais bem representado, em número e abundância de espécies, na região Neotropical (BÄCHLI, 2018). Os dois subgêneros juntos representam cerca de 90% da diversidade do gênero *Drosophila* (MARKOW; O'GRADY, 2005).

Drosophilidae é composta por moscas com tamanho de 2,5 a 3 mm, com coloração que varia desde o amarelo até o marrom e preto (WHEELER, 1981) e possuem caracteres morfológicos que auxiliam na identificação taxonômica. As moscas que pertencem ao gênero *Drosophila* tem adaptação ecológica bastante variada (MARTINS; OLIVEIRA, 1996; DE TONI, 2002) podendo ser encontradas em diferentes habitats, altitudes e climas (GOTTSCHALK, 2004).

Drosofilídeos se reproduzem em frutos em estado de decomposição e também em uma variedade de outros substratos, como flores, fungos, carcaças de animais etc (CARSON, 1971). Possuem um ciclo de vida holometábolo, ou seja, desenvolvimento completo (ovo, larva, pupa e adulto) em no mínimo 10 dias. Sua alimentação com raras exceções é advinda de leveduras e bactérias que decompõem a matéria orgânica (CARSON, 1971; POWELL, 1997). Devido ao seu ciclo rápido de

reprodução, e também seu tamanho, há a possibilidade do cultivo dessas espécies em laboratório, tornando-as excelentes modelos de estudos voltados à evolução, biologia do desenvolvimento, ecologia de populações e genética (SEPEL; LORETO, 2010).

Por apresentarem características vantajosas quando comparados a outros grupos de invertebrados, os drosofilídeos são utilizados em uma variedade impressionante de estudos, há mais de um século. Suas qualidades dão suporte tanto para estudos mais generalistas, quanto mais pontuais, com destaque dos recentes estudos sobre mal de Alzheimer, alcoolismo, envelhecimento, que utilizam *Drosophila* como espécie-modelo (SEPEL; LORETO, 2010).

3.2 Grupo e subgrupo *willistoni*

Dentro do subgênero *Sophophora* e gênero *Drosophila* se destaca o grupo *willistoni*, composto por 24 espécies com distribuição essencialmente neotropical. O grupo se divide em três subgrupos distintos: i) o subgrupo *willistoni*, constituído por seis espécies crípticas: *Drosophila willistoni*, *Drosophila paulistorum*, constituída por várias semiespécies, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana* (VAL et al., 1981), sendo *D. willistoni* a espécie de maior distribuição geográfica, seguida pela *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*; ii) o subgrupo não críptico *alagitans* com 12 espécies, sendo as mais estudadas *D. nebulosa*, *D. capricorni* e *D. fumipennis* (SPASSKY et al., 1971) e iii) subgrupo *bocainensis*, composto por cinco espécies.

Segundo Throckmorton (1975) a origem do grupo *willistoni* se deu na América do Sul, após uma migração ancestral da América do Norte. Como já mencionado no texto o grupo *willistoni* de *Drosophila* é um dos mais representativos da região Neotropical, sendo encontrados nos mais diversos biomas brasileiros: Pampa (POPPE et al., 2014), Caatinga (GARCIA et al., 2014), Amazônia (MARTINS; OLIVEIRA, 2007), Cerrado (CHAVES; TIDON, 2008), Mata Atlântica (DE TONI et al., 2007) e Pantanal. Ainda, algumas espécies do grupo *willistoni* são encontradas em ambientes urbanos, como relatado por Garcia et al. (2008).

As espécies do subgrupo *willistoni* possuem uma grande similaridade em sua morfologia externa e sua identificação taxonômica é realizada através da diferenciação nas estruturas da genitália masculina. O subgrupo *willistoni* é um dos

grupos de drosofilídeos mais abundantes na região neotropical (GARCIA et al., 2014). De modo geral, formam um complexo de vários níveis taxonômicos (DOBZHANSKY, 1957), sendo fonte de vários estudos biológicos, através de arranjos sequenciais de estágios evolutivos, tornando-se modelos ideais para análises evolutivas.

Burla et al. (1949) foram os primeiros a designarem o termo espécies crípticas ou *siblings* (espécies-irmãs), tradicionalmente usado para classificar as espécies pertencentes ao subgrupo *willistoni*. Segundo Mayr (1963) o termo *siblings* refere-se a “populações naturais morfologicamente idênticas ou muito semelhantes, mas reprodutivamente isoladas”.

O interesse teórico por espécies crípticas reside no fato de elas atestarem a possibilidade da existência de isolamento reprodutivo entre espécies sem que seja acompanhado, obrigatoriamente, de mudanças morfológicas; ou que diferenças fisiológicas entre espécies possam estar presentes em indivíduos que são morfologicamente muito semelhantes (crípticos). Dobzhansky (1970) reforçou também este conceito, salientando que “as espécies são fenômenos da natureza que existem independentemente da nossa capacidade para distingui-las”.

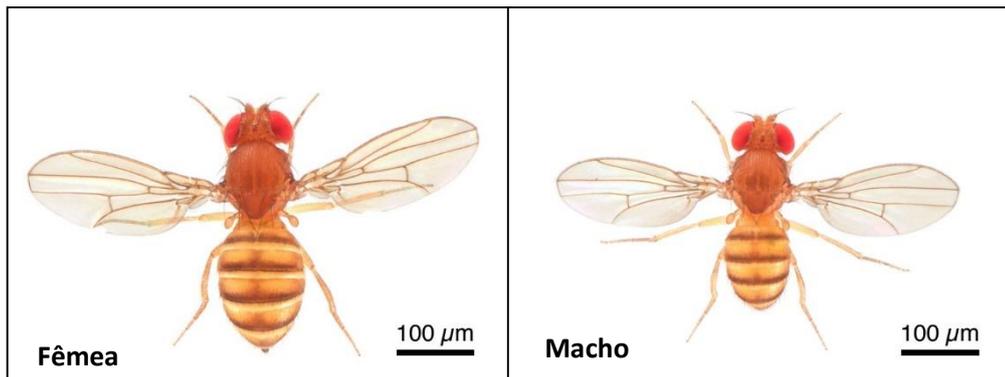
3.3 *Drosophila willistoni*

Em 1896, Samuel Williston publicou o trabalho intitulado “On the Diptera of St. Vincent (West Indies)” e nele descreveu uma nova espécie pertencente ao grupo *willistoni* denominando-a de *Drosophila pallida*, desconhecendo o fato de que já havia uma espécie com a mesma nomenclatura. Anos mais tarde esse “equivoco” foi corrigido e a mosca descrita foi então nomeada de *Drosophila willistoni* em sua homenagem.

A espécie *Drosophila willistoni* (Figura 1) tem a maior distribuição geográfica dentre as espécies do subgrupo *willistoni*, sendo encontradas em abundância desde o México e Flórida até o sul do Brasil, Uruguai e Argentina do Oceano Atlântico ao Pacífico, exceto em áreas de grande altitude e desertos (SPASSKY et al., 1971; EHRMAN; POWELL, 1982), até mesmo em áreas urbanas (SPASSKY et al., 1971) (Figura 3). Na Flórida, Uruguai e Argentina e norte do México encontra-se apenas *D. willistoni* (SPASSKY et al., 1971). Em outras localidades, no entanto, *D. willistoni*

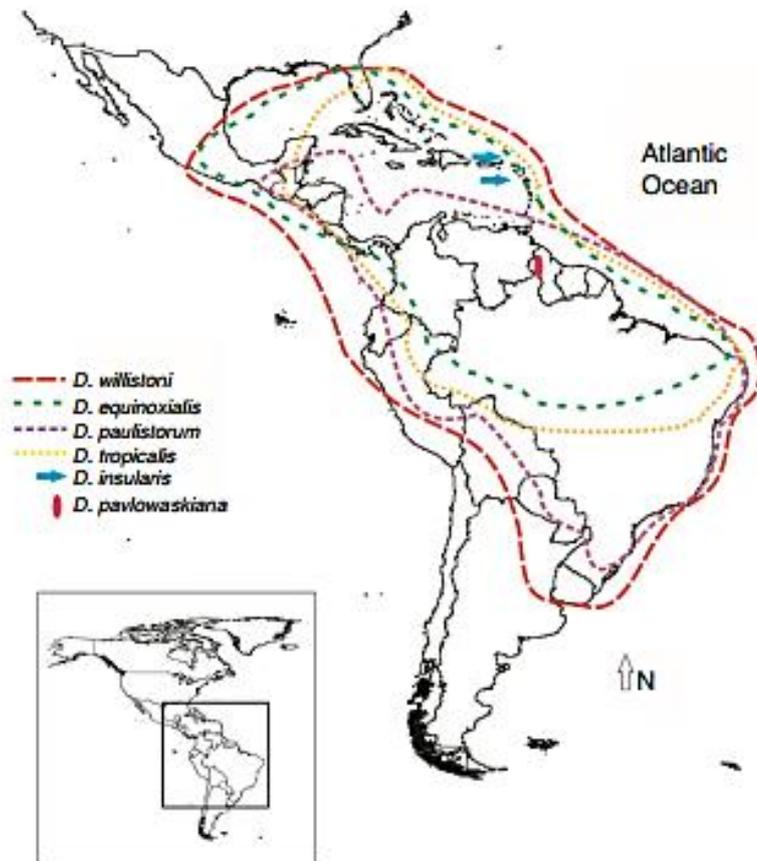
encontra-se em simpatria com outras espécies do subgrupo. Nas Antilhas Maiores (Cuba, Jamaica, Haiti e Porto Rico) vive juntamente com as espécies *D. tropicalis* e *D. equinoxialis*; nas Antilhas Menores, coabita apenas com *D. insularis* (SPASSKY et al., 1971). Ela se destaca por ser a espécie de drosofilídeo predominante das florestas quentes úmidas da América Central e da América do Sul.

Figura 1- Imagens da morfologia externa de uma fêmea e um macho de *Drosophila willistoni*



Fonte: FLYBASE, 2015.

Figura 2 - Figura 2. Distribuição geográfica das espécies do subgrupo *willistoni*.



Fonte: Compilação de Zanini et al. (2015), de acordo com dados Spassky et al. (1971); Winge (1971); Dobzhansky e Powell (1975); Ehrman e Powell (1982); Santos e Valente (1990).

3.4 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

Os marcadores genéticos são de grande relevância em pesquisas voltadas ao estudo da diversidade genética, mapeamento de genes e também em estudos filogenéticos. Dentre os marcadores moleculares com grande potencial para a análise da diversidade genética em espécies de insetos estão os ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (ZIETKIEWICZ et al., 1994), que se destacam devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (SALIMATH et al., 1995).

Os marcadores moleculares ISSR foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem precisar conhecer previamente a sequência do DNA da espécie-alvo (ZIETKIEWICZ et al., 1994). O método é baseado em reação em cadeia da polimerase (PCR), envolvendo a amplificação de segmento

de DNA presente entre duas regiões de repetição de microssatélites idênticas orientados na direção oposta. Os iniciadores são comumente ancorados em 3' ou 5' com 1 a 4 bases degeneradas estendidas para as sequências flanqueadoras. No genoma de eucariontes, as sequências-alvo ISSR são abundantes e evoluem rapidamente (ESSELMAN et al., 1999). Desse modo, o ISSR tem mostrado ser útil em estudos de genética de populações. Várias pesquisas têm usado os marcadores ISSR para análise de variabilidade genética entre linhas híbridas de cultivares, complexos híbridos naturais e variabilidade genética de populações (WOODS et al., 2005; XIAO et al., 2006).

Em *Drosophila* este marcador tem sido pouco utilizado, com apenas alguns trabalhos para verificar relações filogenéticas no subgrupo *nasuta* de *Drosophila* (NAGARAJA, RANGANATH, 2004), para estudo de introgressão genômica em raças híbridas do complexo *nasuta-albicans* (BIJAYA, RAMACHANDRA, 2010; THONGATABAM, RAMACHANDRA, 2012) e para entender a dinâmica temporal de variação genômica em populações de *D. melanogaster* (VAULIN; ZAKHAROV, 2008). Porém, nenhum destes trabalhos analisou a variabilidade genética inter e intrapopulacional ou se aprofundou na análise da estruturação genética. Sabendo que este marcador genético tem se mostrado eficiente para investigar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de outros insetos, esse marcador foi aplicado por Melo (2018), pela primeira vez, para caracterizar a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *Drosophila willistoni*.

3.5 Elemento transponível P

O elemento P é um dos tipos de elementos transponíveis (TEs), ou elementos genéticos móveis, que têm a capacidade de se moverem de forma autônoma no genoma dos organismos (BERG; SINGER 1992). Esta movimentação e inserção em novos locais do genoma se caracteriza como um evento de mutação e, por isso, tem grande relevância no estudo de especiação, diversificação, adaptação e muitos outros aspectos relativos a evolução das espécies. Um destes aspectos se refere ao papel dos elementos na geração de rearranjos cromossômicos, com coincidência entre os sítios de inserção de diferentes TEs e pontos de quebra de inversões paracêntricas em espécies de *Drosophila* (LIM, 1988; TSUBOTA et al., 1989; CÁCERES et al.,

2001). As inversões cromossômicas são responsáveis por gerar variabilidade genética, pois podem promover a ruptura de um gene, modificar o padrão de segregação dos genes que estão presentes dentro na inversão (que se comportam como um supergene), ou ainda, podem alterar a expressão de genes vizinhos pelo efeito de posição (CÁCERES et al., 1999; PUIG et al., 2004). Sendo assim, TEs são importantes tanto no direcionamento da evolução do genoma, quanto potenciais sequências genéticas envolvidas nas características adaptativas (fitness) das espécies (KELLEHER, 2016).

Entre os vários tipos de TEs, o elemento P é o mais estudado. Com 2,9 kb de tamanho, ele possui dois genes sobrepostos: um que codifica uma transposase e outro que codifica um repressor da transposição (CRAIG, 1990). Daniels et al. (1990) demonstraram que o elemento P presente na espécie *Drosophila melanogaster* é praticamente idêntico ao elemento P presente em *D. willistoni* (a diferença é de apenas um nucleotídeo em 2,9 kb). Este fato chama atenção, visto que a divergência evolutiva entre os dois grupos das espécies (*melanogaster* e *willistoni*, respectivamente) é estimada em 40 milhões de anos. Logo, seria esperado que neste tempo, as sequências do elemento P tivessem adquirido modificações. Diante disso, os autores sugeriram a transmissão horizontal (troca de material genético entre espécies), de *D. willistoni* (a provável espécie doadora) para *D. melanogaster*.

A ancestralidade do elemento P em *D. willistoni* se baseou no fato de que outras espécies do subgrupo também possuem P, como *D. paulistorum* e todas suas seis subespécies (DANIELS et al., 1984), ao contrário das espécies irmãs a *D. melanogaster*, que não possuem essa sequência em seus genomas. Sendo assim, é possível que o elemento P possa ser um marcador de interesse para identificação das espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*.

Até recentemente, praticamente todo progresso na genética reprodutiva e na genética moderna se baseou no ensaio fenotípico ou morfológico. Porém, com o advento dos marcadores moleculares nas últimas décadas, uma nova geração de marcadores foi introduzida, que se tornaram ferramentas importantes no aprimoramento dos estudos genéticos de espécies. Os marcadores moleculares forneceram um meio ideal para identificar genótipos, estimar a relação entre diferentes acessos e seguir a herança de caracteres evolutivos importantes. E aqueles baseados

em sequências de DNA estão sendo amplamente utilizados no estudo do polimorfismo entre espécies ou em populações.

Os marcadores moleculares forneceram um meio ideal para identificar genótipos, estimar a relação entre diferentes acessos e seguir a herança de caracteres evolutivos importantes. E aqueles baseados em sequências de DNA estão sendo amplamente utilizados no estudo do polimorfismo entre espécies ou em populações. A aplicação depende em grande parte do tipo de marcadores empregados, distribuição de marcadores no genoma, tipo de loci que amplificam, nível de polimorfismo e reprodutibilidade dos produtos.

Neste cenário, o presente estudo pretende contribuir com novas abordagens para o estudo dos fenômenos de especiação, para a evolução de espécies crípticas e para o conhecimento das bases genéticas da diversidade e dos polimorfismos em espécies do subgrupo willistoni de *Drosophila*, com uso de marcadores de DNA.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao polo positivo (ânodo).

A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso, em um dado momento da eletroforese, moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz. O tipo de matriz que é usada (agarose ou poliacrilamida) depende do tamanho dos fragmentos de DNA que se pretende separar e visualizar. Pela diferença nos tamanhos dos poros das matrizes, o gel de agarose é o mais utilizado para a separação de fragmentos entre 0,2 kb e 50 kb; enquanto que o gel de poliacrilamida serve para separação de fragmentos menores de até 1kb.

Entre as várias técnicas de eletroforese, a metodologia em gel de poliacrilamida (PAGE) é a mais utilizada para separação e visualização de pequenos fragmentos de DNA (5-500 pb). A matriz desses géis é mais eficiente, pois possui poder de resolução extremamente alto, diferenciando fragmentos de DNA com comprimento mínimo de 1

pb ou 0,1% de sua massa, podendo ser separados uns dos outros com melhor visibilidade (STELLWAGEN, 1988).

Os géis de poliacrilamida são, portanto, um excelente meio de suporte para separações eletroforéticas, pois possuem uma série de vantagens, como transparência, elasticidade, porosidade controlável e compatibilidade com uma ampla variedade de compostos químicos (SAMBROOK et al., 2001).

A poliacrilamida é formada pela polimerização de dois compostos, acrilamida e bis-acrilamida (N, N'-metileno-bis-acrilamida), em uma reação iniciada por tetrametiletenodiamina (TEMED) e persulfato de amónio (APS). O APS ativa o TEMED, que por sua vez ativa o monômero de acrilamida iniciando o processo de polimerização, formando assim uma rede de porosidade bastante uniforme (GUILLIAT, 2002).

4 ARTIGO 1

A ser submetido para *Hereditas*

Fator de Impacto: 1,345



Eletoforese em gel de poliacrilamida: metodologia eficaz na análise dos fragmentos de ISSR em populações de *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera)

Polyacrylamide gel electrophoresis: an effective methodology for the analysis of ISSR fragments in *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) populations.

Anadeje Celerino dos Santos¹, Ana Patrícia da Costa¹, Flavia Tadeu de Araújo², Zilpa das Graças Silva de Melo¹, Ana Maria Benko-Iseppon², Amaro de Castro Lira Neto³ e Claudia Rohde¹.

¹Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/CAV), Vitória de Santo Antão-PE. ² Departamento de Genética, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE. ³ Laboratório de Genômica, Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife-PE.

Resumo

Drosophila willistoni (Insecta, Diptera) é uma espécie com ampla distribuição geográfica na região Neotropical. Diversos estudos demonstram sua grande versatilidade ecológica, por ser capaz de explorar diversos ambientes (como matas, formações abertas, cidades etc), mas tendo clara preferência pelas florestas quentes e úmidas, onde é uma das espécies mais abundante dentro da família Drosophilidae. O objetivo deste trabalho foi conhecer a estrutura genética padrão entre as populações de *D. willistoni*, utilizando uma metodologia aperfeiçoada em gel de poliácridamida para o marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs). Para isso foram coletados indivíduos de diversas regiões do Brasil (Nordeste, Norte e Sudeste) e foi realizada a caracterização taxonômica, visto que a espécie é críptica de outras cinco espécies. Neste estudo, foram estabelecidas pelo menos 10 isolinhagens, de cada população. O DNA das isolinhagens foi extraído a partir de um indivíduo, com o *kit* Puregene. As regiões genômicas *ISSR* foram amplificadas por PCR, com *primers* específicos, 844 (CT_8RC) e o 868 (GAA_6). As sequências amplificadas foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliácridamida 6%, e variaram de 300 a 1200 pares de bases após revelação com nitrato de prata. O resultado dos padrões de bandas obtidos foi devidamente foto documentado e revelaram similaridade entre eles, já que a Eletroforese em gel poliácridamida permitiu o refinamento na separação dos fragmentos obtidos pelo marcador genético *Inter Simple Sequence Repeats*.

Palavras-chave: Marcador genético, espécie críptica, drosofilídeos.

Introdução

Nas últimas décadas a técnica de eletroforese vem sofrendo aperfeiçoamento, garantindo uma maior facilidade e precisão na diferenciação e análises moleculares. O termo eletroforese descreve a migração de uma partícula carregada, numa solução, sob influência de um campo elétrico (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O método mais utilizado é a eletroforese zonal, utilizando uma matriz sólida, o gel de poliácridamida (GÖRG, 2003). A partir da ampla variedade de estratégias de separação de proteínas disponíveis, a eletroforese tornou-se o primeiro princípio explorado para

separação de fragmentos de DNA e RNA, sendo amplamente empregada em técnicas de biologia molecular. Nesse tipo de eletroforese, as grandes moléculas, de maior peso molecular (PM), têm sua migração retardada com relação às moléculas de menor tamanho.

Os géis de poliacrilamida são constituídos pela polimerização da acrilamida e da N,N'-metilenobisacrilamida, que é induzida por radicais livres e apresentam poros de dimensões moleculares, sendo que a separação nessas malhas é baseada tanto nos princípios da filtração em gel, como na mobilidade eletroforética das moléculas. A poliacrilamida é uma mistura de dois polímeros, acrilamida e bisacrilamida, o sistema da corrida do gel poliacrilamida é feita em cubas verticais e para preparar este gel, basta adicionar os dois polímeros nas concentrações desejadas em um suporte de vidro e na presença de um catalisador.

Entre os marcadores de DNA identificados por meio da eletroforese está o *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs) que, em *Drosophila*, tem sido pouco estudado. ISSRs são marcadores estáveis e se mostram eficientes na produção de padrões polimórficos intraespecíficos e interespecíficos. A presença de banda no gel correspondente ao fenótipo dominante (homozigoto ou heterozigoto) e a ausência de banda corresponde ao fenótipo recessivo (GUPTA *et al.*, 1994, AVISE, 2004). Alguns estudos demonstram a eficiência desses marcadores para investigar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de insetos (THONGATABAM; RAMACHANDRA, 2012). No presente trabalho, o ISSR foi estudado em gel de poliacrilamida, como marcador para caracterizar a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *Drosophila willistoni*.

Material e Métodos

Coleta e identificação do material biológico

Para obtenção das amostras de *Drosophila willistoni* foram feitas coletas em quatro regiões geográficas do Brasil: Amazônia, Floresta Atlântica da região Nordeste e Sul do Brasil, e Cerrado (**Tabela 1**). Para cada coleta foram utilizadas 20 armadilhas padrão, seguindo as especificações de Tidon e Sene (1988). As armadilhas, feitas com garrafas plásticas e contendo banana no interior para atração dos adultos,

permaneceram suspensas a 1,5 m do solo (distantes 30 m uma da outra) por 2 dias (48h).

Em laboratório, os drosofilídeos adultos coletados foram anestesiados com éter etílico e aqueles identificados como pertencentes ao subgrupo críptico *willistoni* (subgênero *Sophophora*, grupo *willistoni*) foram separados em tubos individuais para cultivo e obtenção de seus descendentes (linhagens isofêmeas). Os descendentes machos de cada isolinhagem foram analisados quanto a genitália, sendo para isso dissecados de acordo com a metodologia de Bächli et al. (2004), e identificados ao nível de espécie, de acordo com a morfologia do hipândrio (ROHDE et al., 2010), analisada em microscópio de luz, ao aumento de 40x. De cada um dos locais amostrados foram separadas as isolinhagens de *D. willistoni* para a extração do DNA, totalizando 75 representantes a serem investigados.

Extração de DNA e amplificação das sequências ISSR

O DNA de cada um dos 75 machos de *D. willistoni* foi extraído separadamente, a partir da maceração do indivíduo, usando o *kit* PUREGENE (Qiagen). Cada macho *D. willistoni* foi macerado em microtubos e incubado em tampão de lise do *kit* (100 mM Tris HCl; 100 mM EDTA; SDS 1%; 60 mM NaCl) a 65°C por 60 min. Em seguida, o RNA foi degradado pela enzima RNase (1,5 µL a 4 mg/mL), sendo misturado de forma lenta (invertido por aproximadamente 25 vezes) com posterior incubação a 37°C por 30 min. As proteínas foram precipitadas com solução de precipitação do *kit* (100 µL) à temperatura ambiente, com agitação posterior em vortex, por 20 seg. O material foi transferido ao gelo por 5 min e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante contendo o DNA foi coletado em um microtubo de 1,5 mL, contendo 100 µL de isopropanol 100% do *kit*.

Após ser invertido vagarosamente por aproximadamente 50 vezes, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. Logo após essa etapa foi realizado o descarte do sobrenadante e adicionado 300 µL de etanol 70%. Posteriormente, os tubos foram invertidos cerca de oito vezes para lavar o precipitado de DNA e o material foi submetido a 14.000 rpm por 3 min, depois o etanol foi descartado e os microtubos levados a estufa para secagem durante 40 min. Ao DNA isolado foi adicionado 20 µL de solução de hidratação do *kit* a fim de ressuspender o DNA, que durou cerca de 1 h

a 65°C ou durante toda a noite (*over night*) em temperatura ambiente, passado esse período o material foi armazenado a 20°C.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo água ultrapura, tampão de PCR (1x), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,25 mM cada), primer ISSR (1 mM), enzima *Taq* polimerase (0,1 U) e 1 µL de amostra de DNA (30 ng/µL). As condições de amplificação incluíram uma desnaturação inicial a 94°C durante 4 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento dos *primers* de ISSR na temperatura específica (**Tabela 2**) por 45 seg, polimerização a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 7 min.

Eletroforese em gel poliacrilamida

O produto do PCR dos *primers* ISSR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (LAEMMLI, 1970), com 1 mm de espessura, não desnaturante. A preparação da matriz do gel ocorreu a partir de uma base de acrilamida a 30% e TBE 5x (14 mL da matriz do gel acrilamida 30%, 32 mL do TBE 5x e 90 mL de água destilada).

As duas placas do aparato de eletroforese são feitas de vidro temperado e foram limpas com acetona e etanol, por duas vezes, com cada reagente. Com as placas (repelente e aderente) limpas e secas, foram aplicados 2 mL de *repel* (Sigma) com a ponta de um papel na placa repelente. Após 20 min, foi aplicado, na placa aderente, a solução aderente, composta por 2 microtubos de 2 mL, cada um com 2 mL de etanol absoluto, 15 µL ácido acético e 15µL de *bind* (Sigma). Por fim, foram colados os separadores na placa maior (aderente) colocando-os em cima da placa menor (repelente).

Após o tratamento e montagem das placas, foi feita a aplicação da acrilamida 6% (14 mL da Matriz do gel 30%, 200 µL de TEMED e 600 µL de APS 10%) de forma gradativa a partir do centro para as bordas das duas placas. A acrilamida demora 1h para polimerizar. A matriz do gel 30% é preparada previamente com: 1 g de solução bis/acrilamida, 29 g de acrilamida, e água destilada para completar 100 mL. Após esse processo, é feita a montagem da placa na cuba de eletroforese vertical, e inicia-se a pré-corrida do gel, com duração de 30 min.

Para o preparo das amostras de DNA, foi utilizada a proporção de 1 de tampão para 5 da amostra. Após as aplicações das amostras no gel, o aparato vertical de eletroforese foi conectado a uma fonte, e submetido a corrente constante de 900 V e 33 mA, por 2 h. O marcador de peso molecular utilizado foi DNA Ladder 100 (Invitrogen).

Após a corrida eletroforética, os fragmentos ISSR foram revelados com Nitrato de Prata. Para isso é necessário realizar os tratamentos na placa com as soluções para revelação do gel e esperar o tempo específico para cada etapa: fixação do gel - 10 min (etanol 10%; ácido acético 1%); Solução de Pré-Tratamento - 5 min (ácido nítrico a 1,5%), solução de prata - 20 min (nitrato de prata 0,2%), solução reveladora - duração do tempo até revelação das bandas no gel (60 g de carbonato de sódio, 200 mL de água destilada, 11,2 mL de formaldeído); e por último a solução bloqueio - 10 min (ácido acético 5%). Após a aplicação de cada solução, a placa foi lavada com água destilada. Ao final, as bandas reveladas no gel foram escaneadas em impressora padrão ou fotografadas, para a análise final dos padrões de fragmentos ISSR gerados.

Resultados e Discussão

Nas últimas décadas, a técnica de eletroforese tem sofrido aperfeiçoamentos constantes. Este estudo se propôs a estabelecer as condições ideais para preparação e revelação de fragmentos ISSR em *D. willistoni* em gel de poliacrilamida 6% e coloração com Nitrato de Prata. Após uma série de ajustes, foram obtidas as imagens de bandas ISSR em gel de poliacrilamida com o *primer* 844 (CT_8RC) e o *primer* 868 (GAA_6), mostradas nas **Figuras 1 e 2**, respectivamente.

A qualidade do material revelado permitiu uma comparação entre as populações e indivíduos de *D. willistoni*. Na **Figura 1** podem ser visualizadas 15 bandas, com tamanhos entre 400 a 1200 pb. Seis bandas foram frequentes, ocorrendo em pelo menos duas populações, enquanto que as demais foram bandas específicas de apenas uma população geográfica. Uma variabilidade de sete bandas foi observada na população de Brejos dos Cavalos (Caruaru/Pernambuco), enquanto duas bandas foram observadas na amostra do Parque Municipal Morro do Osso (Porto Alegre, Rio Grande do Sul).

A **Figura 2** mostra resultados de maior variabilidade, pois foram gerados grande número de fragmentos com o *primer*GAA₆. Os tamanhos de bandas variaram entre 400 a 1500 pb. Bandas frequentes ocorreram em várias populações, e bandas específicas ocorreram em determinados indivíduos, de apenas uma população geográfica.

As bandas ISSR reveladas pelos géis de poliacrilamida indicam que as isolinhagens de uma mesma população compartilham um mesmo padrão de tamanhos de fragmentos. Quando estes padrões são comparados entre as populações há uma pequena variação nos tamanhos dos fragmentos, que talvez representem variabilidade específica para cada população geográfica.

A metodologia de estudo de ISSR em gel de poliacrilamida e os resultados das bandas variáveis e bem definidas obtidas entre amostras de *D. willistoni* apontam para a possibilidade desta análise dos padrões ISSR ser capaz de definir as relações de similaridade entre populações de *D. willistoni*.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Locais de coleta da espécie *Drosophila willistoni* nos diferentes biomas do Brasil e número de linhagens estabelecidas para este estudo.

Bioma, Código e Local de Coleta	Coordenadas e ano da coleta		Isolinhas em cultivo
Floresta Amazônica			
MAR - Marituba, Pará	01°25'S; 48°19'W	2014	08
ANA - Anavilhanas, Novo Airão, Amazonas	03°04'S; 61°32'W	2018	13
Floresta Atlântica			
RIO - Parque Nacional Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro	22°32'S; 43°23'W	2013	02
GUA - Reserva Biológica de Guaribas, Mamanguape, Paraíba	06°43'S; 35°10'W	2013	08
SAL - Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré, Pernambuco	08°44'S; 35°11'W	2013	12
PDI - Parque Estadual Dois Irmãos, Recife, Pernambuco	08°00'S; 34°57'W	2013	03
BJC - Brejo dos Cavalos, Caruaru, Pernambuco	08°17'S; 35°58'W	2013	10
SER - Parque Nacional de Serra da Canastra, São Roque de Minas, Minas Gerais	20°16'S; 46°66'W	2013	04
JEQ - Pousada, Jiquiriçá, Bahia	13°26'S; 39°57'W	2013	03
ALD - Aldeia dos Camrás, Paudalho, Pernambuco	08°01'S; 34°58'W	2017	08
OSS - Morro do Osso, Porto Alegre, Rio Grande do Sul	30°01'S; 51°13'W	2017	02
Cerrado			
BRA - IBGE, Brasília, Distrito Federal	15°46'S; 47°55'W	2015	02

Tabela 2. Sequência dos *primers* ISSR e as temperaturas de anelamento.

Código	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Abreviatura	Temperatura (°C) de anelamento
844	CTCTCTCTCTCTCTRC	(CT) ₈ RC	52,8
868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	(GAA) ₆	49,7

R = (nucleotídeos A ou G); Y = (nucleotídeos C ou T).

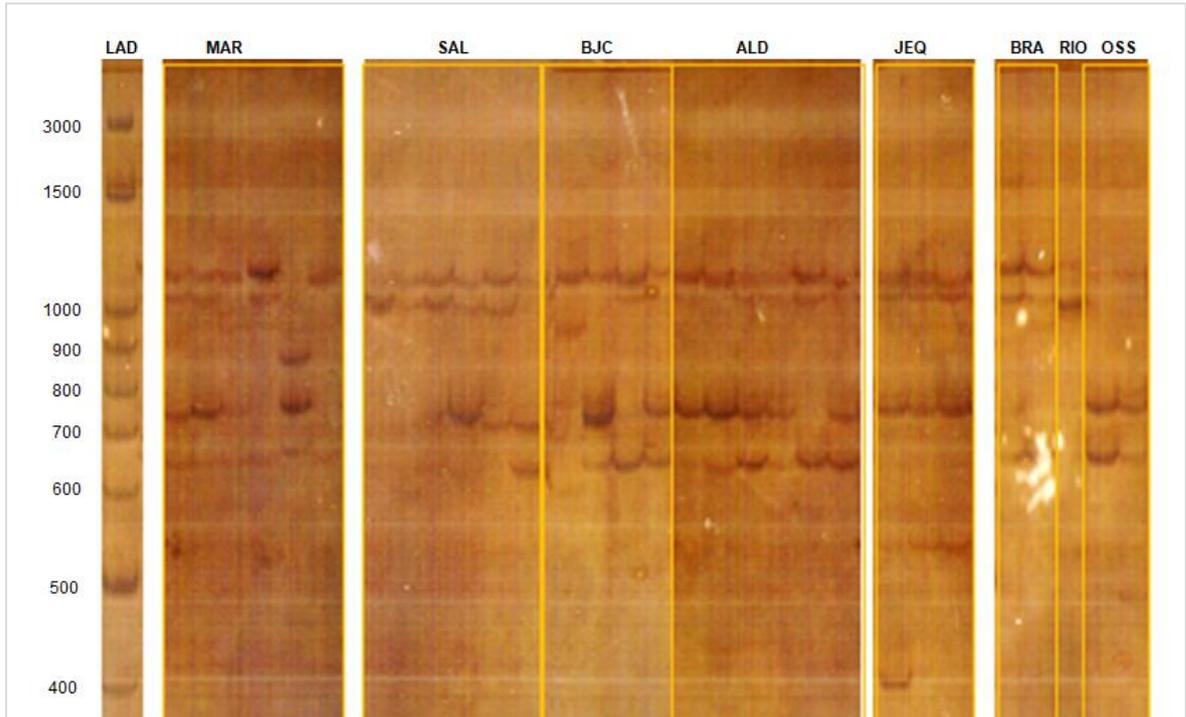


Figura 1. Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelação com Nitrato de Prata, indicando os padrões de bandas ISSR amplificadas por PCR com o *primer 844* (CT_8RC). As amostras de populações naturais de *Drosophila willistoni* foram: MRI= Marituba/PA, SAL= Saltinho/PE, BJC= Brejo dos Cavalos/PE, ALD= Aldeia/PE, JEQ= Jequiriçá/BA, BRA= Brasília/DF, RIO= Rio de Janeiro/RJ, OSS= Rio Grande do Sul/RS.

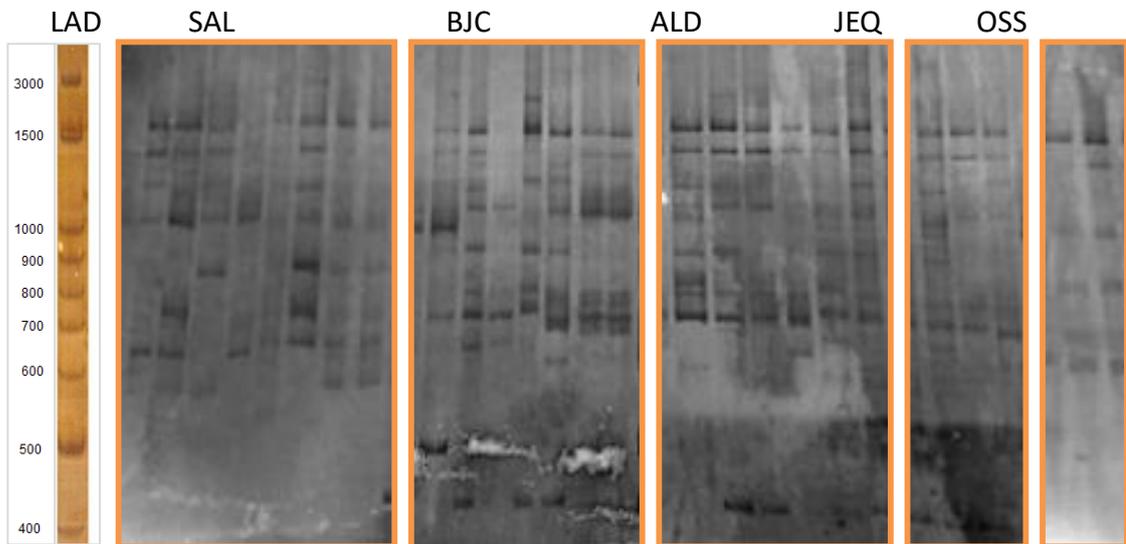


Figura 2. Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelação com Nitrato de Prata, indicando os padrões de bandas ISSR amplificadas por PCR com o *primer 868* (GAA_6). As amostras de populações naturais de *Drosophila willistoni* foram: SAL= Saltinho/PE, BJC= Brejo dos Cavalos/PE, ALD= Aldeia/PE, JEQ= Jequiriçá/BA, OSS= Rio Grande do Sul/RS.

Agradecimentos

Aos colegas do Laboratório de Genética, pelo apoio e suporte técnico em diversas etapas deste estudo. Aos órgãos financiadores, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

REFERÊNCIAS

- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2nd ed. Sinauer: Sunderland, MA, 2004.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Federal District, Brazil: Embrapa, 1998.
- GÖRG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis: An International Journal**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2003.
- GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J.E.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 998-1006, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- THONGATABAM, B.; RAMACHANDRA, NALLUR B. Genomic introgression in laboratory evolved hybrid races, Cytorace 1 and Fissioncytorace-1 of *Nasuta albomicans* complex (NAC) of *Drosophila* (Insecta, Diptera) as revealed by RAPD and ISSR markers. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, n. 4, p. 520-529, 2012.
- TIDON, R.; SENE, F. M. A. Trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service**. v. 67, p. 89, 1988.

5 ARTIGO 2

Artigo em preparação
a ser submetido para *Hereditas*
Fator de Impacto: 1,345



Caracterização de três espécies crípticas do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* por meio de sequências do elemento transponível P em gel de poliacrilamida

Characterization of two cryptic species of the *Drosophila willistoni* subgroup by transposable element P sequences on polyacrylamide gel

Anadeje Celerino dos Santos^{1*}, Ana Patrícia da Costa^{1*}, Flavia Tadeu de Araújo², Zilpa das Graças Silva de Melo¹, Ana Maria Benko-Iseppon², Amaro de Castro Lira Neto³ e Claudia Rohde¹.

¹Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/CAV), Vitória de Santo Antão-PE. ² Departamento de Genética, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE. ³ Laboratório de Genômica, Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife-PE.

* Ambas autoras contribuíram igualmente para o estudo.

Resumo

Neste trabalho foi investigada a variabilidade genética existente no elemento de transposição P em três espécies crípticas do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*: *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Para a melhor caracterização genética, as amostras das espécies foram obtidas de populações naturais e recentemente coletadas. Foram avaliados os tamanhos de fragmentos amplificados do elemento P através de gel de poliacrilamida a fim de verificar a possível caracterização das espécies, através do padrão de tamanhos bandas. Concluímos que as características encontradas são bons candidatos a serem marcas diagnósticas taxonômicas, graças à boa definição das bandas, obtidas na metodologia aprimorada neste estudo, em gel de poliacrilamida.

Palavras-chave: Espécies crípticas, especiação, variabilidade genética.

Introdução

Drosophila é o gênero mais especioso dentro da família Drosophilidae, com mais de 1.700 espécies distribuídas em diversos tipos de ecossistemas (BÄCHLI, 2018). Destas pelo menos 181 ocorrem no Brasil, segundo a revisão de Gottschalk et al. (2008).

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

O subgrupo *willistoni* apresenta ainda vários níveis taxonômicos com sucessivos graus de isolamento reprodutivo (ROBE et al., 2010), com diferenciação taxonômica até o nível de subespécies (ZANINI et al. 2018).

O reconhecimento diagnóstico das espécies crípticas do subgrupo *willistoni* é trabalhoso. Pode ser feito por meio de experimentos de cruzamentos em ambas direções (macho x fêmeas; fêmeas x machos) envolvendo todas as espécies reconhecidas como pertencentes ao subgrupo *willistoni*, com linhagens já identificadas. Após a ocorrência dos possíveis cruzamentos é feita também a análise da fertilidade da prole e identificação de possíveis indivíduos estéreis (DOBZHANSKY; SPASSKY, 1959) o que permite a identificação das espécies biológicas. Outra metodologia disponível é a que envolve a caracterização microscópica de estruturas da genitália do macho, analisadas através de técnicas combinadas de microscopia eletrônica e de varredura, ou de sequenciamento de genes, que ampliaram as possibilidades de reconhecimento das espécies crípticas (ROBE et al., 2010; ZANINI et al., 2015, 2018).

Mesmo diante de variados métodos para identificação a nível taxonômico deste grupo de espécies de elevada complexidade evolutiva, cada metodologia ainda apresenta dificuldades para aplicação ou incertezas quanto aos resultados, sem padrões muito bem definidos que garantam a classificação taxonômica. Diante disso, é necessário ampliar as metodologias não só para a identificação das espécies, mas também para o estudo da diversidade dentro e entre suas populações naturais, visto que se tratam de excelentes organismos para o entendimento dos processos de especiação na região neotropical.

Há, portanto, exigências de mais estudos para resolver incertezas taxonômicas e obter conclusões mais completas e definitivas sobre esses indivíduos em constante diversificação evolutiva (KASTRITSIS, 1967; DOBZHANSKY; POWELL, 1975). E entre os processos que podem gerar a variabilidade genética e interferir em processos evolutivos estão os elementos genéticos de transposição, que são sequências moderadamente repetitivas dispersas no genoma e que podem representar até 15% do genoma de drosofilídeos (KAZAZIAN, 2004; MILLER; CAPY 2004; BOURQUE et al., 2018).

Entre os vários tipos de elementos transponíveis, o elemento P é o mais estudado com 2,9 kb de tamanho, apresentando quatro exons, com dois genes sobrepostos, um que codifica a transposase e outro que codifica o repressor da transposição (CRAIG, 1990). O elemento P tem sido implicado como causador de inversões em populações naturais de *D. willistoni* devido à sua posição coincidir com

pontos de quebra de inversões (KUSAKABE et al. 1990, LYTTLE; HAYMER 1992, REGNER et al. 1996). Segundo estes trabalhos, os elementos transponíveis atuam na geração de quebras cromossômicas que facilitam novas inserções e alterações marcantes na estrutura cromossômica. No contexto deste estudo, vale salientar que TEs contribuem no direcionamento da evolução dos genomas estruturais, por gerarem não só rearranjos, mas também por induzirem quebras de fita dupla do DNA, e por influenciarem a arquitetura da expressão e regulação gênica de organismos eucariotos, e conseqüentemente, nos processos de especiação (BOURQUE et al., 2018).

Material e Métodos

Os locais de coleta e estabelecimento de isolinhagens aqui estudadas das espécies *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* estão descritos em Silva et al. (*em preparação*), da mesma forma que os procedimentos de extração de DNA e desenvolvimento da metodologia de preparação de gel de poliacrilamida e corrida eletroforética. Para amplificação de sequências parciais do elemento transponível P, na região entre os exons 2 e 3, foram seguidas as descrições descritas em Lee et al. (1999). Brevemente, os fragmentos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (LAEMMLI, 1970), com 1 mm de espessura, não desnaturante, com a seguinte composição: 6 mL de solução bis/acrilamida 1:29; 5 mL de sacarose 70%; 1 mL TBE 10 X; 7 µL TEMED; 100 µL APS 10% para 10 mL de solução de gel. O tampão foi composto por TRIS-glicina 0,1 M pH 8,3. O material amplificado de sequências do elemento P foi submetido a uma corrente com voltagem constante de 180 V e 30 mA, em uma cuba com 150 mm x 170 mm x 0,7 mm. A corrida eletroforética durou 3h30min. Para comparações, um DNA padrão de peso molecular foi aplicado no gel (DNA Ladder 100 e/ou Low Mass da Invitrogen). As bandas foram visualizadas após coloração com Nitrato de Prata.

Resultados e Discussão

Os resultados estão apresentados na **Figura 1A**, para amostras de *D. willistoni*, **Figura 1B** para *D. paulistorum*, e **Figura 1C** para *D. equinoxialis*. Algumas amostras tiveram seus DNAs extraídos e sequenciados para o gene nuclear Ankyrin por Melo (2018) e Costa (2019), a fim de confirmar a classificação das espécies crípticas.

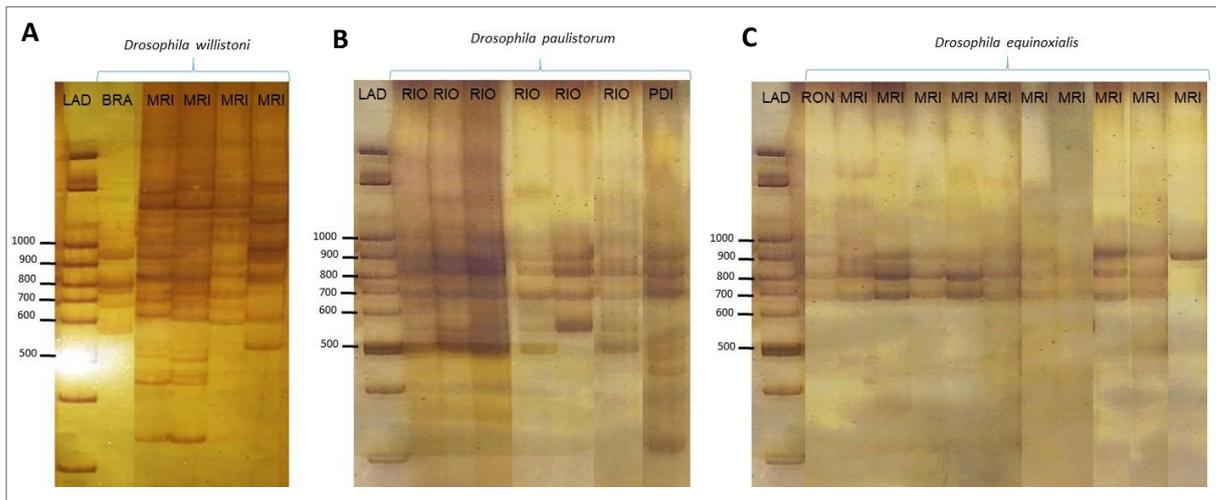


Figura 1. Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelação com Nitrato de Prata, indicando os padrões de bandas de elemento transponível P em amostras de *Drosophila willistoni* (A), *D. paulistorum* (B) e *Drosophila equinoxialis* (C). BRA=Brasília, MRI= Marituba-Pará, RIO= Rio de Janeiro, PDI= Parque Dois Irmãos-Pernambuco, RON= Rondônia. LAD=marcador DNA ladder 100 pb.

Como apresentado na figura, a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida do elemento P é um marcador viável para diferenciação das três espécies crípticas. A metodologia evidenciou tanto um padrão de bandas espécie-específico (**Figura 2**), quanto a ocorrência de diferenciação dentro das populações estudadas, como exemplo a do Rio de Janeiro (RIO) para *D. paulistorum*; e a de Marituba (MRI) para *D. equinoxialis* e *D. willistoni*, as com maior amostragem.

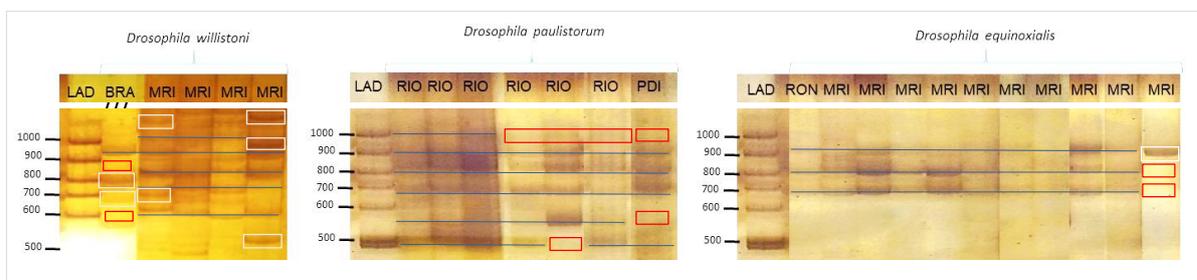


Figura 2. Detalhe da imagem da Figura 1, para tamanhos de bandas entre 500 e 1000 pb, com indicação da conservação de bandas entre as amostras de cada espécie (linhas horizontais azuis); da variabilidade de bandas observadas em algumas amostras da espécie (quadrados brancos); e da ausência de bandas em algumas amostras (quadrados vermelhos).

Os resultados parecem indicar que há maior variabilidade em *D. willistoni*, seguida de *D. paulistorum* e *D. equinoxialis*. Para *D. willistoni* houve maior número de bandas reveladas, em comparação com as demais espécies. E também maior diferenciação entre os indivíduos da mesma população. E amostras da população MRI

foram mais semelhantes entre si, do que com BRA, para o padrão de bandas. Além disso, a amostra PDI (Parque Dois Irmãos, Recife, Pernambuco) mostrou padrão similar à população RIO; e a população de Rondônia (RON) de *D. equinoxialis* mostrou o mesmo padrão de bandas da população MRI. Isso parece indicar que os padrões espécie-específicos se mantêm mesmo entre populações da mesma espécie, que são distantes geograficamente.

Embora incipientes, os resultados são promissores e indicativos da necessidade do aprofundamento dos estudos de caracterização genética das espécies do subgrupo *willistoni* com uso da metodologia em gel de agarose e amplificação de sequências do elemento transponível P.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos apoios financeiros recebidos da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- BÄCHLI, G. **Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae**. Disponível em: <<http://www.taxodros.unizh.ch>> Acesso em 16 março 2018.
- BOURQUE, G.; BURNS, K.H.; GEHRING, M. et al. Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biology** v. 19, n. 199, p. 1-12, 2018.
- COSTA, A.P. **Marcadores genéticos para diferenciação das semiespécies de *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae) com ocorrência em florestas úmidas da região Neotropical**. Dissertação (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco. 2019.
- CRAIG, N.L. P element transposition. **Cell** v. 62, p. 399-462, 1990.
- DOBZHANSKY, T., POWELL, J.R. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. In: King, R.C. (Ed.), **Handbook of Genetics**. Plenum Press, New York, p. 589–622, 1975.
- DOBZHANSKY, T., SPASSKY, B. *Drosophila paulistorum* a cluster of species in *statu nascendi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.45, p. 419-428, 1959.

- GOTTSCHALK, M.S., HOFMANN P.R.P., VALENTE V.L.S. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Check List** v.4, p. 485-518, 2008.
- KAZAZIAN, H.H. Mobile elements: drivers of genome evolution. **science**, v. 303, n. 5664, p. 1626-1632, 2004.
- KASTRITSIS, C.D. A comparative study of the chromosomal polymorphs in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. **Chromosoma**, v.19, p.208–222, 1967.
- KUSAKABE, S., HARADA K., MUKAI T. The rare inversion with a P element at the breakpoint maintained in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 82, p.111-115, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, S.H., CLARK, J.B., KIDWELL, M.G. A P element-homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. **Insect Mol.Biol.**, v. 8, n.4, p.491–500, 1999.
- LYTTLE T.W., HAYMER D.S. The role of the transposable element hobo in the origin o endemic inversions in wild populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 86, p. 113 126, 1992.
- MELO, Z. G. S. Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis*. Tese (Programa de Pós-Graduação em genética), Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- MILLER, W.J., CAPY, P. Mobile genetic elements as natural tools for genome evolution. **Methods Mol. Biol.** v. 260, p. 1-20, 2004.
- REGNER L.P., PEREIRA M.S., ALONSO C.E., ABDELHEY E., VALENTE V.L. Genomic distribution of P elements in *Drosophila willistoni* and a search for their relationship with chromosomal inversions. **J Hered**, v.87, p.191-198, 1996.
- 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**, v. 138, p. 601–617, 2010.
- SILVA, A.C.S., COSTA, A.P., ARAÚJO, F.T. et al. Polyacrylamide gel electrophoresis for the analysis of ISSR fragments in populations of *Drosophila willistoni* (Insecta, Diptera) (*em preparação*).

- SPASSKY B., RICHMOND R.C., PEREZ-SALAS S. et al. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. **Evolution**, v. 25, p.129-143, 1971.
- 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**. Academic Press, v.3, London, 1981.
- 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.** 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** v. 7, p. 1-14, 2018.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados das bandas variáveis e bem definidas obtidas entre amostras de *D. willistoni* para o marcador ISSR em gel de poliacrilamida apontam para a possibilidade do uso desta análise para definir as relações de similaridade entre populações desta espécie.

A eletroforese em gel de poliacrilamida se mostrou eficaz e promissora para a caracterização genética de espécies e populações, com a vantagem de ser mais acessível economicamente, em comparação aos métodos de sequenciamento de genes marcadores.

A metodologia se mostrou também favorável para a caracterização de fragmentos parciais do elemento transponível P, entre espécies crípticas e entre populações.

Os resultados com ISSR e elemento P indicaram que há variações entre as populações das espécies, e a aplicação e aperfeiçoamento da eletroforese em gel de poliacrilamida é promissora, podendo reforçar e/ou refinar os resultados obtidos previamente em gel de agarose, visto a qualidade da separação e visualização dos pequenos fragmentos gerados.

Esse trabalho abre perspectivas para a implementação dessa técnica por nosso de pesquisa para o estudo da constituição genética e do relacionamento evolutivo das populações das espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*.

REFERÊNCIAS

- AYALA, F. J. Genetic differentiation during the speciation process. **Evolutionary Biology**, Lawrence, v.8, p.1-78, 1975.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer, 2004.
- BÄCHLI, G. **TaxoDros**: The database on Taxonomy of Drosophilidae. [s. L.]: [s. n.], 2018. Electronic Database. Disponível em: <http://www.taxodros.unizh.ch>. Acesso em: 29 mar 2018.
- BERG, P.; SINGER, M. Some genes move around in chapter. *In*: _____. **Dealing with genes**. The language of heredity. California: University Science Books, 1992.
- BIJAYA, T.; RAMACHANDRA, N. B. Racial divergence of a rare laboratory evolved centromeric fission cytotype of *nasuta-albomicans* complex of *Drosophila*. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 48, p. 511–517, 2010.
- BURLA, H.; DA CUNHA, A.B.; CORDEIRO, A.R.; DOBZHANSKY, T.; MALOGOLOWKIN, C.; PAVAN, C. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. **Evolution**, Hoboken, v.3, p. 300–314, 1949.
- CÁCERES, M.; PULG, M.; RUIZ, A. Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. **Genome Research**, New York, v.11, p.1353-1364, 2001.
- CÁCERES, M.; RANZ, J.M.; BARBADILHA, A.; LONG, M.; RUIZ, A. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by transposable element. **Science**, Washington, v.285, p. 415-418, 1999.
- CARSON, H.L.; HARTT, C.E. **The Ecology of Drosophila Breeding Sites**. [S. l.]: University of Hawaii Foundation Lyon Arboretum Fund, 1971.
- CHAVES, N.B.; TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 52, n. 3, p. 340-348, 2008.
- CRAIG, N.L. P element transposition. **Cell**, Maryland Heights, v. 62, p. 399-462, 1990.
- DANIELS, S.B.; STRAUSBAUGH, L.D.; EHRMAN, L.; ARMSTRONG, R. Sequences homologous to P elements occur in *Drosophila paulistorum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 81, p. 6794-6797, 1984.
- DANIELS, S.B.; PETERSON, K.R.; STRAUSBAUGH, L.D.; KIDWELL, M.G.; CHOVNICK, A. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, San Diego, v. 124, n. 2, p. 339-55, 1990.

DE TONI et al. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 848-862, 2007.

DE TONI, D.C. **Estudo da variabilidade genética e ecológica de comunidades de *Drosophila* em regiões de Mata Atlântica de Ilhas do Continente de Santa Catarina.** 2002. 154 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

DOBZHANSKY, T.; EHRMAN, L.; PAVLOVSKY, O. *Drosophila insularis*, a New Sibling Species of the willistoni Group. **University of Texas Publications**, Austin, v. 5721, p. 39-47, 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.

EHRMAN, L.E.; POWELL, J.R. The *Drosophila willistoni* species group. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H.L.; THOMPSON JÚNIOR, J.N. (EDS)**The Genetics and Biology of *Drosophila***. London/New York: Academic Press, 1982.v. 2, p.193-225.

ESSELMAN, E.J. et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 443-451, 1999.

FLYBASE: Base de dados pública.[S. l]: [s. n.], 2015.<http://www.flybase.org>. Acesso em julho, 2015.

GARCIA, A.C.L.; VALIATI, V.H.; GOTTSCHALK, M.S.; ROHDE, C.; VALENTE, V.L.S. Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 98, p. 329-338, 2008.

GARCIA, A.C.L.; 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. **Annals of Entomology Society of America**, Annapolis, v. 107, n. 5, p. 975-982, 2014.

GARCIA, C.F.; HOCHMULLER, C.J.C.; VALENTE, V.L.S. E SCHMITZ, H.J. Drosophilid assemblages at different urbanization levels in the city of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 41, p. 1-12, 2012.

GULLIATT, A.M. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. In: THEOPHILUS, B.D.M.; RAPLEY, R. (eds). **PCR Mutation Detection Protocols**. [S. l.]: Human Press, 2002. p. 1-12.

GOTTSCHALK, M.S. **Influência da urbanização sobre assembleias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, SC, Brasil.** 2004. 115 f. Dissertação (Programa de pós-Graduação em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GOTTSCHALK, M.S.; HOFMANN, P.R.P.; VALENTE, V.L.S. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **CheckList**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 485-518, 2008.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J. E.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin v. 89, p. 998-1006, 1994.

HUNTER, R.L.; MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, Washington, v. 125, p. 1294-1295, 1957.

KELLEHER, E.S. Reexamining the P-Element invasion of *Drosophila melanogaster* through the lens of piRNA silencing. **Genetics**, San Diego, v. 203, p. 1513–1531, 2016.

LIM J.K. Intrachromosomal rearrangements mediated by hobo transposons in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.85, p. 9135-9157, 1988.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. **Drosophila: a guide to species identification and use.** [London]: Elsevier, 2005. p. 272

MARTINS, M.B.; OLIVEIRA, L. Dinâmica espacial de *Drosophila* em remanescente de mata na reserva do Mocambo e suas áreas adjacentes. *In*: GOMES, J.I.; MARTINS, M.; SILVA, R.; ALMEIDA, S. (eds.), **Mocambo: Inventário e dinâmica biológica da área de pesquisas ecológicas do Rio Guamá**, [Belém]: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. p. 391-406.

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

MELO, Z.G.S. **Estudo da variabilidade genética de *Drosophila willistoni* (Insecta: Diptera) e infecção pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis*.** 2018. 182 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

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

POPPE, J.L.; SCHMITZ, H.J.; GRIMALDI, D; VALENTE, V.L.S. High diversity of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the Pampas biome of South America, with descriptions of new *Rhinoleucophenga* species. **Zootaxa**, Auckland, v. 3779, n. 2, p. 215-245, 2014.

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

PUIG, M.; CACERES, M.; RUIZ A. Silencing of a gene adjacent to the breakpoint of a widespread *Drosophila* inversion by a transposon-induced antisense RNA. **Proceed. Nat. Acad. Sci**, Washington, v. 101, n.24, p. 903-918, 2004.

RAND, M.D. Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **NeurotoxicolTeratolology**, Londrina, v. 1, p. 32-74, 2010.

SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 757-763, 1995.

SAMBROOK, J.F.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.**3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SEPEL, L.M.N.; LORETO, E.L.S. Um século de *Drosophila* na genética. **Genética na Escola**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 2, p. 42-47, 2010.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels. **Biochem. J.**, London, v. 61, p. 629-641, 1955.

SPASSKY, B.; RICHMOND, R. C.; PEREZ-SALAS, S.; PAVLOVSKY, O.; MOURÃO, C. A.; HUNTER, A. S.; HOENIGSBERG, 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**, Hoboken, v. 25, p. 129-143, 1971.

STELLWAGEN, N.C. **DNA gel electrophoresis.** TIETZ, D. (Ed.) **Nucleic acid electrophoresis laboratory manual.** New York: Springer Verlag, 1998.

THONGATABAM, B.; RAMACHANDRA, N.B. Genomic introgression in laboratory evolved hybrid races, Cytorace 1 and Fissioncytorace-1 of *nasuta-albomicans* complex (NAC) of *Drosophila* (Insecta, Diptera) as revealed by RAPD and ISSR markers. **Italian Journal of Zoology**, Modena: Union e zoologica italiana, v. 79, n. 4, p. 520-529, 2012.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: KING, R. C. (Ed.) **Handbook of Genetics.** New York: Plenum, 1975. p. 421– 469.

TIDON, R.; SENE, F.M.A. Trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service**, Norman, v. 67, p. 89, 1988.

TSUBOTA, S.I.; ROSENBERG, D.; SZOSTAK, H.; RUBIN, D., SHEDI, P. The cloning of bar region and B breakpoint in *Drosophila melanogaster*: Evidence for transposon-induced rearrangement. **Genetics**, San Diego, v. 122, p. 881-890, 1989.

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***. Orlando: Academic Press, 1981. v. 3, p. 123-168.

VAULIN, O.V.; ZAKHAROV, I.K. Temporal dynamics and variation of multilocus ISSR-PCR DNA markers in the Uman' population of *Drosophila melanogaster* over two decades (1984–2004). **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 44, n. 3, p. 306-311, 2008.

WHEELER, M.R. The Drosophilidae: a taxonomic overview. *In*: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, J. N. (Eds.). **The Genetics and Biology of *Drosophila***. Orlando: Academic Press, 1981. p. 1-97.

WINGE, H. **Níveis de divergência evolutiva no grupo críptico da *Drosophila willistoni***. 1971. 100f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1971.

WOODS, K.; HILU, K. W.; WIERSEMA, J. H.; BORSCH, T. Pattern of variation and systematics of *Nymphaea odorata*: I. evidence from morphology and inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Systematic Botany**, United States, v. 30, p. 471-480, 2005.

XIAO, M.; LI, Q.; WANG, L.; GUO, L. I. J.; TANG, L.; CHEN, F. ISSR analysis of the genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) ying from Western Siichuan Province, China. **Journal of Integrative Plant Biology**, Melbourne, v. 48, n. 10, p. 1140-1146, 2006.

YASSIN, Y. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 38, p. 349-364, 2013.

YEATES, D. K. E WIEGMANN, B. M. **The evolutionary biology of flies**. New York: Columbia University Press, 2005.

ZANINI, R.; DEPRÁ, M.; VALENTE, V.L.S. Can sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup be recognized through combined microscopy techniques? **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 59, p. 323–331, 2015.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.