



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Bruna Memari Trava

**Estrutura populacional de *Drosophila sturtevanti*
(subgrupo *sturtevanti*; grupo *saltans*) por meio de
microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de
drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica**

São José do Rio Preto

2018

Bruna Memari Trava

**Estrutura populacional de *Drosophila sturtevanti*
(subgrupo *sturtevanti*; grupo *saltans*) por meio de
microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de
drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências - Genética, junto ao Conselho do programa de pós-graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP- Processo 2014/14059-0;
CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Madi-Ravazzi

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus

São José do Rio Preto

2018

Trava, Bruna Memari.

Estrutura populacional de *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica / Bruna Memari Trava. -- São José do Rio Preto, 2018
124 f. : il., tabs.

Orientador: Lilian Madi-Ravazzi

Coorientador: Rogério Pincela Mateus

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Drosófila - Mata Atlântica. 3. Variação genética.
4. Marcadores genéticos. 5. Paisagens fragmentadas. 6. Distribuição espacial da população. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
II. Título.

CDU – 575

Bruna Memari Trava

**Estrutura populacional de *Drosophila sturtevanti*
(subgrupo *sturtevanti*; grupo *saltans*) por meio de
microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de
drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências - Genética, junto ao Conselho do programa de pós-graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP- Processo 2014/14059-0; CAPES.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidenta e Orientadora: Prof^a Dr^a Lillian Madi-Ravazzi
UNESP - São José do Rio Preto

Examinadora: Prof^a Dr^a Maria Tercilia Vilela de Azevedo Oliveira
UNESP - São José do Rio Preto

Examinadora: Prof^a Dr^a Adriana Coletto Morales Corrêa Castro
UNESP – Jaboticabal

Examinadora: Prof^a Dr^a Luciana Paes de Barros Machado
UNICENTRO - Universidade Estadual do Centro-Oeste

Examinador: Prof. Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego
UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

São José do Rio Preto
28 de fevereiro de 2018

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de *Drosophila* do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e auxílio financeiro da FAPESP (2014/14059-0).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre se mostrar presente em minha trajetória. Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado, apoiando todas as minhas decisões; incentivando e acreditando em meus sonhos. As minhas irmãs e ao meu cunhado, que aguentaram meus momentos de empolgação e ansiedade. Ao meu namorado Luís Henrique, por todos os momentos de companheirismo e cumplicidade. À minha vó, pela atenção e conselhos; nas inúmeras ligações que realizei ao longo desses anos.

A minha orientadora Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi pela confiança; por acompanhar todas as etapas deste trabalho. Obrigado, professora, pela valorosa amizade; por todos os conselhos que vão além da vida acadêmica. Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus e a Prof. Dra. Luciana Paes de Barros Machado, pelo constante apoio e incentivo em toda minha jornada como graduanda e pós-graduanda. Agradeço pela co-orientação, pela colaboração e pelos ensinamentos.

Obrigado, professores, pela oportunidade e confiança que sempre depositaram em mim.

Tenho que agradecer à toda equipe que esteve envolvida para a realização das coletas. Começando pelos motoristas, Beto e Rodrigo, que davam cara a tapa e entravam juntos no mato, tornando nossas coletas mais divertidas. Aos mateiros, que conheciam como ninguém a mata, sempre auxiliando e ajudando nas trilhas, principalmente, nas mais complicadas. Ao Tião, nosso técnico de Meio de Cultura, um dos primeiros funcionários que tive contato na Unesp, pela recepção e atenção.

Ao pessoal do laboratório pela colaboração nas inúmeras tarefas das coletas, principalmente ao Gabriel e a Bruna Emília, pela ajuda imprescindível na identificação das espécies. Foi uma experiência muito gratificante poder acompanhar o progresso de cada um.

Sem a colaboração de todos vocês, além de mais árduo, o trabalho seria menos divertido.

Na parte molecular, agradeço a Larissa Venâncio, do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, pelo tempo doado nas primeiras etapas do estudo. Agradeço a Samara, pela ajuda inicial em me auxiliar

nas técnicas e em algumas análises moleculares, assim como minhas amigas do mestrado: Renata Giacomini e Claudia Gobatto, que mesmo distantes, também contribuíram com a análise e a discussão dos dados obtidos.

Agradeço pela oportunidade que tive em aprender e poder realizar a construção da biblioteca genômica, no curso de verão da Universidade Estadual de Campinas. O curso da Unicamp foi essencial para minha pesquisa molecular, além de me apresentar uma galera muito especial: Ana Marques, Fábio, Fernanda, Isabela e Rebecca.

Agradeço à Letícia Rego e a Nara Cristina, minhas primeiras amigas na cidade São José do Rio Preto, e a Márcia, por ser uma boa ouvinte. Agradeço novamente aos amigos do Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de *Drosophila*, pelos anos que passamos juntos. Bruna Emília, Emylin, Gabriel, Jéssica, Larissa, Leiza Penariol, Letícia Rego, Luis Fernando Segala e Samara, obrigada pelo companheirismo e ensinamentos.

Agradeço a todos os funcionários da Unesp/IBILCE. Todos, em suas devidas atribuições foram profissionais e gentis. Também agradeço a FAPESP por conceder auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP por tornar esse doutorado possível, por conceder auxílio financeiro e acreditar na importância da realização desse trabalho (PROCESSO FAPESP: 2014/14059-0).

A realização desta tese marca o final de uma importante etapa da minha vida. Todos os finais, possibilitam um novo início. Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma decisiva para a concretização desse doutorado.

“Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos.
Mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se
sintam grandes”

G.K. Chesterton

RESUMO

Drosophila sturtevanti é uma espécie neotropical com distribuição geográfica extensa que ocorre do México ao sul do Brasil e nas ilhas do Caribe. Na América do Sul é abundante e adaptada a diferentes fitofisionomias da Mata Atlântica. Estudos reprodutivos, cromossômicos, enzimáticos, moleculares e morfológicos indicam a existência de diferenciação entre suas populações. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o nível de diversidade genética e analisar a estrutura das populações de três regiões geográficas do Brasil em áreas da Mata Atlântica do Nordeste, Sudeste e Sul usando microssatélites espécie-específicos. No presente estudo, 126 machos de *D. sturtevanti* foram coletados em nove fragmentos da Mata Atlântica e analisados para 11 locos de microssatélites espécie-específicos. Um total de 109 alelos foram produzidos, variando de 2 a 16 alelos por loco, e a heterozigosidade média observada foi baixa (0,20 a 0,38). Houve uma diferenciação genética moderada ($F_{ST} = 0,08$) entre populações e alta deficiência heterozigótica. Não houve correlação entre distância genética e geográfica. Mais de 50% das populações apresentaram as frequências alélicas fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os marcadores microssatélites mostraram um polimorfismo considerável e riqueza alélica nas populações de *D. sturtevanti*, bem como uma estrutura populacional moderada que sugere evidência de fluxo gênico. A maior diferenciação da população de Ribeirão da Ilha, SC pode ser atribuída ao efeito de fundação e / ou ausência de fluxo gênico devido à sua posição geográfica isolada (uma ilha). Também foi detectada a presença de um gargalo genético na população de Guaribas, PB. No presente trabalho foi realizado também um estudo da biodiversidade de drosofilídeos em diferentes áreas de domínio da Mata Atlântica. Neste estudo, foi avaliada a composição faunística, abundância e riqueza das espécies de drosofilídeos de quatro remanescentes florestais do estado de São Paulo: Parque Estadual Serra da Cantareira (SDC), Parque Estadual Picinguaba (PIC), Matão (MAT) e Nova Granada (NGR). Para as coletas foram utilizadas 60 armadilhas fechadas distribuídas em seis transectos paralelos sentido borda-interior, contendo isca de banana e levedura. Todos os machos coletados e os machos F1 obtidos das isolinhagens de fêmeas crípticas foram identificados pela análise do

edeago. No total, 19.685 indivíduos foram coletados e 5.886 machos foram identificados. Ao todo, foram identificadas 49 espécies de drosofilídeos (incluindo *Zaprionus indianus* e *Scaptodrosophila latisfaciaerfomis*). As áreas estudadas não diferiram significativamente em relação à abundância das espécies coletadas, no entanto, elas diferiram em riqueza de espécies. Um total de 30 espécies foram identificadas em Serra da Cantareira; 26 em Picinguaba; 24 em Matão e 17 em Nova Granada. As áreas da Serra da Cantareira e Picinguaba apresentam a maior extensão e preservação e foram as áreas com a maior abundância (72%) de *D. willistoni*, uma espécie característica de mata bem preservada, e 21 espécies foram exclusivas dessas áreas. Em contraste, as áreas de Matão e Nova Granada foram caracterizadas pela maior abundância de espécies invasoras, as quais indicam um menor grau de preservação. Esses resultados corroboram o uso da abundância de drosofilídeos em estudos de monitoramento e preservação ambiental.

Palavras-chave: Diversidade Genética. Drosofilídeos. Fragmentação da Mata Atlântica. Marcador Molecular. SSRs.

ABSTRACT

Drosophila sturtevantii is a Neotropical species with extensive geographic distribution occurring from Mexico to the south of Brazil and the Caribbean islands. In South America it is abundant and adapted to different phytophysiognomies of the Atlantic Forest. Reproductive, chromosomal, enzymatic, molecular and morphological studies indicate the existence of differentiation among their populations. The objective of the present work was to evaluate the level of genetic diversity and to analyze the structure of the populations of three geographic regions of Brazil in areas of the Atlantic Forest of the Northeast, Southeast and South using species-specific microsatellites. In the present study, 126 males from *D. sturtevantii* were collected from nine fragments of the Atlantic Forest and analyzed for 11 species-specific microsatellite loci. A total of 109 alleles, ranging from 2 to 16 alleles per polymorphism locus, were produced, and the observed mean heterozygosity was low (0.20 to 0.38). There was a moderate genetic differentiation between populations ($F_{ST} = 0.08$) and high heterozygosity deficiency. Geographical distances did not contribute to genetic differentiation. More than 50% of the populations presented the allelic frequency out of Hardy-Weinberg equilibrium. Microsatellite markers showed a considerable and allelic richness in the populations of *D. sturtevantii*, as well as a moderate population structure indicating evidence of gene flow. The high differentiation of the population of Ribeirão da Ilha / SC, which can be attributed to the effect of foundation and / or absence of gene flow due to its isolated geographic position (an island), is also highlighted. It was also observed the presence of a genetic bottleneck in the population of Guaribas/PB that may be due to the occurrence of recent burning in this area. The present work was also a study of the biodiversity of drosophilídeos in different areas of dominion of the Atlantic Forest. In this study, was ecologically evaluating a faunal composition, abundance and richness of the drosophilidae species of four forest remnants of the São Paulo: Parque Estadual Serra da Cantareira, Parque Estadual Picinguaba, Matão and Nova Granada. The collections were carried out with 60 closed traps, containing banana bait and biological yeast, distributed in 6 parallel transects sense edge-interior. All collected males and the F1 males of the cryptic females were identified by the analysis of the

aedeagus. In total, 19.685 individuals were collected and 5.886 males were identified. In all, 46 species of drosophilids (including *Zaprionus indianus* and *Scaptodrosophila latisfaciaerfomis*) were identified. The studied areas did not differ significantly in relation to the abundance of the species collected, however, they differed in species richness. A total of 30 species were identified in Serra da Cantareira; 26 in Picinguaba; 24 in Matão and 17 in Nova Granada. The areas Serra da Cantareira and Picinguaba have greater extension and preservation corroborated by the high abundance (72%) of *D. willistoni* and 21 exclusive species were found in these areas. In contrast, the areas Matão and Nova Granada are characterized by the greater abundance of invasive species, indicating a lower degree of preservation. These results corroborate the use of the abundance of drosophilids in studies of monitoring and preservation environmental.

Keywords: *Drosophilids. Fragmentation Atlantic Forest. Genetic diversity. Marker molecular. SSRs*

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO

- Figura 1. Mapa dos remanescentes Florestais da Mata Atlântica 2015/2016 18
- Figura 2. Mapa dos diferentes tipos de vegetação do Brasil. 19

CAPÍTULO I

- Figure 1. PAGE 6% of microsatellite DNA loci amplified on *Drosophila sturtevantii*. 28

CAPÍTULO II

- Figura 1. Distância Euclidiana das espécies do grupo *saltans* baseada na transferibilidade de microssatélites de *D. sturtevantii*. 42

CAPÍTULO III

- Figure 1. Spatial structural analysis obtained using the GENELAND software. 58
- Figure 2. Bar graph of the estimated membership coefficient, Q, for each of the 126 individuals. The most likely value of K was by STRUCTURE was two. 59
- Figure 3. Neighbor-joining grouping among populations of *D. sturtevantii* using Nei's genetic distance(1978). 60
- Figure 4. Pairwise F_{ST} values. 61

CAPÍTULO IV

- Figura 1. Armadilha fechada para captura dos drosofilídeos. 74
- Figura 2. Desenho amostral dos transectos (A-F) em que as armadilhas para a captura dos drosofilídeos foram colocadas a cada 60m a partir da borda do fragmento. 75
- Figura 3. A-B. Número total de indivíduos de *D. sturtevantii*, espécie mais abundante, coletados na fazenda Cambuhy, Matão/SP, durante as estações quente e úmida, ao longo dos transectos. 84
- Figura 4. A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação Quente e úmida, na fazenda Cambuhy, Matão/SP. 85
- Figura 5. A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação fria e seca, na fazenda Cambuhy, Matão/SP. 86
- Figura 6. Número total de indivíduos por espécie mais abundantes coletados 93

na fazenda São João, Nova Granada/SP durante as estações quente e úmida e a estação fria e seca.	
Figura 7. Número total de indivíduos por espécie mais abundantes coletados na fazenda São João, Nova Granada/SP durante as estações quente e úmida (A) e a estação fria e seca (B).	94
Figura 8. A-B. Abundância relativa de <i>D. sturtevanti</i> coletada ao longo dos transectos (borda-interior), na fazenda São João, Nova Granada/SP.	95
Figura 9. A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação quente e úmida, na fazenda São João, Nova Granada/SP.	96
Figura 10. A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação fria e seca, na fazenda São João, Nova Granada/SP.	97
Figura 11. Porcentagem total de indivíduos machos por espécies mais abundantes coletados no Parque Estadual Serra do Mar/Picinguaba/SP durante a estação quente e úmida.	100
Figura 12. Porcentagem relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior) no Parque Estadual Serra do Mar/Picinguaba/SP.	101
Figura 13. Porcentagem total das espécies mais abundantes coletadas no Parque Estadual Serra da Cantareira/SP durante a estação quente e úmida.	106
Figura 14. Porcentagem relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior) no Parque Estadual da Serra da Cantareira/SP.	107
Anexo 1. Edeagos de alguns drosofilídeos coletados nas áreas de estudo.	114

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I

Table 1 Microsatellite loci described by Laborda et al. (2009) that have been tested in populations of <i>D. sturtevantii</i> . Highlighted in bold are the ones who have obtained amplification for <i>D. sturtevantii</i> .	27
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 Subgrupos, espécies, localização das amostras e número de indivíduos analisados.	39
Tabela 2 Teste de 16 iniciadores sintetizados para a espécie <i>D. sturtevantii</i> e testados para 15 indivíduos.	40
Tabela 3 Dados de amplificação de 13 microssatélites de <i>Drosophila sturtevantii</i> em 16 espécies de <i>Drosophila</i> do grupo <i>saltans</i> .	41

CAPÍTULO III

Table 1 Siglas, localidades amostradas e coordenadas geográficas, tamanho da área em hectare e número de indivíduos de <i>D. sturtevantii</i> analisados.	51
Table 2 Mean number of alleles per locus/all loci (allelic richness).	54
Table 3 Allele frequencies of eleven microsatellite loci in nine populations of <i>Drosophila sturtevantii</i> .	54
Table 4 Wright's F statistics of 11 microsatellites loci of nine <i>Drosophila sturtevantii</i> populations.	57
Table 5 Nei's (1978) genetic distances (below the diagonal) and similarities (above the diagonal) for nine <i>Drosophila sturtevantii</i> populations.	58
Table 6 Gene flow rate of <i>D. sturtevantii</i> populations.	59

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Siglas, localidades amostradas e coordenada geográfica, tamanho da área em hectare.	74
Tabela 02. Número total de machos por espécie e localidade.	77
Tabela 3. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do fragmento florestal de Matão, nas estações chuvosa e seca.	81
Tabela 4. Abundância dos grupos de drosofilídeos em armadilhas suspensas e de dossel, na mata Cambuhy, Matão/SP, em ambas estações climáticas.	82
Tabela 5. Análise do teste-G e sua significância (p) dos grupos de	83

drosofilídeos mais abundantes, nas armadilhas suspensas e armadilhas de dossel, no decorrer dos transectos (60m a 300m), da fazenda Cambuy, Matão/SP, nas estações quente e úmida e fria e seca.

Tabela 06. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do fragmento florestal de Nova Granada, nas estações chuvosa e seca. 90

Tabela 07. Abundancia dos grupos de drosofilídeos em armadilhas suspensas e armadilhas de dossel, da fazenda São João, Nova Granada/SP, nas estações quente e úmida e fria e seca. 91

Tabela 08. Análise do teste-G e sua significância (p) dos grupos de drosofilídeos mais abundantes, nas armadilhas suspensas e armadilhas de dossel, no decorrer dos transectos (60m a 300m), da fazenda São João, Nova Granada/SP, nas estações quente e úmida e fria e seca. 92

Tabela 9. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do Parque Estadual de Picinguaba/SP, nas armadilhas suspensa (S) e de dossel (D). 99

Tabela 10. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do Parque Estadual Serra da Cantareira, nas armadilhas suspensas (D) e de dossel (D). 104

Tabela 11. Espécies de *Drosophila* grupo amarelo, identificadas por meio de edeagos de machos F1 obtidos de isolinhagens das fêmeas amarelas coletadas no Parque Estadual Serra da Cantareira/SP. 105

Tabela 12. Valores dos índices ecológicos calculados para os quatros fragmentos florestais. 108

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Mata Atlântica	17
1.2 Família Drosophilidae	20
1.3 Drosofilídeos como modelo em estudos genéticos e ambientais	21
1.4 Microssatélites e seu uso em estudos populacionais	22
1.5 Genética de populações	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
CAPÍTULO I - Transferability of SRR primers developed for <i>D. mediopunctata</i> to the species <i>D. sturtevanti</i>	26
CAPÍTULO II - Desenvolvimento de microssatélites para <i>Drosophila sturtevanti</i> e a transferibilidade de 13 locos polimórficos para espécies do grupo <i>saltans</i> de <i>Drosophila</i> (Diptera: Drosophilidae)	30
CAPÍTULO III - Populational structure of <i>Drosophila sturtevanti</i> from Atlantic Forest biome using species-specific microsatellite loci	47
CAPÍTULO IV - Biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica, sua aplicação em estudos de monitoramento ambiental	70
3 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um bioma de floresta tropical que se estende na costa leste, sudeste e sul do Brasil, leste do Paraguai e a província de Misiones, região nordeste da Argentina (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Formada por um conjunto complexo de tipos florestais, é um dos biomas mais importantes do mundo devido a sua grande diversidade biológica e ao mesmo tempo o mais ameaçado (MITTERMEIER et al., 2004), sendo considerada uma área prioritária de conservação da sua biodiversidade (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2004). Sua vegetação inicial estendia-se por quase toda costa litorânea, tendo uma área de aproximadamente 1,3 milhões de Km² distribuída por 17 estados brasileiros, restando atualmente de 7 a 11% de sua área original (Figura 1). A diminuição da área foi decorrente da sua ocupação, desde o século XVI, pela expansão urbana e industrial (MMA, 2016), e também pela exploração de recursos florestais e a transformação das matas em áreas produtivas em grande escala (SALGUEIRO et al., 2004; TABARELLI et al., 2005).

Atualmente, os fragmentos de Mata Atlântica são formados por diferentes tamanhos e graus de conservação, a maior parte dos remanescentes florestais deste bioma encontra-se subdividido em pequenos fragmentos isolados com diferentes níveis de degradação, pouco estudados e protegidos (CARNAVAL; MORITZ, 2008). A fragmentação comprometeu seriamente a integridade deste bioma (SILVA; CASTELETTI, 2005), onde mais de 80% delas apresenta áreas menores que 50 hectares (RIBEIRO et al., 2009), devido a essa drástica perda de florestamento a Mata Atlântica é considerada um dos 25 *hotspots* mundiais para preservação (TABARELLI et al., 2005).

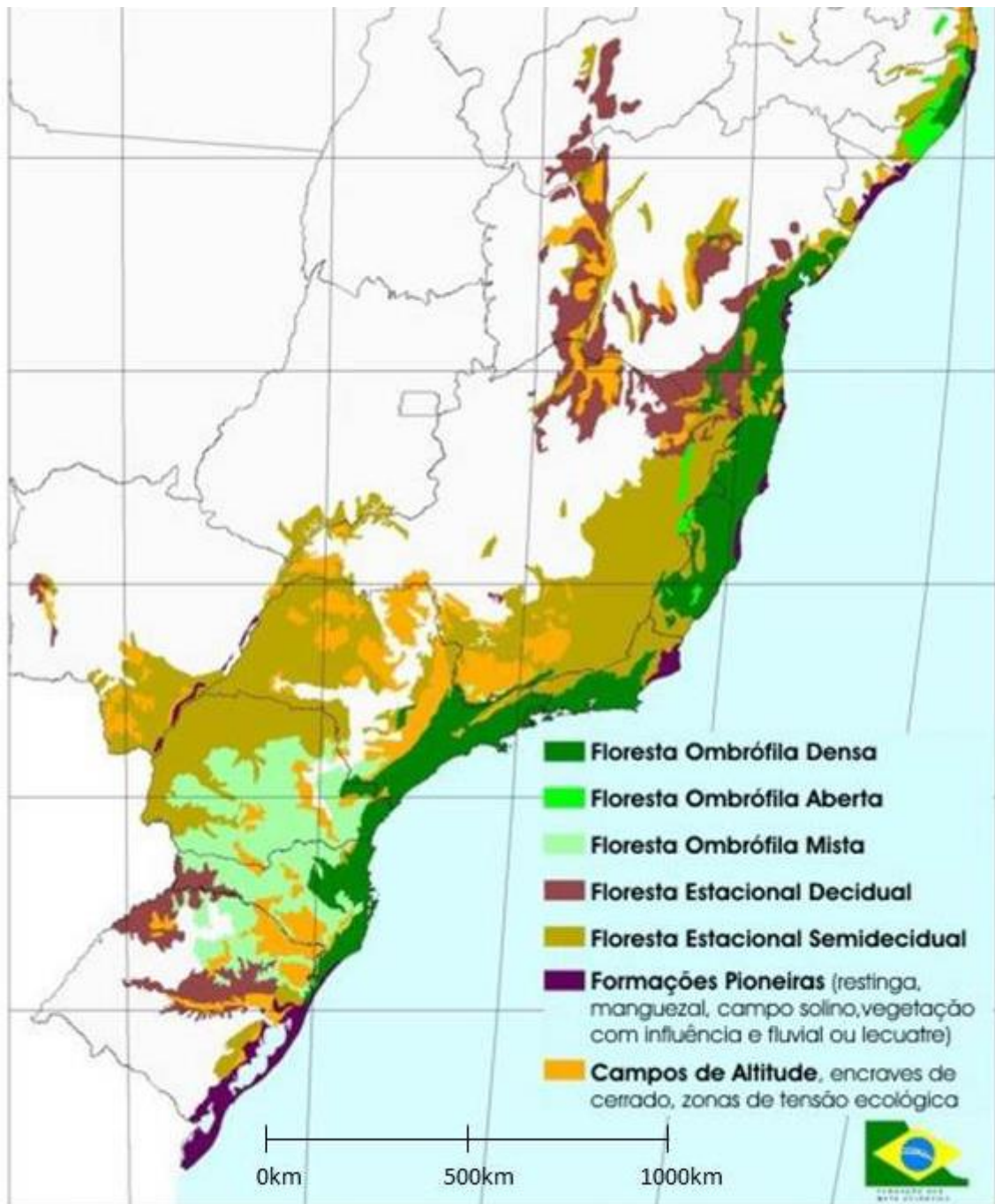
Este bioma é formado por um conjunto de formações florestais, destacando a Floresta Ombrófila Densa, a Floresta Estacional (Semidecidual e Decidual) e a Floresta Ombrófila Mista (Figura 2). Esses três tipos de vegetações possuem clima bem característico: a primeira possui um clima quente e úmido, a segunda possui verões quentes e úmidos com invernos frios e secos e a última possui um clima úmido e frio (MARQUES, 2016). Mesmo reduzida e muito fragmentada, essa diversidade ambiental contribuiu para alta diversidade biológica e elevado

endemismo, contendo entre 1% a 8% de toda a flora e fauna mundial, sendo uma floresta com o maior número de espécies endêmicas (MYERS et al., 2000).

Figura 1. Mapa dos remanescentes Florestais da Mata Atlântica 2015/2016. A área em amarelo representa a cobertura original da Mata Atlântica e em verde o remanescente florestal. Fonte: Atlas dos remanescentes florestais de Mata Atlântica, FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2017.



Figura 2. Mapa dos diferentes tipos de vegetação do Brasil. A área em verde escuro representa a floresta ombrófila densa, verde claro representa a floresta ombrófila aberta, verde claro região sul representa floresta ombrófila mista, em roxo claro representa a floresta estacional decidual, em ocre representa a floresta estacional semidecidual, em roxo escuro representa as formações pioneiras e em laranja representa os campos de altitude. Fonte: Digitalização do mapa de vegetação do Brasil. FIBGE, 1993. Instituto Socioambiental/ FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA.



1.2 Família Drosophilidae

A família Drosophilidae (Diptera, Brachycera) é composta atualmente por cerca de 4.200 espécies (BACHLI, 2018), distribuída ao longo de mais de 60 gêneros, desses, 16 gêneros representam a família de Drosophilidae no Brasil (TIDON et al., 2015). Cerca da metade do número total de espécies descritas pertencem ao gênero *Drosophila*, que tem ampla distribuição (WHEELER, 1982). Algumas espécies são endêmicas, enquanto outras são cosmopolitas, sendo que, muitas destas dispersaram-se pelo mundo devido à sua capacidade de associação ao homem (TIDON-SKLORZ; SENE, 1999).

O gênero *Drosophila* contém 15 subgêneros que compõem o gênero *Drosophila*, sendo estes: *Antopocerus* (15 espécies), *Chusqueophila* (1 espécie), *Dichaetophora* (7 espécies), *Dorsilopa* (1 espécie), *Drosophila* (759 espécies), *Dudaica* (1 espécie), *Engiscaptomyza* (6 espécies), *Hirtodrosophila* (112 espécies), *Lordiphosa* (13 espécies), *Phloridosa* (7 espécies), *Psilodorha* (2 espécies), *Scaptodrosophila* (184 espécies), *Siphlodora* (2 espécies), *Sophophora* (233 espécies) e *Spinodrosophila* (1 espécie) (POWELL, 1997), Dentre os quais podemos distinguir os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* devido sua abundância e diversidade, cuja sistemática permanece controversa e incompleta devido suas constantes mudanças, tanto por agrupamento por morfometria (YASSIN, 2013) quanto pela inclusão de novas espécies descritas, principalmente na região neotropical (GOTTSCHALK et al., 2012; ACURIO et al., 2013; POPPE et al., 2014; GEISLER et al., 2015; GUILLÍN; RAFAEL 2015; JUNGES et al., 2016).

O maior grupo de Drosophilidae habitando a região Neotropical é o subgênero *Drosophila*, no qual incluem-se pelo menos 25 grupos de espécies (VAL et al., 1981; TIDON et al., 2015; SANTA-BRÍGIDA et al., 2017). O subgênero *Sophophora* (STURTEVANT, 1939), por outro lado, compreende apenas 7 grupos, destacando-se os grupos com maior diversidade de espécies, sendo: *melanogaster*, *obscura*, *willistoni* e *saltans*. O grupo *saltans* é formado por 21 espécies até então descritas, divididas em 5 subgrupos: *cordata*, *elliptica*, *sturtevanti*, *parasaltans* e *saltans*. A origem do grupo são os trópicos da América do Norte (THROCKMORTON, 1975), de forma que esse grupo e o grupo *willistoni* representam a radiação do subgênero *Sophophora* no Novo mundo.

1.3 Drosofilídeos como modelo em estudos genéticos e ambientais

A diminuição da diversidade biológica é considerada um problema ecológico atual devido à perda de cobertura vegetal natural por campos de pastagem, instalações urbanas e outros fatores antrópicos, resultando em pequenos fragmentos florestais isolados uns dos outros (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Além da perda da biodiversidade, a limitação do fluxo gênico e a diminuição do tamanho populacional são resultados do processo de fragmentação de habitats, que podem levar à endogamia e a perda de variabilidade genética, restringindo a capacidade da população de responder a novas condições ambientais (CASWELL, 2001; EALES et al., 2008; LEGRAND et al., 2011). Este tipo de estudo tem sido realizado com espécies da família Drosophilidae, principalmente porque estes insetos possuem alta sensibilidade às alterações climáticas e ecológicas e diferentes espécies respondem distintamente à estas alterações ambientais. Algumas são mais sensíveis às alterações climáticas (por exemplo, *D. willistoni*) e as espécies invasoras (como por exemplo: *D. simulans*, *D. malerkotliana*, *Zaprionus indianus* e outras) são espécies com alta capacidade de suportar ambientes alterados e com grande nível de estresse (FERREIRA; TIDON, 2005; MATEUS et al., 2006, TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013; PENARIOL et al., 2018 em preparação).

Estudos sobre a utilização de algumas espécies de drosofilídeos como bioindicadoras têm avançado nos últimos anos como uma proposta de inclusão em metodologias práticas e de baixo custo de monitoramento ambiental (PARSON, 1991; AVONDET et al., 2003; FERREIRA; TIDON, 2005; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; MATA et al., 2008; ACURIO et al., 2010; BIZZO et al., 2010; PENARIOL et al., 2008; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013; TIDON et al., 2015; SANTA-BRÍGIDA et al., 2017, PENARIOL et al., 2018 em preparação). A sensibilidade do gênero *Drosophila* em relação às variáveis abióticas e bióticas se reflete na dinâmica populacional desses organismos. Além disso, a característica cosmopolita do grupo e a facilidade de coletar esses organismos no ambiente natural torna-o um excelente material para estudos ambientais (PARSON, 1991; FOOTE; CARSON, 2004; TIDON et al., 2015; SANTA-BRIGIDA et al., 2017, PENARIOL et al., 2018, em preparação).

Alguns parâmetros da comunidade de drosofilídeos como a riqueza de espécies e a abundância populacional, têm sido utilizados com sucesso na avaliação

de diferentes situações ambientais como avaliação de fragmentos com tamanhos diferentes (TIDON, 2006; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013, PENARIOL et al., 2018 em preparação), fragmentos em diferentes estados de conservação (SILVA et al., 2005; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006, PENARIOL et al, 2008; HOCHMÜLLER et al., 2010, CAVASINI et al., 2015, PENARIOL et al., 2018 em preparação), efeitos de borda (PENARIOL et al., 2008; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013, PENARIOL et al., 2018 em preparação) e proximidade do fragmento de um recurso hídrico (MEDEIROS, 2006; MATEUS et al., 2007).

1.4 Microssatélites e seu uso em estudos populacionais

O desenvolvimento da biologia molecular nas últimas décadas possibilitou a mensuração da variabilidade genética em populações naturais diretamente do DNA dos organismos, o que, associado a outras informações, constitui uma importante ferramenta para a elucidação dos processos e mecanismos evolutivos geradores da diversidade biológica. Dentre estas ferramentas, os microssatélites, descritos em 1987 (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989; TAUTZ, 1989) vem sendo amplamente utilizados, principalmente devido a sua versatilidade de aplicação e resolução para diferentes questões biológicas, tais como, a avaliação do nível de diferenciação entre organismos, a genética e estruturação de populações, detecção de eventos ecológicos e evolutivos em populações naturais, correlação de comportamento de acasalamento com isolamento reprodutivo, estimativas de níveis de fluxo gênico, dispersão de sementes, entre outros (HUTCHISON; TEMPLETON, 1999; CHAMBERS; MACAVOY, 2000; ACHMANN et al., 2004; FRANCK et al., 2004; GEE, 2004; PATTEN et al., 2004; DIERINGER et al., 2005; STREIFF et al., 2005; SELKOE; TOONEN, 2006; KIMBERLY et al., 2006; MOGES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Diversos trabalhos recentes utilizam marcadores de microssatélite para estudo de diversidade genética e estrutura populacional, não apenas em drosofilídeos, mas também em mamíferos (SANCHEZ et al., 2012; SILVA-CABALLERO et al., 2017) plantas (BAJAY et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016), invertebrados (POULAKAKIS et al., 2008, FRAIMOUT et al., 2015) e fungos (MOGES et al., 2016). A razão para essa versatilidade de estudos está nas propriedades dos microssatélites que são marcadores codominantes, altamente polimórficos e distribuídos amplamente pelo

genoma eucarioto, preferencialmente nas regiões intergênicas, podendo, deste modo, ser considerado seletivamente neutro e também possui alta reprodutibilidade.

1.5 Genética de populações

A genética de populações busca compreender princípios genéticos e o estudo de forças evolutivas que resultem em mudanças nas espécies ao longo do tempo, com aplicação a populações inteiras de organismos, sendo esses, seres humanos, animais, plantas ou outro organismo. A variabilidade genética nas populações passou a ser mais estudada no final do século XIX, esse conhecimento tornou-se essencial em genética, genômica, biologia evolutiva, sistemática, história natural, conservação, entre outros (HARTL; CLARK, 2010).

A variabilidade genética tem sido definida como a riqueza de espécies dentro de um ecossistema e também como o nível de diversidade genética existente dentro de cada população (NEI, 1973). Sendo quantificada pelo número de alelos por locos, locos polimórficos, frequência alélica, heterozigosidade observada e esperada, equilíbrio de Hardy-Weinberg, estas estimativas permitem avaliar o padrão de diversidade e estrutura genética (NEI, 1978; MILLER, 1997, PIRY et al., 1999; PRITCHARD et al., 2000; LEWIS; ZAYKIN, 2001; KOPELMAN et al., 2015).

Alguns fatores evolutivos podem atuar sobre a estrutura populacional como a mutação, migração, seleção natural, deriva genética, endogamia e fluxo gênico, que operam dentro de um contexto histórico e biológico de cada espécie. Esses fatores podem levar a divergência genética das populações e assim uma determinada variante pode estar presente em uma população de uma determinada espécie, mas não em outra população desta mesma espécie (RIDLEY, 2006). De importância primária para a formação da estrutura é a seleção e o fluxo gênico, em geral, espécies com intenso fluxo gênico têm menor diferenciação genética (HAMRICK, 1986).

Mas fatores ecológicos também podem influenciar a estrutura genética das populações. Podendo ser demográfica ou temporal: a estrutura demográfica refere-se à distribuição espacial dos indivíduos, determinada principalmente pelo sistema de reprodução e o tamanho e densidade da população (BROWNS, 1978), já a estrutura genética temporal refere-se a subdivisão da diversidade genética entre gerações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Portanto, a compreensão de como a variação genética encontrada em populações naturais está distribuída e quais são as características do ambiente ou da espécie que estão influenciando esta distribuição é fundamental para compreensão da história evolutiva das espécies.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar a estrutura populacional e diversidade genética de *Drosophila sturtevanti* de diferentes domínios de Mata Atlântica.

Fazer um levantamento da biodiversidade de drosofilídeos em fragmentos remanescentes da Mata Atlântica em diferentes regiões geográficas do Brasil.

2.2 Específicos

2.2.1 Molecular

Testar a transferibilidade de iniciadores de microsátélites desenvolvidos para a espécie *D. mediopunctata* em populações de *D. sturtevanti*;

Desenvolver iniciadores SSR específicos para a espécie *D. sturtevanti*;

Testar a transferibilidade de iniciadores desenvolvidos para *D. sturtevanti* nas espécies do grupo *saltans*;

Avaliar a diversidade genética das populações de *Drosophila sturtevanti* e a relação com seu habitat.

2.2.2 Biodiversidade

Realizar um levantamento faunístico da biodiversidade de drosofilídeos em quatro fragmentos da Mata Atlântica de diferentes regiões geográficas;

Avaliar a biodiversidade dos diferentes fragmentos florestais por meio de índices ecológicos;

Avaliar a associação da abundância das espécies bioindicadoras com a fragmentação do habitat.

**Transferability of SRR primers developed for *D. mediopunctata* to the species
*D. sturtevanti***

CAPÍTULO I

Transferability of SRR primers developed for *D. mediopunctata* to the species *D. sturtevantii*

Trava, B.M., Machado, L.P.B., Mateus, R.P., Madi-Ravazzi, L.*, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto/São Paulo, Brazil; *E-mail: lilian@ibilce.unesp.br.

Drosophila sturtevantii (Duda, 1927) belongs to the *sturtevantii* subgroup of the *saltans* group (Magalhães, 1962). It presents a wide geographic distribution, occurring from Mexico to southern Brazil, including the Caribbean islands (Magalhães, 1962). Due to the high cost of developing microsatellite markers (SSR) for each species, the transferability of SSR primers between related species have been tested and used in population and evolutionary studies (White and Powell, 1997; Roa *et al.*, 2000; Zucchi *et al.*, 2002). The aim of this work was to analyze the transferability of SSR primers, originally described for *D. mediopunctata* to *D. sturtevantii* (Laborda *et al.*, 2009a). Twenty primers that were successfully amplified using a sample composed of a pool of individuals from an isofemale line of *D. sturtevantii*, were selected (Table1).

Table 1. Microsatellite loci described by Laborda *et al.* (2009) that have been tested in populations of *D. sturtevantii*. Highlighted in bold are the ones who have obtained amplification for *D. sturtevantii*.

Locus	Genbank accession	Size (bp)	Locus	Genbank accession	Size (bp)
Dmed ^{UNICAMP} _033	GQ344866	245	Dmed ^{UNICAMP} _096	GQ344919	152
Dmed ^{UNICAMP} _034	GQ344867	115	Dmed ^{UNICAMP} _099	GQ344922	299
Dmed ^{UNICAMP} _039	GQ344872	182	Dmed ^{UNICAMP} _102	GQ344925	197
Dmed ^{UNICAMP} _041	GQ344873	286	Dmed ^{UNICAMP} _107	GQ344930	179
Dmed ^{UNICAMP} _053	GQ344883	122	Dmed^{UNICAMP}_115	GQ344938	207
Dmed ^{UNICAMP} _054	GQ344884	214	Dmed^{UNICAMP}_118	GQ344941	136
Dmed ^{UNICAMP} _056	GQ344886	142	Dmed ^{UNICAMP} _121	GQ344943	144
Dmed ^{UNICAMP} _057	GQ344887	137	Dmed ^{UNICAMP} _124	GQ344946	156
Dmed ^{UNICAMP} _065	GQ344892	198	Dmed ^{UNICAMP} _126	GQ344947	291
Dmed ^{UNICAMP} _095	GQ344918	147	Dmed ^{UNICAMP} _133	GQ344951	245

The amplifications were performed under the same conditions and reagent concentrations reported in the literature (Laborda, et al, 2009b), using individuals of *D. sturtevantii* from Matão/São Paulo/Brazil (21°37'14"S; 21°37'14"W), Nova Granada/ São Paulo/Brazil (20°32'37"S; 49°14'47"W) and João Pessoa/Pernambuco/Brazil (7°3'49"S; 34°51'25"W). Only two loci amplified in 15 individuals out of 45 tested (Figure 1), even after applying protocol modifications to increase the transferability success.

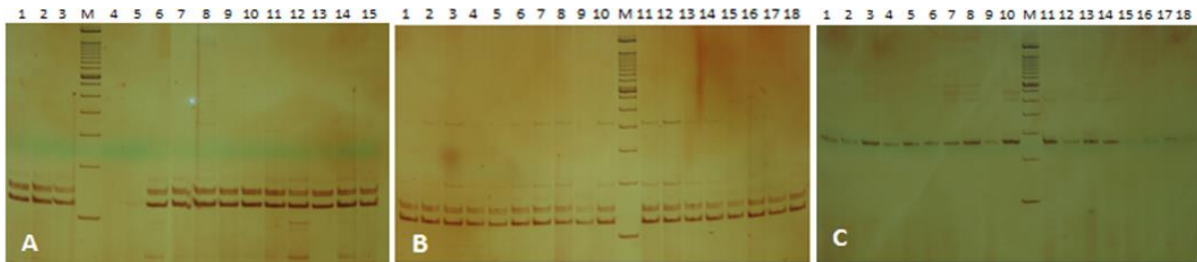


Figure 1. PAGE 6% of microsatellite DNA loci amplified on *Drosophila sturtevantii*. M: Molecular weight marker of 100/100 bp; A. Locus SSR118 – Matão/SP; B. Locus SSR118 – Pernambuco/PB; C. Locus SSR115 – Pernambuco/PB.

The optimal annealing temperatures for these two loci were tested. However, no pattern was obtained. Despite the original amplification of the 20 loci using a pool sample of one isofemale line of *D. sturtevantii*, our work showed that their transferability in individual samples of natural populations is rather difficult. *Drosophila mediopunctata* and *D. sturtevantii* belong to different subgenera, being therefore phylogenetically distant. Thus, throughout both species evolutionary processes, mutations could have become fixed in the flank region of the SSR loci, resulting in null alleles, which could be responsible for the low transferability (only 10%). Previous work using some of these loci described for *D. mediopunctata* in other two species of *Drosophila*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, which are more closely related to *D. mediopunctata* than *D. sturtevantii*, also showed that as more distant the species is, the less successful is the transferability. *Drosophila maculifrons* is more closely related to *D. mediopunctata* than *D. ornatifrons*, and the rates of transferability were 50% and 28%, respectively (Tractz *et al.*, 2012). Therefore, the tested markers were not suitable for genetic variability analyses of *D.*

sturtevanti natural populations, requiring more tests with other primers or the use of strategies for obtaining and synthesizing specific primers for this species.

Keywords: *saltans* group, molecular markers, genetic variability, microsatellite DNA, transferability.

Financial support: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) 2014/14059-0; Bolsista CAPES

References: Laborda, P. R., G.M. Mori and A. P. de Souza 2009a, Conservation Genet Resour 1:297-307; Laborda, P. R., L.B. Klaczko and A. P. de Souza 2009b, Conservation Genet Resour 1:281-296; Magalhães, L.E. 1962, University of Texas Publication 6205:135-154; Roa, A.C., P. Chavarriaga-Aguirre, M.C. Duque, M.M. Maya, M.W. Bonierbale, C. Iglesias and J. Tohme 2000, American Journal of Botany 87:1647-1655; White, G. and W. Powell 1997, Molecular Ecology 6:851-860; Zucchi, M.I., R.V. Brondani, J.B. Pinheiro, C. Brondani and R. Vencovsky 2002, Molecular Ecology 2:512-514.

Desenvolvimento de microssatélites para *Drosophila sturtevanti* e a transferibilidade de 13 locos polimórficos para espécies do grupo *saltans* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)

CAPÍTULO II

Nas normas da revista Genetics and Molecular Biology (SBG)

Desenvolvimento de microssatélites para *Drosophila sturtevantii* e a transferibilidade de 13 locos polimórficos para espécies do grupo *saltans* de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)

Bruna Memari Trava¹, Bruna Emília Roman¹, Lilian Madi-Ravazzi¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Resumo: Os marcadores microssatélites ou sequências de repetições simples (SSRs) são altamente polimórficos, possuem evolução rápida e são considerados marcadores neutros, devido a estas características, os mesmos têm sido usados extensivamente em estudos populacionais. O desenvolvimento de SSRs específicos para uma determinada espécie abre possibilidades para a aplicação, por meio da transferibilidade, em estudos populacionais de outras espécies próximas filogeneticamente, otimizando tempo e custo. Neste trabalho é descrito pela primeira vez 16 locos que foram desenvolvidos para a espécie *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*, grupo *saltans*) e testado sua transferibilidade para 15 espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*. Dos 16 iniciadores construídos por meio de uma biblioteca genômica, 13 amplificaram e 11 foram polimórficos. As condições adequadas de amplificação foram estabelecidas utilizando quinze indivíduos machos de *D. sturtevantii*. A porcentagem total de transferência foi de 54,87%. As espécies com maior sucesso de amplificação heteróloga foram incluídas no subgrupo *sturtevantii* (*D. sturtevantii*, *D. dacunhai*, *D. milleri* e a linhagem *D.sturt-like*). Dos 13 marcadores microssatélites utilizados, dois amplificaram em todas as espécies e um não amplificou em nenhuma espécie do grupo *saltans*. Os dados corroboram o uso da técnica da transferibilidade destes oligonucleotídeos que poderão ser usados em estudos de diversidade genética e estrutura populacional de *D. sturtevantii* e de outras espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*.

Palavras-chave: marcadores moleculares, biblioteca genômica, SSR, diversidade gen

INTRODUÇÃO

D. sturtevanti pertence ao grupo *saltans* de *Drosophila* (família Drosophilidae, subgênero *Sophophora*) e apresenta ampla distribuição geográfica dentro do subgrupo *sturtevanti* e mesmo dentro do grupo *saltans*. Está presente em quase toda a área de distribuição do grupo, do México ao sul do Brasil e nas ilhas Caribenhas (Magalhães, 1962). É uma espécie generalista e comum em fragmentos de mata e com alta abundância populacional em diferentes épocas do ano, apresentando características adequadas para ser utilizada como um organismo modelo em estudos populacionais. O grupo *saltans* é constituído por 21 espécies, sendo subdividido em cinco subgrupos, de acordo com os caracteres morfológicos, principalmente da terminália masculina, são eles: *cordata* (duas espécies), *elliptica* (quatro espécies), *parasaltans* (duas espécies), *sturtevanti* (seis espécies) e *saltans* (sete espécies) (Sturtevanti, 1942; Magalhães e Björnberg, 1957; Magalhães, 1962; Mourão e Bicudo, 1967).

Este grupo já foi estudado quanto à diferentes aspectos: morfológicos (Magalhães, 1962; Mourão e Bicudo, 1967; Souza et al., 2014), padrões de esterases (Nascimento e Bicudo, 2002; Bernardo e Bicudo, 2009), polimorfismos de inversão (Kobayashi e Bicudo, 1997), reprodutivos (Dobzhansky, 1944; Bicudo, 1979; Kobayashi e Bicudo, 1994) elementos transponíveis (Clark et al., 1995; Clark e Kidwell, 1997; Silva e Kidwell, 2000, 2004; Castro e Carareto, 2004; De Setta et al., 2007), sequências de genes nucleares e mitocondriais (Tarrío et al., 1998; O'Grady et al., 1998; Rodriguez-Trelles et al., 1999) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Freschi et al., 2002).

Os microssatélites, conhecidos também como polimorfismos SSR (Sequência de Repetição Simples), são sequências curtas (1 a 6 pb) e repetidas de DNA, em que os nucleotídeos estão arranjados em *tandem* (Tautz, 1989; Edwards et al., 1991). Esses marcadores são locos específicos, altamente versáteis, relativamente abundantes, codominantes e exibem altos níveis de polimorfismos (Tautz, 1989; Weber, 1990; Weising et al., 1995; Powell et al., 1996; Toth et al., 2000; Katti et al., 2001; Morgante et al., 2002).

Estes marcadores têm sido amplamente utilizados em estudos genéticos (Akkaya et al., 1992). Os altos níveis de polimorfismos observados nos microssatélites e a relativa facilidade da detecção por PCR associada à uma análise

estatística robusta e eficiente tem favorecido o seu uso em muitas áreas biológicas tais como: biologia forense, mapeamento genético, teste de paternidade, genética de populações e da conservação (Jarne e Lagoda, 1996; Schuler et al., 1996; Knapik, et al., 1998; Luikart et al., 2003).

O desenvolvimento de novos marcadores SSR é um processo elaborado que demanda alto custo e tempo, assim o método de transferibilidade de marcadores SSR é vantajoso, pois otimiza tempo e viabiliza o custo (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Fantin, 2007). A transferibilidade pode ocorrer devido a conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, possibilitando a realização de transferências dos locos entre espécies do mesmo gênero ou até mesmo de gêneros diferentes, sendo possível o uso de iniciadores heterólogos (Fantin, 2007; Kalia et al., 2011). Dessa forma, os pares de iniciadores desenhados com base nas sequências obtidas de uma espécie específica podem ser utilizados para detectar SSRs em espécies relacionadas, esse método de transferibilidade foi demonstrada com sucesso em algumas espécies (Ellis e Burke, 2007; Varshney et al., 2007; Laborda et al., 2009; Tractz et al., 2012; Oliveira et al., 2016).

Muitos pesquisadores têm utilizado a técnica de transferibilidade de iniciadores para espécies filogeneticamente próximas, buscando sequências de nucleotídeos de espécies próximas em banco de dados como no GenBank (EUA), DDBJ (Japão) e EMBL-bank (Reino Unido) (Morgante e Olivieri, 1993; Stoesser et al., 2002; Kalia et al., 2011). Entretanto, a transferibilidade nem sempre é positiva. Como por exemplo, iniciadores desenhados para *D. mediopunctata* foram testados em populações de *D. sturtevantii* e não foram eficientes nos seus resultados, provavelmente por serem espécies filogeneticamente distantes (Trava et al., 2016).

O presente trabalho teve por objetivo desenhar, validar e otimizar pares de iniciadores microssatélites SSR para populações de *D. sturtevantii* e avaliar a transferibilidade destes oligonucleotídeos em 15 espécies do grupo *saltans* visando sua aplicabilidade em estudos populacionais deste grupo de espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Biblioteca Genômica de *D. sturtevantii***

A extração do DNA genômico de machos da espécie *Drosophila sturtevantii* (provenientes da região de Matão, SP) foi realizada por meio da maceração individual das amostras seguindo o protocolo *Salting out DNA extraction* (Sunnucks et al., 1996; Aljanabi e Martinez, 1997). Foi realizada a maceração individual de cada amostra em microtubos contendo 10µL de proteinase-K (20mg/mL) e 100 µL de TEN (NaCl 0,4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 2 mM, pH 8,0, mais 2% de SDS). Durante 3 horas permaneceu em banho-maria a 55 °C, em seguida, foi adicionado 5µL de RNase (10 mg/ml) mantido por 15 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 35µl de NaCl 5M às amostras, agitado no vortex por 5 segundos e centrifugado durante 5 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e acrescentado 1 ml de etanol 100% gelado, os microtubos foram invertidos suavemente para a precipitação do DNA. Em seguida, foi colocado no gelo por 5 minutos e centrifugado a 4°C por 15 minutos. O excesso de etanol foi descartado e adicionado 500µL de etanol 70%, foi centrifugado novamente a 4°C por 15 minutos, descartando o etanol em excesso e deixando os microtubos secarem na estufa a 40° C, entre 20 a 30 minutos, para evaporar o restante do etanol. Após os microtubos estarem totalmente secos foi acrescentado 50µL de água MilliQ, e foi ressuscitado deixado *overnight* e armazenados a 4°C. Destas amostras foi selecionada uma que continha uma concentração adequada de DNA para análise (70ng/uL).

A construção da biblioteca genômica de *D. sturtevantii* foi realizada de acordo com Billotte et al. (1999). A amostra de DNA foi digerida utilizando endonuclease *Afa I* (*Invitrogen*) e ligada à dupla cadeia de adaptadores *Afa I* (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') e (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'). Sondas biotinizadas e esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (partículas paramagnéticas da *Promega*) foram utilizadas para encontrar fragmentos tipo (GT)8 e (CT)8. Os fragmentos de DNA capturados, foram amplificados por PCR e clonados pelo vetor pGEM-T Easy (*Promega*). A bactéria *Escherichia coli* XL1-Blue (*Agilent Technologies*) foi transformada com plasmídeos recombinantes por meio do método de electroporação e cultivadas em ágar contendo em sua composição ampicilina, X-

galactosidase 2% e IPTG. Os clones positivos foram selecionados aleatoriamente e sequenciados no analisador ABI 3500xL automatizado (*Applied Biosystems*) utilizando os iniciadores T7 e SP6 e uma versão *Big Dye Terminator 3.1* com *kit* de sequenciamento (*Applied Biosystems*).

A identificação das regiões genômicas contendo os microssatélites e os desenhos dos pares de iniciadores que flanqueiam essas regiões foram realizados utilizando os seguintes aplicativos: para a remoção dos adaptadores utilizamos o *software Chromas*, depois removemos as regiões de baixa qualidade pelo *software Chromatogram Explorer* e alinhamos as sequências para criar a consenso no *software BioEdit*. Após obtermos a sequência editada, utilizamos o programa *VecScreen* para verificarmos se houve resquícios do vetor. Para esta análise foram obtidas 16 sequências que possuía região com repetição de microssatélite. Utilizamos o *software Primer3Plus* (Untergasser et al., 2007) para obtermos os iniciadores específicos destas sequências com os seguintes critérios: iniciador com tamanho de 22 pb; temperatura de fusão (T_m) entre 50 e 60°C; comprimento do produto amplificado entre 100 a 500 pb; teor de GC entre 50 a 60%. Após a obtenção das sequências dos iniciadores estes foram sintetizados na Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany, GER).

A amplificação dos iniciadores foi testada em quinze indivíduos machos de *D. sturtevantii* de Matão, SP. A reação em cadeia polimerase (PCRs) consistiu em um volume total de 25µL: 0,1 uL de Taq DNA polimerase (1u), 2,5 µL de tampão 10xbuffer, 2,5 µL de dNTP, 2,5 µL de cada iniciador, 0,75 µL de MgCL₂ 50mM, 1 µL de DNA e 13,15 µL de água ultrapura. Para todos os iniciadores fizemos a PCR em *touchdown*, ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos; 2 vezes 10 ciclos de 94° C por 1 minuto, 65°C (-1°C por ciclo) por 1 minuto e, 72° C por 2 minutos; e um final de 18 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 55°C por 1 minutos e 72°C por 5 minutos. Posteriormente, se necessário os iniciadores que amplificaram foram padronizados quanto à melhor temperatura de anelamento (T_a) variando entre 50 a 65°C, nas condições de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94° por 1 minuto, T_a por 1 minutos e 72°C por 2 minutos; e 72° por 5 minutos. Os produtos de amplificação da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata 15% (Sanguinetti et al., 1994, com modificações).

- **Teste de transferibilidade**

O DNA genômico de três indivíduos machos de cada uma das 16 espécies do grupo *saltans* (Tabela 1) foi extraído por maceração individual das amostras, resfriadas em solução de Lise (Promega) e EDTA (0,5M, pH 8,0). Após a incubação da reação com Proteinase K (20 mg/mL) em banho-maria a 65°C durante duas horas, foi acrescentada a solução de precipitação de proteína (Promega), e mantida no gelo por alguns minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação (14.000 rpm) por 4 minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo microtubo e foram acrescentados 200µL de isopropanol, sendo submetido novamente a centrifugação (14.000 rpm) e descartando o sobrenadante. Consecutivamente, foram realizados alguns ciclos de centrifugação (14.000 rpm) e o etanol foi descartado para obtenção da amostra pura (*pellet*) de DNA. Os tubos contendo o *pellet* de DNA foram colocados na estufa a 40°C, entre 20 a 30 minutos, para evaporar o restante do etanol. Ao final, o DNA foi ressuscitado em 100µL de água ultrapura e armazenado a 4°C. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume total de 25 µL contendo 0,5 U de Taq DNA polimerase (Promega), 2,5 µL de tampão 10x buffer, 0,2 mM de dNTP, 0,2 pmol de cada primer, 1,5 mM de MgCL₂ e 3 ng de DNA. As condições de amplificação da PCR foram definidas por um ciclo de desnaturação TOUCHDOWN a 94°C por 2 minutos; 10 ciclos de 94° C por 1 minuto, 65°C (onde a cada ciclo diminui 1°C) por 1 minuto e, 72° C por 2 minutos; 18 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; finalizando em 72° C por 5 minutos. Os produtos de amplificação da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 15% (Sanguinetti et al., 1994, com modificações).

- **Análise de Distância Euclidiana**

A análise de distância euclidiana foi realizada com base na amplificação dos microssatélites, observado nos géis. A partir daí uma matriz foi construída da seguinte maneira: 1 = condições boas de amplificação no comprimento esperado, 2 = presença de amplificação, mas necessitando alteração de reagentes e temperatura de anelamento e 3 = ausência de amplificação. O programa Statistica 7.0 (Statsoft, 2004) foi utilizado para esta análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 16 sequências testadas em *D. sturtevantii*, três delas não amplificaram (Dsturt_F, Dsturt_H e Dsturt_P). Os iniciadores Dsturt_B, Dsturt_C, Dsturt_D, Dsturt_I, Dsturt_K, Dsturt_M e Dsturt_P tiveram boa amplificação em *Touchdown*, e para os demais foram padronizadas a melhor temperatura de anelamento (Tabela 2). Os 13 microssatélites que tiveram sucesso na amplificação foram utilizados em um estudo de estrutura populacional de *D. sturtevantii* provenientes de nove localidades geográficas do Brasil e todos eles foram polimórficos (Trava, BM; Machado, LPB; Mateus, RP; Madi-Ravazzi, L; 2018 dados do capítulo III) e foram testados também para outras espécies do grupo *saltans*.

A amplificação heteróloga resultou em uma taxa total de 54,87% de transferências positivas, na qual 81,31% do total não precisaram de otimização. As espécies que obtiveram maior sucesso de amplificação heteróloga foram as do subgrupo *sturtevantii* com 84,61% de transferibilidade. Para a espécie *D. dacunhai*, houveram 12 ampliações positivas (92,31%), para *D. milleri*, foram 11 (84,61%) e para a linhagem *D. sturt-like*, 10 ampliações (76,92%). O valor de transferibilidade para os demais subgrupos foi de 53,85% para o subgrupo *saltans*, 46,15 % para o subgrupo *elliptica*, 30,77% para o subgrupo *parasaltans* e 23,08% para o subgrupo *cordata* (Tabela 3).

Os microssatélites apresentaram maior sucesso de amplificação para as espécies do subgrupo *sturtevantii* (*D. sturtevantii*, *D. dacunhai*, *D. milleri* e *D. sturt-like*). *D. prosaltans* (subgrupo *saltans*) também apresentou um número relativamente alto de amplificação (9 microssatélites – 60%).

De acordo com a análise de distância euclidiana, as espécies do subgrupo *sturtevantii* apresentaram-se em um agrupamento bem definido. Os outros subgrupos apresentaram agrupamentos diversos, neste caso indicando uma variação na amplificação dos microssatélites utilizados para as diferentes espécies (Figura 1).

O trabalho da Laborda et al. (2009) testando microssatélites específicos de *D. mediopunctata* em outras espécies obteve amplificação positiva tanto para espécies próximas como para espécies distantes filogeneticamente. Inclusive no trabalho desta autora *op.cit.* foi observada transferibilidade positiva para a espécie *D. sturtevantii*, enquanto esta transferibilidade (microssatélites de *D. mediopunctata*

para populações de *D. sturtevantii*) não foi obtido no trabalho de Trava et al, 2016. Prestes et al. (2015) também utilizou os microsátélites de *D. mediopunctata* nas espécies do grupo *guarani* (*D. ornatifrons*) e nas espécies do grupo *guaramunu* (*D. maculifrons*; *D. grisolineata*), ocorrendo maior transferibilidade entre espécies de grupos diferentes do que entre espécies de mesmo grupo (Prestes et al., 2015).

Nossos resultados indicam que a transferibilidade pode ser usada em alguns casos, mas nem sempre isto é possível. No presente estudo os microsátélites específicos de *D. sturtevantii* mostraram-se altamente eficientes para as espécies incluídas no subgrupo *sturtevantii* e alguns deles também para as espécies dos outros subgrupos, principalmente o subgrupo *saltans*, tornando possível seu uso em estudos populacionais e evolutivos nas espécies do grupo *saltans* de *Drosophila* e possivelmente para grupos filogeneticamente relacionados, como o grupo *willistoni*.

Agradecimentos: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (Número dos processos: 2014/14059-0, 2015/17579-7; 2017/05344-0). À equipe do laboratório da Professora Doutora Anete Pereira de Souza, UNICAMP pelo auxílio na produção da biblioteca genômica.

Tabela 1. Subgrupos, espécies, localização das amostras e número de indivíduos analisados (N).

Subgrupos	Espécies	Localização	N
<i>sturtevanti</i>	<i>D. sturtevanti</i>	Matão, São Paulo, Brasil	3
	<i>D. dacunhai</i>	Petionville, Haiti	3
	<i>D. milleri</i>	El Yunque, Puerto Rico	3
	<i>D. sturt-like</i>	Guiana Francesa	3
<i>saltans</i>	<i>D. prosaltans</i>	Matão, São Paulo, Brasil	3
	<i>D. austrosaltans</i>	Nova Granada, São Paulo, Brasil	3
	<i>D. septentriosaltans</i>	Guiana Francesa	3
	<i>D. pseudosaltans</i>	Cantareira, São Paulo, Brasil	3
	<i>D. nigrosaltans</i>	Guiana Francesa	3
	<i>D. lusaltans</i>	Petionville, Haiti	3
	<i>D. saltans</i>	San José, Costa Rica	3
<i>parasaltans</i>	<i>D. parasaltans</i>	Belém, Pará, Brasil	3
<i>cordata</i>	<i>D. neocordata</i>	Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil	3
<i>elliptica</i>	<i>D. emarginata</i>	Guiana Francesa	3
	<i>D. neosaltans</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil	3
	<i>D. neoelliptica</i>	Aguaí, Santa Catarina, Brasil	3
			48

Tabela 2. Teste de 16 iniciadores sintetizados para a espécie *D. sturtevantii* e testados para 15 indivíduos. AC=Condições de anelamento; TD₆₅₋₅₅=PCR *touchdown* com temperaturas variando entre 65 a 55°C; +=Amplificação; ---=sem amplificação. Motif = em análise. Genbank accession = após trabalho aceito publicação.

Locos	Genbank accession	Primer sequence (5'-3')	Motif	Size (bp)	AC	<i>D. sturtevantii</i>
Dsturt_A		GTAAGCGCTGACTGGTCAAC CCTTTTCCTCTAGTCGCAGT	(AC) ₁₁	262	61°C	+
Dsturt_B		GCTCTTTTCGGATTTGCTGTG GCCACTTTTCGAAGAGTCAAG	(GT) ₅	117	TD ₆₅₋₅₅	+
Dsturt_C		GTGTTTCATAAGGTGCCATC CTGACCACCCACAAGGAAA	(TG) ₆	169	TD ₆₅₋₅₅	+
Dsturt_D		GACTGAGTCTATCCATGGGC CAAGTCACGTTTGCTGACAC	(GAT) ₇	141	TD ₆₅₋₅₅	+
Dsturt_E		ATGATGACTTCCGCTACTCG GTGTAGGTGTGAGTGAGGAG	(CAA) ₅	236	56°C	+
Dsturt_F		GTATGCAATCTCGCTCACAC CAAAAACACTTGCTATGCGC	(GA) ₇	197	TD ₆₅₋₅₅	---
Dsturt_G		ACAGGGCTTTAGCATCTTGA ATTATCCCAGGCGATTGTGT	(AC) ₁₁	227	55°C	+
Dsturt_H		ACAGCTGCATGATAATCCCA GACGATGAGAATGCCAATGG	(CA) ₁₀ ...(AG) ₁₈	286	TD ₆₅₋₅₅	---
Dsturt_I		ACAGCTGCATGATAATCCCA CAGTGACGAGTTGAGGAGTA	(CA) ₁₀	178	TD ₆₅₋₅₅	+
Dsturt_J		GCTGGCGCTAAAAGAAAGAA GTGTTGAAATGATGTCGGCA	(ACAT) ₈	225	65°C	+
Dsturt_K		TTTCCCTGCTTGTGTCTCT AGTTCTCGGTTCTCGTTGAA	(GT) ₅ ...(TG) ₈	265	TD ₆₅₋₅₅	+
Dsturt_L		CGAGCATTITGTCGGAGTTT ATAGGCGGAAAAGAAGGAGG	(CA) ₉	205	56°C	+
Dsturt_M		AACCAATTGTGTTCTGTTGC TCAGTTGGAGCCAAGTCAAT	(TG) ₁₃	210	TD ₆₅₋₅₅	+
Dsturt_N		CCAATTTTCTAGCCAGGC GAACTTGAAACCGACTTGG	(CA) ₁₂	262	53°C	+
Dsturt_O		GAACTTGAAACCGACTTGG AGAGGAATCGAAACGTAGGG	(CA) ₁₁ ...(CA) ₅	163	57°C	+
Dsturt_P		ATATGTGGTGAGCTTGGAGG ATGGGAATCATCCTTGGACC	(AC) ₁₀	195	TD ₆₅₋₅₅	---

Tabela 3. Dados de amplificação de 13 microssatélites de *Drosophila sturtevantii* em 16 espécies de *Drosophila* do grupo *saltans*. + amplificou; +- e - amplificou, porém precisa de ajustes nos reagentes.

Grupos	Espécies	Dsturt_A	Dsturt_B	Dsturt_C	Dsturt_D	Dsturt_E	Dsturt_G	Dsturt_I	Dsturt_J	Dsturt_K	Dsturt_L	Dsturt_M	Dsturt_N	Dsturt_O	Nº
<i>sturtevantii</i>	<i>D. sturtevantii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	<i>D. dacunhai</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
	<i>D. milleri</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	11
	<i>D. sturt-like</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	10
<i>saltans</i>	<i>D. prosaltans</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	9
	<i>D. austrosaltans</i>	-	+	+	+	+	+	+-	-	+-	-	-	+	+	9
	<i>D. septentriosaltans</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	6
	<i>D. pseudosaltans</i>	-	+	-	+	+	-	+-	+	-	+	+	-	+-	8
	<i>D. nigrosaltans</i>	-	+	-	+	+	+-	-	-	-	-	+	-	-	7
	<i>D. lusaltans</i>	-	+	-	+	-	-	+-	-	-	-	+-	-	+	6
	<i>D. saltans</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
	<i>D. parasaltans</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+-	-	-	-	4
<i>cordata</i>	<i>D. neocordata</i>	-	+	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>elíptica</i>	<i>D. emarginata</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+-	-	-	4
	<i>D. neosaltans</i>	-	+	-	+	+	+-	+-	-	-	-	+	-	-	6
	<i>D. neoelíptica</i>	-	+	-	+	+	+-	-	+	-	-	+	-	+	8

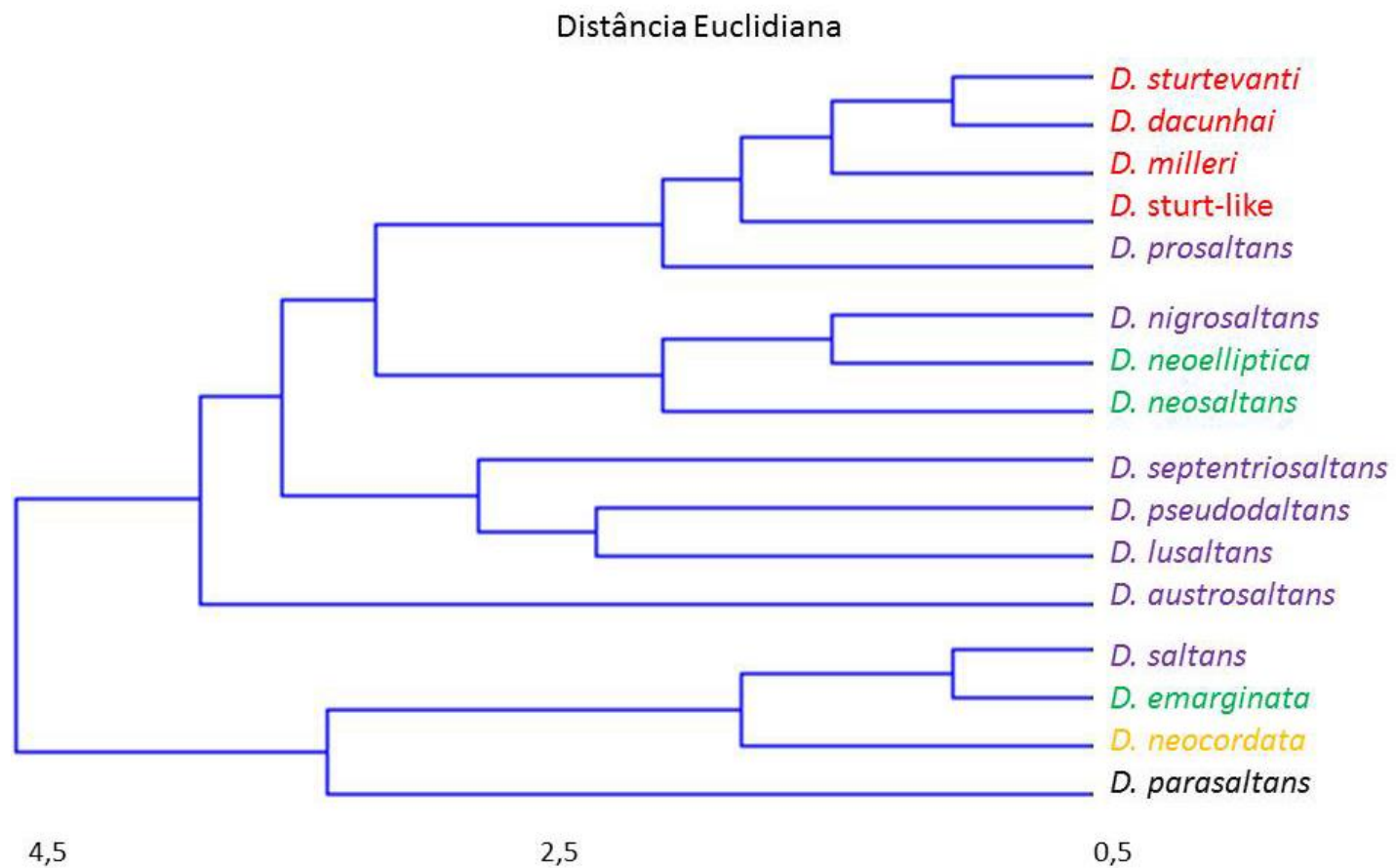


Figura 1. Distância Euclidiana das espécies do grupo *saltans* baseada na transferibilidade de microssatélites de *D. sturtevantii*.

■ grupo *sturtevantii*
 ■ grupo *saltans*
 ■ grupo *elíptica*
 ■ grupo *cordata*
 ■ grupo *parasaltans*.

REFERÊNCIAS

- Akkaya MS, Bhagwat AA and Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132(4):113-39.
- Aljanabi SM and Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.
- Bernardo AA and Bicudo HEMC (2009) Variability of esterase patterns in adult flies of the *saltans* species group of *Drosophila* (subgenus *Sophophora*). *Genetics* 137:111–124.
- Bicudo HEMC (1979) Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV The *sturtevanti* subgroup. *Brazilian Journal of Genetics* 2:247–258.
- Billotte N, Lagoda PJJ, Risterucci AM and Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–88.
- Castro JP and Carareto CMA (2004) P elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. *Journal of Molecular Evolution* 32:383–387.
- Clark JB, Altheide TK, Schlosser MJ and Kidwell MG (1995) Molecular evolution of P transposable elements in genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. *Molecular Biology and Evolution* 12:902–913.
- Clark JB and Kidwell MG (1997) Phylogenetic perspective on P transposable elements evolution in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:11428–11433.
- De Setta N, Loreto ELS and Carareto CMA (2007) Is the evolutionary history of the O-type P element in the *saltans* and *willistoni* groups of *Drosophila* similar to that of the canonical P element? *Journal of Molecular Evolution* 65(6):715-724.
- Dobzhansky TH (1944) Experiments on sexual isolation in *Drosophila*. III. Geographic strains of *Drosophila sturtevanti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 30:335-339.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HÁ and Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American Journal of Human Genetics* 49:746–756.
- Ellis JR and Burke JM (2007) EST–SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity* 99:125–132.
- Fantin C, Carvalho CF, Hrbek, T, Sites Jr JW, Monjeló LAS, Astolfi-Filho S and Farias IP (2007) Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes* 7: 1235-1238.

Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3rd edition. Brasília: Embrapa- Cenargen, 220 pp.

Freschi, AP, Kobayashi MKH and Tadei, WJ (2002) Analysis of genetic variation in *Drosophila* pools by AFLP markers. *Drosophila* Information Service (DIS), 85:114-117.

Jarne P and Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology and Evolution* 11:424–429.

Kalia RJ, Rai MK, Kalia S, Singh R and Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334.

Katti MV, Ranjekar PK and Gupta VS (2001) Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution* 18:1161–1167.

Knapik EW, Goodman A, Ekker M, Chevrette M, Delgado J, Neuhauss S, Shimoda N, Driever W, Fishman MC and Jacob HJ (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics* 18:338–343.

Kobayashi MKH, Bicudo HEMC (1994) Productivity in mass crosses of *Drosophila sturtevantii*: A comparative study of laboratory stocks and recently collected flies. *Rev Brasil Genetics* 17(4):393-399.

Kobayashi MKH and Bicudo HEMD (1997) Inversion polymorphism in laboratory strains and natural samples of *Drosophila sturtevantii* (*saltans* group, *sturtevantii* subgroup). *Cytobios. Cambridge: Faculty Press* 89(356):7-20.

Laborda PR, Klaczko LB and Souza AP (2009) *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. *Conservation Genetics Resour* 1:281-296.

Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S and Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 4:981–994.

Magalhães LE (1962) Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. *University of Texas Pub* 6205:135-154.

Magalhães LE and Bjornberg AJS (1957) Estudo da genitália masculina de *Drosophila* do grupo *saltans* (Diptera). *Revista Brasileira de Biologia* 17:435-450.

Morgante M, Hanafey H and Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genome. *Nature Genetic* 30:194–200.

Morgante M and Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3:175-182.

Mourão CA and Bicudo HEMC (1967) Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo *saltans* (Drosophilidae, Diptera). Papéis Avulsos Zoologia 20:123–134.

Nascimento AP and Bicudo HEMC (2002) Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). Genetic 114:41–51.

O' Grady PM, Clark JB and Kidwel MG (1998) Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. Molecular Biology and Evolution 15:656–664.

Oliveira FA, Cidade FW, Fávero AP, Vigna BBZ and Souza AP (2016) First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the Plicatula group. BMC Research Notes 9:511.

Powell W, Machray GC and Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Science 1:215–222.

Prestes JO, Beira AS, Machado LPB and Mateus RP (2015) Microsatellite heterologous amplification in individual samples of *Drosophila griseolineata*. Drosophila Information Service 98:35-37.

Rodríguez-Trelles F, Tarrío R and Ayala FJ (1999) Molecular evolution and phylogeny of the *Drosophila saltans* species group inferred from the Xdh gene. Molecular Phylogenet and Evolution 13:110–121.

Sanguinetti C, Dias Neto E and Simpson AJG (1994) RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17:209-214.

Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodrigue-Tomé P, Aggarwal A, Bajorek E, et al. (1996) A gene map of the human genome. Science 274:540–546.

Silva JC and Kidwell MG (2000) Horizontal transfer and selection in the evolution of P elements. Molecular Biology and Evolution 17:1542–1557.

Silva JC and Kidwell MG (2004) Evolution of P Elements in Natural Populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. Genetics Society of America 168: 1323-1335.

Souza TAJ, Noll FB, Bicudo HEMDC and Madi-ravazzi L (2014) Scanning Electron Microscopy of male terminalia and its application to species recognition and phylogenetic reconstruction in the *Drosophila saltans* group. PLoS One 9(6):e97156.

Stoesser G, Baker W, Broek AVD, Camon E, Garcia-Pastor M, Kanz C, Kulikova T, Leinonen R, LIN Q, Lombard V, LOPEZ R, Redaschi N, Stoehr P, Tuli MA, Tzouvara K, Vaughan R (2002) The EMBL Nucleotide Sequence Database. Nucleic Acids Research 30(1): 21–26.

Sturtevant AH (1942) The classification of the genus *Drosophila*, with description of nine new species. University of Texas Public 4213:5–51.

Sunnucks P, England PE, Taylor AC and Hales DF (1996) Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic Sitobion aphids in Australia. *Genetics* 144:747-756.

Tarrio R, Rodriguez-Trelles F and Ayala FJ (1998). New *Drosophila* introns originate by duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(4):1658-1662.

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16):6463-6471.

Toth G, Gaspari Z and Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10:967–981.

Tractz CC, Salomon GR, Zorzato SV, Machado LPB and Mateus RP (2012) Allele diversity of cross-species microsatellite amplification on populations of *Drosophila guarani* species group from Araucaria Forest in Brazil. *Drosophila Information Service* 95:76-79.

Trava BM, Machado LPB, Mateus RP and Madi-Ravazzi L (2016) Transferability of SRR primers developed for *D. mediopunctata* to the species *D. sturtevanti*. *Drosophila Information Service* 99:16-18.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R and Leunissen JÁ (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35:4-71.

Varshney RK, Thudi M, Aggarwal R and Borner A (2007) Genic molecular markers in plants: development and applications. In: Varshney RK, Tuberosa R (eds) *Genomics assisted crop improvement: genomics approaches and platforms*. Springer, Dordrecht 1:13–29.

Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n. (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7:524–530.

Weising K, Atkinson RG and Gardner RC (1995) Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Application* 4:249–255.

Internet Resources

Statsoft (2004) Inc. Statistica (data analysis software system), <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features> (December 4, 2017)

Populational structure of *Drosophila sturtevantii* from Atlantic Forest biome using species-specific microsatellite loci

CAPÍTULO III

Nas normas da revista BMC Genetics

Populational structure of *Drosophila sturtevantii* from Atlantic Forest biome using species-specific microsatellite loci

Bruna Memari Trava¹, Rogério Pincela Mateus², Lilian Madi-Ravazzi¹

¹ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Cristóvão Colombo Street, 2265 – Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil.

² Universidade Estadual Centro-Oeste, Campus Cedeteg (UNICENTRO), Simeão Varela de Sá Street, 03, Vila Carli, Guarapuava, PR 85040-080, Brazil.

*Correspondence: brunamemaritrava@gmail.com; rogeriopmateus@gmail.com; lilian@ibilce.unesp.br

Abstract

Background: *Drosophila sturtevantii* is a Neotropical species with extensive geographic distribution occurring from Mexico to the south of Brazil, including the Caribbean islands. In South America, it is abundant and adapted to different phytophysionomies of the Atlantic Forest. Reproductive, chromosomal, enzymatic, molecular and morphological studies indicate the existence of differentiation among its populations, which could be related to the fragmentation of the Atlantic Forest during the glacial periods. The objective of the present work was to evaluate the level of genetic diversity and to analyze the structure of populations from areas of the Atlantic Forest of three geographic regions of Brazil, Northeast, Southeast and South, using species-specific microsatellites.

Results: Collections in nine fragments of the Atlantic Forest resulted in 126 *D. sturtevantii* males, which were analyzed for 11 species-specific microsatellite loci. A total of 109 alleles, ranging from 2 to 16 alleles per locus, were detected, and the observed mean heterozygosity was low (0.20 to 0.38). All populations presented significant deviation from Hardy-Weinberg expectation ($p < 0,001$) in at least 3 loci. Moderate genetic differentiation among populations ($F_{ST} = 0.0877$) and high heterozygotes deficiency ($F_{is} = 0.5250$) were obtained. Geographical distances were not correlated with genetic differentiation.

Conclusions: *D. sturtevantii* showed a considerable level of polymorphism and allele richness for the microsatellite markers applied in the analyzed populations. A moderate population structure, besides the large geographic distances among

populations, was detected probably due to historical gene flow and/or maintenance of ancestral polymorphism. Ribeirão da Ilha, SC, an island population, was the most divergent population, which could be attributed to the founder effect, and restrict gene flow due to its isolated position. The presence of a genetic bottleneck in the population of Guaribas, PB, was also detected, probably due to the recent occurrence of fire in this area.

Keywords: genetic diversity, Atlantic Forest fragmentation, SSR, molecular marker

Background

The Brazilian Atlantic Forest biome is formed by a complex set of vegetation types, or phytophysognomies, distributed along approximately 1.3 million Km² along the coast, and interior of south region of Brazil, over 17 states (IBGE, 1993). This biome is one of the most important in terms of endemism and biodiversity in the world; however, it is also the most threatened (Mittermeier et al., 2004), currently remaining between 7 to 11% of its original area (Salgueiro et al., 2004; Tabarelli et al., 2005). Among the seven different phytophysognomies there are the Dense Ombrophylous Forest, the Seasonal Forest (Semidecidual and Decidual) and the Mixed Ombrophilous Forest. These have a very discriminating climates: hot and humid; hot, humid summers with cold, dry winters; and humid and cold climate, respectively (Marques, 2016).

Drosophila sturtevantii (*saltans* group, *sturtevantii* subgroup) is a neotropical species with broad geographic distribution, occurring within almost the entire range of the occurrence of the *saltans* group, from Mexico to southern Brazil, including the Caribbean islands. This species is generalist, and has high abundance in forests in all seasons (Magalhães, 1962). This species was extensively studied in the past and also in some more recent works (Dobzhansky, 1944; Bicudo, 1979; Hosaki-Kobayashi; Bicudo, 1994; Kobayashi; Bicudo, 1997; Knapp, 1953; Nascimento; Bicudo, 2002; Bernardo; Bicudo, 2009). Due to several characteristics of *D. sturtevantii*, this species constitutes an excellent model organism for population studies (Magalhães, 1962).

D. sturtevantii populations present the higher polymorphism of esterases and polytene chromosome inversions among the species of *saltans* group (Knap, 1953; Kobayashi and Bicudo, 1994; Bernardo and Bicudo, 2009). Studies on reproductive

isolation among populations of this species are inconsistent. While Dobzhansky (1944) observed incipient sexual isolation among *D. sturtevantii* populations, Hosaki-Kobayashi and Bicudo (1994) did not find the same results in laboratory and fresh collected strains of *D. sturtevantii* from Mexico, Central America and Brazil.

A compilation of preliminary morphological (aedeagus and wing morphometry) and molecular (mitochondrial haplotypes) unpublished data from our laboratory, indicates that there are three different genetic sets of *D. sturtevantii* Brazilian populations: Northeast, Southeast and South. This genetic differentiation, along with the wide distribution of *D. sturtevantii*, makes this species an accurate model for studies of association between habitat fragmentation and the distribution of the genetic variability.

Specimens that occur in fragmented habitat, such as *D. sturtevantii* in Atlantic Forest, are frequently isolated and/or experience population size reduction, which triggers bottleneck and genetic drift effects. The isolation of *Drosophila* species populations, which has low dispersion (Wallace, 1966; Spencer; Heed, 1975; Markow; Castrezana, 2000), could result in limited gene flow, increased interpopulational genetic differentiation, and reduced intrapopulational variability and population size. These events could, in time, make the population less resilient to environment changes (Frankham, 1997; Templeton et al., 2001). Studies of population genetics are very helpful to understand a species history, and most of the investigations of genetic variation have concentrated on (nearly) neutral genetic markers as gauges of contemporary and historical processes affecting the maintenance and distribution of genetic variation.

In this work, for the first time, it was performed a populational study using 11 species-specific microsatellite markers of *D. sturtevantii*. The main objective was to evaluate the association of genetic differentiation and the fragmentation of the Atlantic Forest through the analysis of natural populations of *D. sturtevantii* from three geographic regions of Brazil: Northeast, Southeast and South.

Methods

Population samples

D. sturtevantii samples were obtained from nine fragments of the Brazilian Atlantic Forest (Table 1). The flies were captured using closed traps containing

fermented banana bait (Penariol et al., 2008). The identification of the males was carried out by analyzes of the edeagus using specific identification keys (Freire-Maia; Pavan, 1949; Mourão; Bicudo, 1967; Vilela; Bächli, 1990; Souza et al., 2014).

The analyzed populations of *D. sturtevantii* were from two different phytophysiognomies of the Atlantic Forest: 1. Dense Ombrophylous Forest: southern region - Aguaí (AGU), Ribeirão da Ilha (RDI) and Piraí (PIR) populations; southeastern region - Serra da Cantareira (SDC) and Picinguaba (PIC); and northeast region - Pratigi (PRA); 2. Semidecidual Seasonal Forest: southeast region – Matão (MAT) and Nova Granada (NGR) populations; and northeast region - Guaribas (GUA) (INPE, 2011).

Tabela 1. Populations coordinates, size and phytophysiognomies of areas of collection and number of sample of *Drosophila sturtevantii* analyzed by microsatellite loci.

Geographic region	Collection site (Abbreviation)	Coordinates	Phytophysiognomies	Area size(ha)	Sample number
South Region	Aguaí (AGU), Santa Catarina, Brazil	28°61'S, 49°55'O	Dense Ombrophylous Forest	7.652	15
	Ribeirão da Ilha (RDI), Santa Catarina, Brazil	27°71'S, 48°56'O	Dense Ombrophylous Forest	10.000	15
	Piraí (PIR), Santa Catarina, Brazil	26°25'S, 48°95'O	Dense Ombrophylous Forest	982.6	10
Southeast Region	Serra da Cantareira (SDC), São Paulo, Brazil	23°45'S, 46°63'O	Dense Ombrophylous Forest	64.800	15
	Picinguaba (PIC), São Paulo, Brazil	23°96'S, 46°64'O	Dense Ombrophylous Forest	47.500	15
	Matão (MAT), São Paulo, Brazil	21°61'S, 48°53'O	Semidecidual Seasonal Forest	2.189,6	15
Northeast Region	Nova Granada (NGR), São Paulo, Brazil	20°58'S, 49°30'O	Semidecidual Seasonal Forest	1.359,6	15
	Pratigi (PRA), Bahia, Brazil	13°75'S, 39°21'O	Dense Ombrophylous Forest	32.000	15
	Guaribas (GUA), Paraíba, Brazil	6°72'S, 35°18'O	Semidecidual Seasonal Forest	4.051	11
Total					126

DNA extraction and microsatellite analyses

Eleven microsatellites described for *D. sturtevantii* (Trava, B. M., Roman, B.E., Madi-Ravazzi, L., 2018, submitted) were applied in individuals sampled from nine natural populations (Table 1). Extraction of genomic DNA was performed by individual maceration of the sampled males using the Promega kit. Polymerase chain

reaction (PCR) was performed in a total volume of 25 μ l containing 0.5 U of Taq DNA polymerase (Promega), 2.5 μ l of 10x buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 pmol of each oligonucleotide, 1.5 mM of MgCl₂ and 3 ng of DNA. A touchdown PCR was performed for Dsturt_B, Dsturt_D, Dsturt_I, Dsturt_K and Dsturt_M loci; denaturation cycle at 94°C for 2 minutes; 2 times 10 cycles of 94°C for 1 minute, 65°C (-1°C per cycle) for 1 minute and, 72°C for 2 minutes; and an end of 18 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 5 minutes. For the other loci, a specific primer annealing temperature (Ta) was applied: Dsturt_E - 56°C, Dsturt_G - 55°C, Dsturt_J - 65°C, Dsturt_L - 56°C, Dsturt_N - 53°C, Dsturt_O - 57°C. The PCR conditions to these loci were: 94°C for 2 minutes; 30 cycles of 94°C for 1 minute, specific Ta for 1 minute and 72°C for 2 minutes; ending at 72°C for 5 minutes. PCR amplification products were visualized in 6% polyacrylamide gel and stained with 15% silver nitrate (Sanguinetti et al., 1994).

Statistical analysis

The allelic richness was calculated according to Novicic and collaborators (2011) as the ratio between the sum of the allele numbers of the populations per locus and the total number of loci.

Allele frequency, the proportion of polymorphic loci, the Hardy-Weinberg equilibrium test using the Markov Chain method (10 batches and 2000 permutations by batches) and the correlation between genetic distance and geographic distance by the Mantel test (with 2000 random permutations) were performed in the TFPGA - Tools For Population Genetic Analyzes software (Miller, 1997).

The expected and observed heterozygosities per loci, Nei (1978) genetic distances and identities, Neighbor-Joining clustering analysis, and Wright's F statistic were obtained using the GDA software (Lewis; Zaykin, 2001). The analysis using the estimates of distance and Wright F-statistics were performed excluding the Dsturt_B and Dsturt_D loci because they were monomorphic in almost all populations. The values obtained for F_{ST} using the Wright F statistics were applied to the classification of genetic differentiation among populations (spatial analyzes) using the qualitative guideline proposed by Wright (1978) in 'low' (0 - 0.05), moderate (0.05-0.15), 'high' (0.15-0.25) and 'very high' (> 0.25).

A population bottleneck test was performed in BOTTLENECK software (Cornuet; Luikart, 1996; Piry et al., 1999) using parameters proposed for

microsatellite analysis in the software site (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/bottleneck.html>).

Another kind of correlation, besides Mantel test, between genetic structure and geographic distance were analysed using GENELAND V. 4.0.6 (Guillot et al., 2005). This software provides information about the probable area of association of populations in space, through an array between genotype and geographic coordinates. This analysis was run with 100,000 interactions, 100 thinning and 200 burn in.

Genetic structure was also investigated through a cluster-based method (STRUCTURE 2.3.4, Pritchard et al., 2000). For this analysis, it was estimated the number of clusters (K) that best explains the data. The software parameters applied were K ranging from 1 to 13, with burnin and Markov Chain Monte Carlo (MCMC) number after burnin of 10,000 and 25 interactions. A bar graphic was generated through the CLUMPAK tool (Kopelman et al. 2015), using the best number of clusters (K) was obtained by the STRUCTURE HARVESTER tool (Earl; Vonholdt, 2012).

Gene flow among populations was estimated in POPGEN (Population Genetic Analysis software, Yeh; Yahng; Boyle, 1999). Graphs of pairwise F_{st} and Nei (1978) distances with different degrees of differentiation within and between populations were constructed in ARLEQUIN3.5 (Excoffier; Lischer, 2010), using R package (R-lequin) manual.

Results

Genetics Diversity analysis

In the analysis of the 11 microsatellite loci specific for *D. sturtevantii*, using 126 males from nine populations, 109 alleles were detected. Allelic richness resulted in 10 alleles per locus, ranging from 2 alleles (Dsturt_B) to 16 alleles (Dsturt_N) (Table 2). The populations with the highest allelic richness were PRA, NGR and SDC. All microsatellite loci were polymorphic, with exception of Dsturt_B and Dsturt_D. These loci presented low number of alleles (1 to 3), they were monomorphic in all populations, except PIR, and showed frequencies accordingly to the expectations of Hardy-Weinberg in all samples. All populations presented significant deviation from Hardy-Weinberg expectation ($p < 0,001$) in at least 3 loci. Exclusive alleles were observed in nine of the 11 studied loci: Dsturt_D - PIR (allele 1); Dsturt_E - PRA (allele 11); Dsturt_G - MAT (allele 12); Dsturt_I - AGU and MAT (allele 1 and 10);

Dsturt_J - RDI and NGR (1 and 11); Dsturt_K - PIR (allele 1); Dsturt_L - SDC and PRA (allele 1 and 12); Dsturt_N - MAT (allele 16) and Dsturt_O - GUA (allele 14). The observed mean heterozygosity was low and ranged from 0.20 (GUA) to 0.38 (SDC and PRA) (Table 3). The occurrence of population bottlenecks was detected only in the GUA population (Two Phase Model, $p = 0.02$).

Table 2 Mean number of alleles per locus/all loci (allelic richness). S.D. = standard deviation.

Locus	Populations									Alleles	Mean	S.D.
	AGU	RDI	PIR	SDC	PIC	MAT	NGR	PRA	GUA			
Dsturt_B	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1.77	0.046
Dsturt_D	1	1	2	2	1	2	1	2	1	3	1.44	0.055
Dsturt_E	5	7	6	8	5	6	7	7	7	11	6.44	0.106
Dsturt_G	6	6	6	8	7	6	8	6	4	12	6.33	0.128
Dsturt_I	5	3	6	5	2	8	6	6	3	10	4.88	0.199
Dsturt_J	4	3	5	4	5	7	7	7	6	11	5.33	0.157
Dsturt_K	6	5	6	5	7	6	6	6	4	8	5.66	0.090
Dsturt_L	8	3	4	10	9	5	9	9	6	13	7.00	0.267
Dsturt_M	6	6	4	6	8	6	6	8	5	9	6.11	0.132
Dsturt_N	7	11	4	8	8	8	9	6	8	16	7.66	0.202
Dsturt_O	6	5	6	8	7	7	6	9	9	14	7.00	0.148
Mean	5.1	4.6	4.6	6	5.5	5.7	6.1	6.2	4.9	10	5.42	0.139

Table 3 Allele frequencies, proportion of polymorphic loci (% $P_{0.95}$), mean observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities of eleven microsatellite loci from nine populations of *Drosophila sturtevantii*. n number of individuals genotyped, $P_{0.95}$ proportion of polymorphic loci, H_o mean observed heterozygosity, H_e mean expected heterozygosity, numbers in bold represent frequencies that are not in Hardy-Weinberg equilibrium.

Locus	Populações								
	AGU	RDI	PIR	SDC	PIC	MAT	NGR	PRA	GUA
Dsturt_B	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=11
1	0.0333	---	0.1000	0.0333	0.0333	0.0333	0.0333	0.0333	---
2	0.9667	1.0000	0.9000	0.9667	0.9667	0.9667	0.9667	0.9667	1.0000
Dsturt_D	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=08
1	---	---	0.0500	---	---	---	---	---	---
2	---	---	---	0.0333	---	0.0333	---	0.0333	---
3	1.0000	1.0000	0.9500	0.9667	1.0000	0.9667	1.0000	0.9667	1.0000
Dsturt_E	n=15	n=14	n=10	n=15	n=13	n=15	n=15	n=15	n=10
1	---	0.0357	0.0500	---	---	---	---	---	---
2	---	---	0.0500	---	---	---	0.1333	---	0.1000
3	0.1667	---	---	0.0333	---	---	0.1667	---	0.3000
4	0.3333	0.1786	---	0.1000	---	0.2667	0.1333	---	0.1500

5	0.1667	0.1429	0.4500	0.5333	0.2308	0.3000	0.1333	0.2000	0.2000
6	---	0.4643	0.1000	0.0667	---	0.1333	0.1000	0.0667	---
7	0.0667	---	---	0.0333	0.6154	0.2000	0.3000	0.3333	0.1000
8	---	0.0357	0.0500	0.0333	0.0769	0.0333	0.0333	0.1667	0.0500
9	0.2667	0.0714	0.3000	0.0333	0.0385	---	---	0.0333	0.1000
10	---	0.0714	---	0.1667	0.0385	0.0667	---	0.1000	---
11	---	---	---	---	---	---	---	0.1000	---
Dsturt_G	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=15	n=14	n=15	n=11
1	---	---	0.0500	0.0667	---	---	0.0714	---	---
2	---	0.0667	0.1000	0.1667	0.0333	---	---	---	---
3	---	0.1333	0.3000	0.1000	0.1000	---	0.0714	---	0.1364
4	---	0.0667	0.3000	0.1000	0.0333	---	0.2143	0.1333	---
5	0.0667	---	0.1500	0.2333	---	---	0.1071	0.1000	---
6	0.0667	---	---	0.2000	0.3667	0.0667	0.2857	0.1667	0.4091
7	0.1000	0.2333	0.1000	0.1000	0.2333	0.1333	0.1786	0.0667	0.1364
8	0.4333	0.3667	---	---	0.2000	---	0.0357	0.4333	0.3182
9	0.3000	0.1333	---	---	0.0333	0.5000	0.0357	0.1000	---
10	0.0333	---	---	---	---	0.0667	---	---	---
11	---	---	---	0.0333	---	0.1333	---	---	---
12	---	---	---	---	---	0.1000	---	---	---
Dsturt_I	n=15	n=14	n=10	n=11	n=04	n=15	n=15	n=15	n=04
1	0.0667	---	---	---	---	---	---	---	---
2	0.2000	0.1429	0.1000	0.0909	---	0.1333	0.0667	0.0667	---
3	0.2000	---	0.1000	0.1818	---	0.0667	0.3333	0.1333	---
4	---	---	---	---	---	0.2667	0.1333	0.1333	0.2500
5	0.3333	---	0.3000	---	---	0.2667	0.2667	0.2000	---
6	0.2000	0.7857	0.2000	0.1818	---	0.0667	---	---	---
7	---	0.0714	0.1000	0.2727	0.5000	0.0667	0.0667	0.4000	0.5000
8	---	---	0.2000	0.2727	---	---	0.1333	0.0667	---
9	---	---	---	---	0.5000	0.0667	---	---	0.2500
10	---	---	---	---	---	0.0667	---	---	---
Dsturt_J	n=15	n=15	n=10	n=15	n=13	n=15	n=15	n=15	n=11
1	---	0.2000	---	---	---	---	---	---	---
2	---	0.2000	---	---	---	---	0.2667	0.0667	---
3	0.1333	0.6000	---	0.3667	0.0667	0.0667	0.0667	0.1333	0.0909
4	0.5667	---	0.1000	0.3333	0.1667	0.3667	0.2333	0.3667	0.2727
5	0.2333	---	0.2000	0.1667	0.3000	0.1333	0.1333	0.1667	0.3182
6	---	---	0.2500	---	0.3000	0.2667	0.1333	0.0333	0.1818
7	0.0667	---	0.3000	0.1333	---	---	---	---	0.0909
8	---	---	---	---	0.1667	0.1000	0.1333	---	---
9	---	---	0.1500	---	---	0.0333	---	0.0667	0.0455
10	---	---	---	---	---	0.0333	---	0.1667	---
11	---	---	---	---	---	---	0.0333	---	---
Dsturt_K	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=15	n=15	n=13	n=10
1	---	---	0.1500	---	---	---	---	---	---
2	0.3333	---	0.2000	---	0.0385	---	---	---	---
3	0.1667	0.1667	0.1000	0.0667	0.0769	0.2000	0.3000	0.1538	0.0500
4	0.2667	0.1000	0.3000	0.3000	0.1923	0.1667	0.2333	0.3077	0.2000
5	0.1000	0.1333	0.1500	0.2333	0.3846	0.3000	0.1333	0.1154	---
6	0.0333	0.2667	0.1000	0.2333	0.0769	0.1000	0.1000	0.1538	0.6500
7	0.1000	0.3333	---	---	0.1154	0.0333	0.1333	0.1538	0.1000
8	---	---	---	0.1667	0.1154	0.2000	0.1000	0.1154	---

Dsturt_L	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=15	n=15	n=14	n=08
1	---	---	---	0.0333	---	---	---	---	---
2	---	---	---	0.0667	0.0333	---	---	---	---
3	0.0667	---	---	0.1000	---	0.0667	0.3000	---	---
4	0.3667	---	---	0.3667	0.1333	0.3000	0.0667	0.0714	---
5	0.0667	---	---	0.1667	0.1000	0.3667	0.2000	0.1071	0.2500
6	0.1333	---	0.2000	0.0333	0.3000	0.1667	0.1667	0.1786	0.1250
7	0.1000	0.5000	0.3000	0.1000	0.0667	---	0.1000	0.1429	0.3750
8	0.1333	0.1333	0.4000	0.0667	0.1667	0.1000	0.0333	0.1786	0.0625
9	---	0.3667	---	0.0333	0.0667	---	0.0333	0.1071	0.1250
10	0.0667	---	0.1000	0.0333	0.1000	---	0.0333	0.1429	---
11	0.0667	---	---	---	0.0333	---	---	---	0.0625
12	---	---	---	---	---	---	---	0.0357	---
13	---	---	---	---	---	---	0.0667	0.0357	---
Dsturt_M	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=11
1	0.1667	---	---	---	---	---	---	---	0.1364
2	0.1667	0.0333	---	---	0.0667	0.0667	0.0667	0.1000	0.4091
3	0.4333	0.2333	0.2000	0.1667	0.3333	0.2000	0.2667	0.0667	0.1818
4	0.0333	0.2333	0.2500	0.1333	0.1667	0.1667	0.0667	0.1667	---
5	0.1667	0.3000	---	0.1333	0.1667	0.2667	0.5333	0.1000	0.2273
6	---	---	0.4500	0.2000	0.1000	0.2667	0.0333	0.2000	---
7	0.0333	0.1667	0.1000	0.2333	0.1000	0.0333	0.0333	0.2667	0.0455
8	---	0.0333	---	0.1333	0.0333	---	---	0.0667	---
9	---	---	---	---	0.0333	---	---	0.0333	---
Dsturt_N	n=15	n=15	n=10	n=15	n=12	n=15	n=14	n=15	n=10
1	---	0.0667	---	---	---	---	---	---	0.0500
2	0.0667	0.0667	---	0.0667	---	---	---	0.0667	0.1000
3	---	0.2000	---	0.1333	0.0833	---	0.0357	---	0.1500
4	---	0.1333	---	0.2000	0.2083	---	0.0714	---	---
5	---	0.1667	---	---	0.0833	---	---	0.1333	---
6	---	0.0333	---	0.1000	---	---	0.2143	0.1000	---
7	---	0.0667	---	0.0667	---	0.1000	0.0714	0.1333	0.2500
8	---	---	---	0.1667	0.2083	0.1000	---	0.1000	---
9	0.0667	0.0333	---	0.0667	0.2083	0.2333	0.1786	---	0.2000
10	0.2667	0.0333	0.3000	0.2000	0.0833	---	0.0714	0.4667	0.1000
11	0.1333	0.1333	0.4000	---	---	0.1667	0.2143	---	---
12	0.2667	---	0.0500	---	---	---	---	---	---
13	0.1333	---	---	---	0.0417	0.1333	0.0714	---	0.0500
14	0.0667	---	0.2500	---	0.0833	0.0667	---	---	---
15	---	0.0667	---	---	---	0.1333	0.0714	---	0.1000
16	---	---	---	---	---	0.0667	---	---	---
Dsturt_O	n=15	n=15	n=10	n=15	n=15	n=14	n=15	n=15	n=10
1	---	---	---	0.0333	---	---	---	---	0.1000
2	---	---	0.0500	0.0333	0.0333	---	---	---	0.1500
3	0.1000	0.2667	0.0500	---	0.1000	---	0.0333	0.0667	---
4	---	0.2333	---	---	---	---	---	0.1333	---
5	---	---	---	0.0333	---	0.1071	---	0.0667	---
6	---	---	---	0.0667	---	0.0357	---	---	0.0500
7	---	0.1000	0.3500	0.1333	0.2667	---	---	0.0667	0.0500
8	---	0.2333	0.1000	0.2667	0.1000	---	0.0333	---	0.1500
9	0.1333	0.1667	0.4000	0.3000	0.1667	0.1071	0.1333	0.0667	0.0500
10	0.3667	---	0.0500	0.1333	0.3000	0.2500	0.5333	0.2667	0.2000

11	0.2333	---	---	---	0.0333	0.2857	0.1333	0.0333	---
12	0.1000	---	---	---	---	0.1786	0.1333	0.2000	0.1000
13	0.0677	---	---	---	---	0.0357	---	0.1000	---
14	---	---	---	---	---	---	---	---	0.1500
% P _{0.95}	81.81	81.81	100	81.81	81.81	81.81	81.81	81.81	81.81
H _o	0.2666	0.2787	0.3454	0.3878	0.3515	0.3151	0.3030	0.3818	0.2066
H _e	0.6363	0.5926	0.6593	0.6773	0.6357	0.6733	0.6662	0.6879	0.6772

The Wright F statistics indicated moderate genetic differentiation ($F_{ST} = 0.0877$) among all populations and the Wright fixation index revealed high heterozygote deficiency ($F_{IT} = 0.5667$ and $F_{IS} = 0.5250$) (Table 4).

Table 4 Wright's F statistics of 11 microsatellites loci of nine *Drosophila sturtevantii* populations.

Locos	F _{IT}	F _{ST}	F _{IS}
Dsturt_B	0.0303	0.0145	0.0156
Dsturt_D	0.5959	0.1220	0.5397
Dsturt_E	0.4534	0.0950	0.3960
Dsturt_G	0.4434	0.0980	0.3829
Dsturt_I	1.0000	0.1832	1.0000
Dsturt_J	0.6354	0.0970	0.5962
Dsturt_K	0.4555	0.0493	0.4273
Dsturt_L	0.5818	0.0789	0.5459
Dsturt_M	0.4664	0.0576	0.4338
Dsturt_N	0.8550	0.0523	0.8470
Dsturt_O	0.2215	0.0803	0.1535
Mean	0.5667	0.0877	0.5250

No correlation between the genetic (F_{ST}) and geographic distances between pair of populations was obtained by the Mantel test ($r = 0.0647$; $p = 0.4850$), and the spatial structure analysis using the GENELAND software resulted in only one cluster of populations, with no geographical differentiation (Fig. 1). Accordingly with these results, the genetic distances (D) and identities (I) of Nei (1978) showed that the lowest genetic distance and higher indentity ($D=0.2591$, $I=0.7716$) were observed between geographically closed populations such as MAT and NGR, and the highest distance and lower identity were between geographically distant populations, such as MAT and RDI ($D=1.0374$, $I=0.3543$) (Table 5), corroborating that the genetic and geographical distances were not related. These were also in agreement with the gene flow rates obtained (Table 6). They ranged from 1.93 to 5.5, with the highest rate between the populations with the lowest genetic distances (MAT and NGR) and

the lowest rate was for the RDI population when compared to the other populations (Table 6).

Fig. 1A-C. Spatial structural analysis obtained using the GENELAND software. A- Map of the populations where collections of *D. sturtevantii* were performed in South America; B- Image comparing a satellite image of the area and a map generated by the software, relating the genotype of the individuals and their geographic location. Black spots indicate the distribution of the sampled populations. Number of colors linking all populations (one, orange) show the presence of only one group, indicating that there was no geographical differentiation. C- Graphical representation of the number of possible groups after simulation, showing one as the more probable number (as larger the bar the more possible is the number of identified population groups).

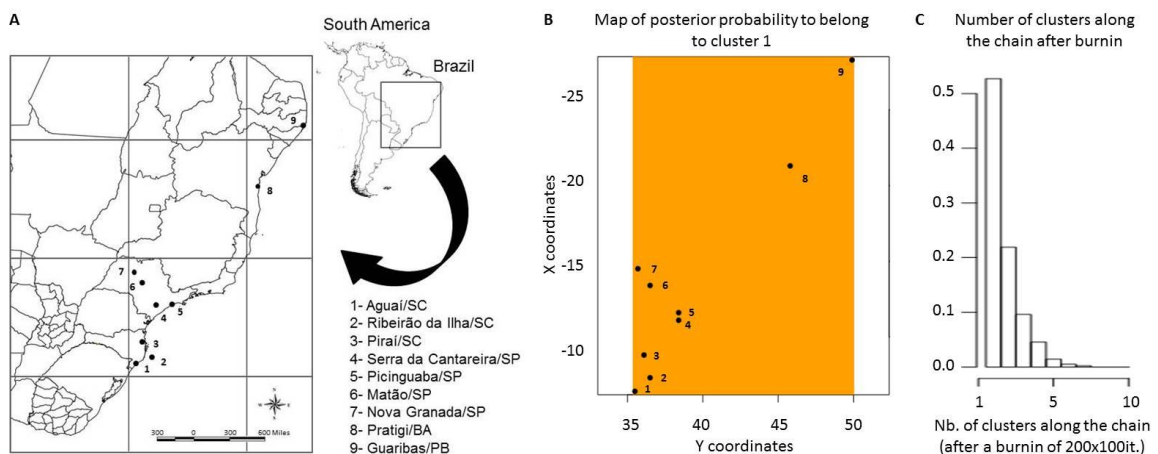


Table 5 Nei's (1978) genetic distances (below the diagonal) and similarities (above the diagonal) for nine *Drosophila sturtevantii* populations.

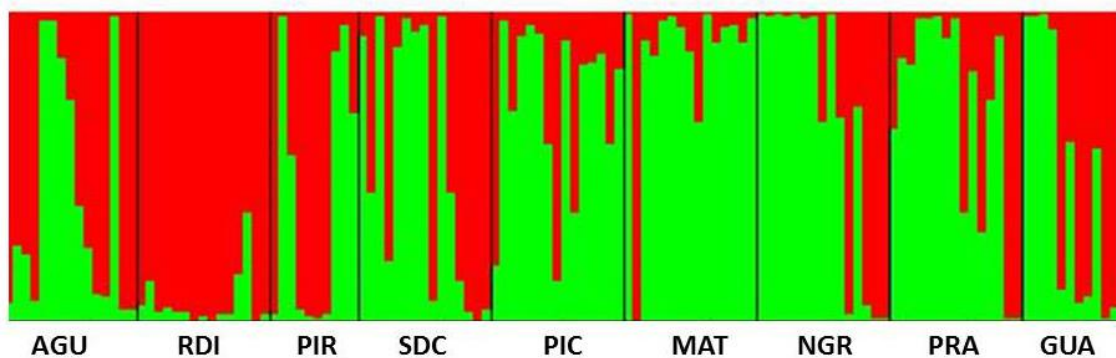
	AGU	RDI	PIR	SDC	PIC	MAT	NGR	PRA	GUA
AGU	***	0.4421	0.5434	0.5833	0.4932	0.7358	0.6882	0.6949	0.5270
RDI	0.8160	***	0.4463	0.5395	0.3698	0.3543	0.4083	0.4663	0.4384
PIR	0.6098	0.8065	***	0.6805	0.4882	0.5101	0.4854	0.5889	0.3634
SDC	0.5390	0.6171	0.3848	***	0.6757	0.6408	0.6081	0.6982	0.6190
PIC	0.7067	0.9945	0.7170	0.3919	***	0.5872	0.6245	0.6364	0.7565
MAT	0.3066	1.0374	0.6730	0.4450	0.5323	***	0.7716	0.6413	0.4688
NGR	0.3735	0.8957	0.7227	0.4973	0.4707	0.2591	***	0.6850	0.5632
PRA	0.3639	0.7629	0.5294	0.3591	0.4518	0.4441	0.3782	***	0.6003
GUA	0.6405	0.8243	1.0119	0.4796	0.2789	0.7574	0.5740	0.5102	***

Table 6 Gene flow rates among *D. sturtevantii* populations.

	AGU	RDI	PIR	SDC	PIC	MAT	NGR	PRA	GUA
AGU	---								
RDI	2.14	---							
PIR	2.74	2.08	---						
SDC	3.44	2.72	3.94	---					
PIC	2.61	1.93	2.54	3.69	---				
MAT	4.69	2.01	2.79	4.10	3.55	---			
NGR	4.11	2.14	2.68	3.95	3.65	5.50	---		
PRA	4.36	2.50	3.32	5.10	4.59	4.25	4.62	---	
GUA	2.76	2.17	2.14	3.27	3.62	2.87	3.35	4.19	---

The bayesian analysis of population structure obtained using the STRUCTURE software resulted in certain degree of population structure, with a K=2, suggesting the existence of two genetic cluster for *D. sturtevantii* (Fig. 2). The RDI population was the most differentiated from the others, with all members belonging to only one cluster (red in Fig. 2). All other populations had members allocated in both clusters, but with more samples into the second cluster (green in Fig. 2).

Fig. 2 Bar graph of the estimated membership coefficient, Q, for each of the 126 individuals. The most likely value of K was by STRUCTURE was two. Each genotype is represented by a vertical bar, and the colored segments represent the proportion of Q in each of the two clusters (red and green). The data are an average of ten independent runs.



The Neighbor-joining analysis resulted in four groups (Fig. 3): one with RDI (SC) again being the most differentiated population together with SDC (SP) and PIR (SC); the second group with the interior woodland São Paulo state populations, MAT and NGR, clustered with AGU (SC); a third group with GUA (interior woodland PB) and PIC (SP); and the fourth with only PRA (BA). Pairwise F_{st} and Nei (1978) distances confirmed RDI as the most differentiated population, presenting the highest

values with the other populations (Figure 4a and 4b), and this population showed the lower within population genetic differentiation (Fig. 4b). The lowest Nei's genetic distance and differentiation were obtained between MAT and NGR (clearer blue and green, respectively, in Fig. 4b). AGU with MAT and NGR also showed to be one of the lowest differentiation (clearer green in Fig. 4b)

Fig. 3 Neighbor-joining grouping among populations of *D. sturtevantii* using Nei's genetic distance (1978). Red: populations that belong to the South region - AGU: Aguaí, RDI: Ribeirão da Ilha and PIR: Piraí; Blue: populations belonging to the Southeast region - MAT: Matão, NGR: Nova Granada, SDC: Serra da Cantareira and PIC: Picinguaba; Green: populations belonging to the Northeast region - PRA: Pratigi and GUA: Guaribas.

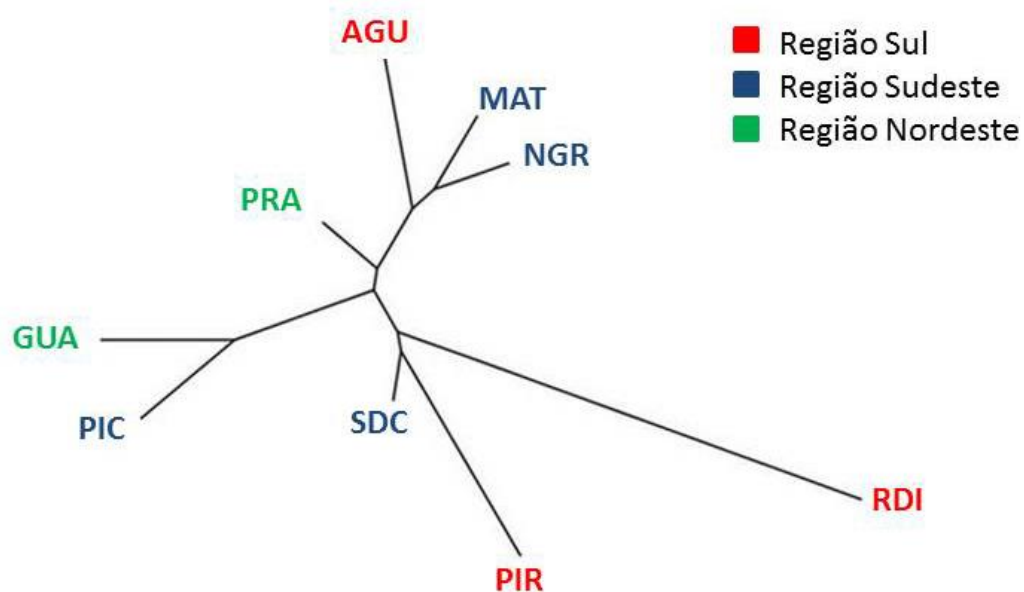
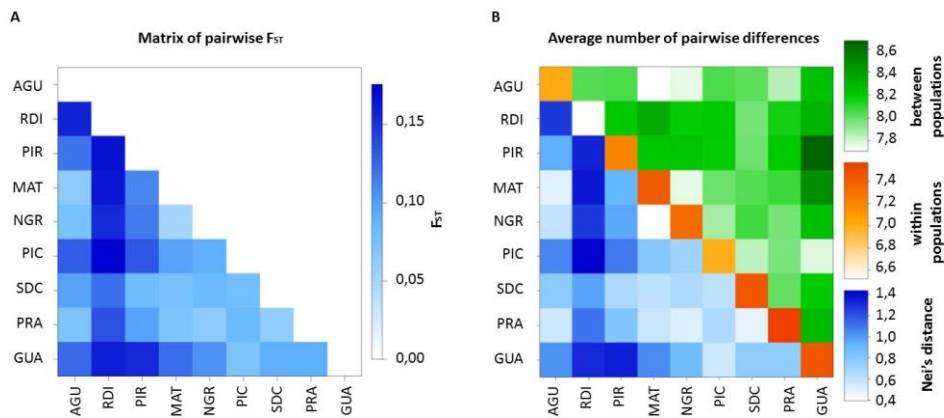


Fig. 4 Pairwise F_{ST} values. A: Graph of the coefficient of differentiation coupled with F_{ST} showing the genetic differentiation, indicating in dark blue the greatest genetic differentiation among the RDI population with the other populations; B: Graph

illustrating population pair-wise in relation to Nei distance (blue), genetic differentiation between individuals within the population (orange) and between populations (green). The clearer, the less genetic differentiation.



Discussion

The populations of *D. surtevantii* analyzed showed high polymorphism and similar allelic diversity for the eleven microsatellites. This microsatellite diversity in populations of this species is consistent with other genetic markers, such as chromosomal inversions and esterases loci (Knapp, 1953; Kobayashi; Bicudo, 1997; Nascimento; Bicudo, 2002; Bernardo and Bicudo, 2009), which presented higher polymorphism than any other species of *saltans* group.

D. surtevantii populations showed high heterozygote deficiency ($F_{is} = 0.5250$), which could be caused by one or a set of factors: null alleles, Wahlund effect, inbreeding or demographic processes (Shoemaker; Jaenike, 1997, Moraes; Sene, 2002, Hurtado et al., 2004, Markow; O'Grady, 2008). Microsatellite diversity detected in *D. surtevantii* populations ($H_o = 0.3132$) was similar to those found in Brazilian populations of *Drosophila* endemic species from Atlantic Forest and opened xerophytic areas (around 0.36, Moraes; Sene, 2007; Silva et al., 2015; Zorzato, 2015), indicating that the environment probably have the same effect in observed heterozygosity average of different species. One exception is *Drosophila antonietae*, a cactophilic species that occurs in areas with cactus in fragments of Atlantic forest. This species has lower microsatellite diversity ($H_o = 0.2251$, Machado et al., 2010) compared to other species, probably because it is under the action of another limiting factor, the association with a suboptimal host (Soto et al., 2007).

SDC population stands out for presenting the highest H_o value (0.39). This population is located in the Paulistano Plateau, an area of great extension (64,800 ha) and higher altitude (1,215 m) when compared to the others. The region of SDC covers the municipalities of São Paulo, Guarulhos, Mairiporã and Caieiras, it is of great ecological importance for the State, because is considered the Biosphere Reserve of the Green belt of the city of São Paulo, with 7,916.52 hectares of Atlantic Forest. Higher genetic diversity of SDC population may be reflecting the ecological and climatic characteristics of this region, with high humidity favoring the occurrence of *D. sturtevantii*.

The GUA population was collected in the Guaribas Biological Reserve, which is located on the border of Caatinga, and is one of the largest areas of environmental preservation of Atlantic Forest (IBAMA, 2003). However, besides high conservation degree of this area, and on the contrary of SDC, GUA presented the lowest microsatellite diversity ($H_o = 0.21$). Our data show that the low level of heterozygosity could be attributed to a recent population bottleneck. A population that undergoes a numerical decrease and hence a bottleneck tends to decrease allelic diversity faster than heterozygosity (Cornuet; Luikart, 1996; Piry et al., 1999; Templeton, 2011). In fact, a fire recently consumed the vegetation of this area (C. Rohde, pers. Com.). Certainly, this incident may have had an impact on the local fauna, including *D. sturtevantii*, and could be the cause of the observed bottleneck in GUA.

A moderate populational structure was detected in *D. sturtevantii* ($F_{st} = 0.0877$), although not related with geographic distance ($r = 0.0647$; $p = 0.4850$). The Bayesian, Neighbor-Joining and genetic distances (F_{st} and Nei) analyses highlighted the isolation of RDI form others populations. RDI population is insular, thus its differentiation could be explained by the geographic isolation from the other continental populations, and/or also in consequence of founder effect. Besides the limited capacity of dispersion of drosophilids (Dobzhansky; Powell, 1974), a few members of continental *D. sturtevantii* population must have colonized the island by antropic action, with individulas being taken along with some host plant. *Drosophila* specimens colonization of islands by human means is rather common than unusual. For example, *D. sechellia* migrated from Silhouette Island to the island of Mahé (about 20 km far from each other), in Seychelles (African continent), because of its association with the plant *Morinda citrifolia*, used by human population as medicinal

and also in fishing activities (Louis; David, 1986; Jones, 2005; Lachaise; Silvain, 2004; Legrand et al., 2009; Legrand et al., 2011).

The higher rates of gene flow (5.50) were detected between the closest genetic (0.2591) and geographic (140 km) population, MAT and NGR, as predicted by isolation by distance model (Wright, 1943). The genetic identity of these populations, however, is not necessarily caused by recent gene flow, since the populations are isolated by a distance far larger than drosophilid capacity of dispersion (Dobzhansky; Powell, 1974). This way, gene flow could be historical (before deforestation of Atlantic Forest), and the genetic similarity should be resulted of maintenance of ancestral polymorphism. Similarity of genetic variability of MAT and NGR could also be consequence of similar environment characteristics that also reflect in similar drosophilid diversity (Penariol, 2012): both areas are fragments of Seasonal Semidecidual Forest, immersed in a predominantly agricultural matrix (Kronka et al., 1993; Barros et al., 2017).

Neighbor-joining analysis did not group the population PRA (Pratigi/BA) of *D. sturtevantii* with any other population. It could be argued that the differentiation is consequence of a gap of sampling between Southeast and Northeast regions. However, GUA is the most apart population of Northeast and, even under bottleneck effect, was grouped with Southeast populations. The middle portion of Bahia, where is PRA population, is an important divisor of areas due to rivers barriers: Jequitinhonha River valley (South), Bay of Todos os Santos (East), and São Francisco River (North and West) (Müller, 1973; Bates et al., 1998; Carnaval; Moritz, 2008; Silva, 2012). This geography position of PRA may have allowed the isolation observed on Neighbor-joining analysis.

The different phytophysiognomies of the Atlantic Forest probably are not responsible for the genetic variability distribution of *D. sturtevantii* populations. The cohesion found among *D. sturtevantii*, regardless geographic distance, and in opposition of other markers, may be due to maintenance of ancestral polymorphism. The genetic identity between the closest geographic population analyzed (MAT and NGR) reinforces historical gene flow, prior to its habitat fragmentation, and the maintenance of genetic similarity could be due to equivalent environment conditions. However, a pair of populations (RDI and PRA) must have been isolated prior to intense fragmentation of Atlantic Forest, because of water barriers, resulting in more accentuated genetic differentiation.

Conclusion

The populational characterization of *D. sturtevantii* carried out with species-specific microsatellites developed for this species, was efficient to detect the level of population structure, gene flow events and genetic bottleneck. Microsatellites loci were also efficient to infer the association of genetic diversity with some geographic barriers and fragmentation of the Atlantic forest biome.

Abbreviations

AGU: Aguaí; AMOVA: Analysis of Molecular Variance; GUA: Guaribas; K: number of clusters; MAT: Matão; MCMC: Markov Chain Monte Carlo; NGR: Nova Granada; PCR: Polymerase chain reaction; PIC: Picinguaba; PIR: Piraí; PRA: Pratigi; RDI: Ribeirão da Ilha; SDC: Serra da Cantareira; UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; UNICENTRO: Universidade Estadual do Centro-Oeste

Acknowledgments

To Dr. Daniela De Toni, Hermes José Schmitz and Claudia Rodhe, for providing some strains of *D. sturtevantii*. The members of the Laboratory of Genetics, Ecology and Evolution of *Drosophila* (IBILCE/UNESP) for collaboration in the collections and Doctoral students Samara Videira Zorzato and Cláudia Gobatto, for the collaboration to carry out some analysis. To Prof. Luciana P. B. Machado for critical reading of the manuscript. To FAPESP for the financial support (processes number 2014 / 14059-0, 2015 / 17579-7, 2017 / 05344-0).

References

- Barros AB, Menezes FA, Falconi JR, Giovanelli JGR. Fauna de répteis dos remanescentes florestais e cultivos agrícolas da Fazenda Cambuhy, municípios de Matão, Nova Europa e Tabatinga, região Noroeste do estado de São Paulo. *Biotemas*. 2017; 30: 79-90.
- Bates JM, Hackett SJ, Cracraft J. Area-relationships in the Neotropical lowlands: na hypothesis based on raw distributions of Passerine birds. *J Biogeogr*. 1998; 25: 783-793.
- Bernardo AA, Bicudo HEMC. Variability of esterase patterns in adult flies of the *saltans* species group of *Drosophila* (subgenus *Sophophora*). *Genetics*. 2009; 137(1): 111–24.

- Bicudo HEMC. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV. The *sturtevanti* subgroup. *Braz J Genet*. 1979; 4(2): 247–258.
- Carnaval AC, Moritz C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J Biogeogr*. 2008; 35: 1187 – 1201.
- Cornuet JM, Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996; 144(4): 2001–2014.
- Dobzhansky T, Powell JR. Rates of dispersal of *Drosophila pseudoobscura* and its relatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1974; 187(1088): 281–298.
- Dobzhansky TH. Experiments on sexual isolation in *Drosophila*. III. Geographic strains of *Drosophila sturtevanti*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1944; 30(11): 335-339
- Earl DA, Vonholdt BM. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour*. 2012; 4: 359-361.
- Excoffier L, Lischer LHE. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010; 10: 564-567.
- Franknam R. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*. 1997; 78(3): 311-27.
- Freire-Maia N, Pavan C. Introdução ao estudo de *Drosophila*. *Cultus*. 1949; 5: 71.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A. Geneland: A computer package for landscape genetics. *Mol Ecol Notes*. 2005; 5: 712-715.
- Hosaki-Kobayashi MK, Bicudo HEMC. Productivity in mass crosses of *Drosophila sturtevanti*: A comparative study of laboratory stocks and recently collected flies. *Braz J Genet*. 1994; 17(4): 393-399.
- Hurtado LA, Erez T, Castrezana S, Markow TA. Contrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric Sonoran Desert cactophilic *Drosophila*. *Mol Ecol*. 2004; 13: 1365-1375.
- Ibama. Plano de Manejo, Fase 2, da Reserva Biológica Guaribas. 2003. http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/rebio_guaribas.pdf. Accessed 21 may 2017.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 1993. Mapa de vegetação do Brasil. Rio de Janeiro, IBGE. Available from: <<http://mapas.sosma.org.br/>>
- Inpe. Atlas dos remanescentes florestais de Mata Atlântica. Período 2000-2005. 2014. https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2014/05/atlas_2012-2013_relatorio_tecnico_20141.pdf. Accessed 21 may 2017.

- Jones CD. The genetics of adaptation in *Drosophila sechellia*. *Genetic*. 2005;123:137-145.
- Knapp EP. Polimorfismo cromossômico em populações naturais de *Drosophila sturtevantii* Duda. Ph. D. Thesis, University of São Paulo. 1953.
- Kobayashi MKH, Bicudo HEMD. Inversion polymorphism in laboratory strains and natural samples of *Drosophila sturtevantii* (saltans group, sturtevantii subgroup). *Cytobios*. 1997; 89(356): 7-20.
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NN, Mayrose I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour*. 2015; 15(5): 1179–1191.
- Kronka FJN, Matsukuma CK, Nalon MA, Del Cali IH, Rossi M, Mattos IFA, Shinike MS, Pontinhas AAS. Inventário florestal do estado de São Paulo. 1rd ed. Instituto Florestal; 1993.
- Lachaise D, Silvain JF. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* paleogeographic riddle. *Genetic*. 2004; 120: 17-39.
- Legrand D, Tenaillon MI, Matyot P, Gerlach J, Lachaise D, Cariou M-L. Species-wide genetic variation and demographic history of *Drosophila sechellia*, a species lacking population structure. *Genetic*. 2009; 182: 1197–1206.
- Legrand D, Vautrin D, Lachaise D, Cariou ML. Microsatellite variation suggests a recent fine-scale population structure of *Drosophila sechellia*, a species endemic of the Seychelles archipelago. *Genetic*. 2011; 139 (7): 909-19.
- Lewis PO, Zaykin D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data, version 1.0 (d16c). 2001. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Accessed 29 may 2017.
- Louis J, David JR. Ecological specialization in the *Drosophila melanogaster* species subgroup: a case study of *D. sechellia*. *Acta Oecol*. 1986; 7: 215-229.
- Machado LPB, Mateus RP, Sene FM, Manfrin MH. Microsatellite allele sequencing in population analyses of the South American cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). *Biol J Linn Soc*. 2010; 100: 573-584.
- Magalhães LE. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of saltans group of *Drosophila*, with description of four new species. *Univ Tex Publ*. 1962; 6205: 135-154.
- Markow TA, O'Grady, P. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Funct Ecol*. 2008; 22: 747-759.

- Markow TA, Castrezana S. Dispersal in cactophilic *Drosophila*. *Oikos*. 2000; 89: 378–386.
- Marques JS. Epífitas vasculares em diferentes estágios sucessionais de um fragmento urbano de Floresta Estacional Semidecidual. Dissertação da Pós Graduação em Ecologia. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2016; 1-80.
- Miller MP. Tools for population genetic analyses - TFPGA - 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>. Accessed 15 Jan 2017.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hofmann M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreaux J, Fonseca GAB. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Cemex; 2004.
- Moraes EM, Sene FM. Breeding structure in an isolated cactophilic *Drosophila* population from sandstone table hill. *J Zool Syst Evol Res*. 2002; 40: 123-128.
- Mourão CA, Bicudo HEMC. Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo “*saltans*” (*Drosophilidae*, *Diptera*). *Pap Avulsos Zool*. 1967; 20: 123-134.
- Müller P. The dispersal centers of terrestrial vertebrates in the Neotropical realm. The Hague: Dr. W. Junk B. V. Publishers; 1973.
- Nascimento AP, Bicudo HEMC. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). *Genetic*. 2002; 114: 41–51.
- Nei M. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic*. 1978; 89: 583-590.
- Novicic ZK, Jelic M, Jovanovic M, Dimitrijevic D, Veselinovic MS, Stamenkovic-Rodak M, Andjelkovic M. Microsatellite variability of *Drosophila subobscura* populations from the central Balkans. *Evol Ecol Res*. 2011; 13: 479-494.
- Penariol L, Bicudo HEMC, Madi-Ravazzi L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. *Biota Neotrop*. 2008;8(2): 47-51.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered*. 1999; 90: 502-503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155:945-959.
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M, Margis R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Divers Distributions*. 2004; 10: 201-210.

- Sanguinetti C, Dias Neto E, Simpson AJG. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994; 17: 209-214.
- Shoemaker DD, Jaenike J. Habitat continuity and the genetic structure of *Drosophila* populations. *Evolution*. 1997; 51: 1326-1332.
- Silva SM, Moraes-Barros N, Ribas CC, Ferrand N, Morgante JS. Divide to conquer: a complex pattern of biodiversity depicted by vertebrate components in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc*. 2012; 107: 39-55.
- Silva DC, Machado LPB, Mateus RP. Migration rate and genetic diversity of two *Drosophila maculifrons* (Duda, 1927) populations from Highland Araucaria Forest Fragments in Southern Brazil. *Braz J Biol*. 2015; 75(1): 254-255.
- Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ, Hasson ER. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evol Biol*. 2007; 7: 77-87.
- Souza TAJ, Noll FB, Bicudo HEMDC, Madi-Ravazzi L. Scanning electron microscopy of male terminalia and its application to species recognition and phylogenetic reconstruction in the *Drosophila saltans* group. *Plos One*. 2014; 9(6): 1-12.
- Spencer J, Heed WB. Dispersal of *Drosophila*: The Effect of Baiting on the Behavior and Distribution of Natural Populations. *The American Naturalist*. 1975; 109 (966): 207-216.
- Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota MM, Bedê LC. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*; 2005.
- Templeton AR. *Genética de populações e Teoria Microevolutiva*. S B G; 2011.
- Templeton AR, Robertson RJ, Brisson J, Strasburg J. Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. 2001, 98(10): 5426–5432.
- Vilela CR, Bächli G. Taxonomics studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt Schweiz Entomol*. 1990; 63: 1-332.
- Wallace B. On the dispersal of *Drosophila*. – *Am. Nat*. 1966; 100: 551–563.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton. 1999. <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>. Accessed 15 jan 2017.
- Zorzato SV. Análise da estrutura genética populacional de *Drosophila ornatifrons* (Diptera; Drosophilidae). Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva), Universidade Estadual do Centro – Oeste. 2015.

Funding

This work was supported by the following funding sources: CAPES (scholarship to BMT); FAPESP (Proc. 2014/14059-0, 2015/17579-7, 2017/05344-0): financial support. All these funding bodies were essential for the financing of samples collection and laboratory procedures.

Authors' contributions

BMT collected the specimens; BMT and RPM generated and analyzed the results and BMT, RPM interpreted the results and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author information

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica, sua aplicação em estudos de monitoramento ambiental

CAPÍTULO IV

Normas da ABNT

Biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica, sua aplicação em estudos de monitoramento ambiental

INTRODUÇÃO

A conservação da biodiversidade representa um dos grandes desafios da atualidade nas pesquisas biológicas. A destruição exponencial dos habitats e suas sérias consequências diretas e indiretas para os organismos, reduzindo os tamanhos populacionais e a sua diversidade genética a níveis que podem levá-los a extinção, tem proporcionado um aumento crescente de trabalhos nessa área. A Mata Atlântica, por exemplo, localizada na costa leste da América do Sul, formada por um conjunto complexo de tipos florestais, teve seu bioma reduzido de 11 a 16% de sua extensão original (MITTERMEIER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009). Isso é decorrente principalmente da história de sua ocupação desde o século XVI e que atualmente concentra os grandes centros urbanos brasileiros (MMA, 2000). A maior parte dos remanescentes florestais desse bioma encontra-se subdividido em pequenos fragmentos, isolados, com diferentes níveis de perturbação, pouco estudados e protegidos.

Dentre os organismos modelos escolhidos para a concentração da pesquisa biológica, o mais estudado depois do homem é *Drosophila melanogaster* (POWELL, 1997) e, em um senso mais amplo, o gênero *Drosophila*. Este gênero inclui mais de 1.500 espécies descritas distribuídas por todas as regiões do mundo, exceto nas regiões polares. No Brasil, foram identificadas 113 espécies, destas, 93 têm ocorrência no Estado de São Paulo (TIDON-SKLORZ; SENE, 1999).

Em ambientes naturais, moscas do gênero *Drosophila* são adequadas para o estudo de flutuações de populações por serem insetos altamente sensíveis a pequenas modificações do ambiente e isto reflete no tamanho das populações naturais e também na diversidade de espécies ocupando um determinado habitat. Em áreas tropicais, incluindo grande parte do território brasileiro, as mudanças no ambiente são causadas pela alternância de duas estações bem definidas, seca e úmida (DOBZHANSKY; PAVAN, 1950).

Estudos sobre a utilização de algumas espécies de drosofilídeos como bioindicadoras têm avançado nos últimos anos como uma proposta de inclusão em metodologias práticas e de baixo custo de monitoramento ambiental (PARSON, 1991; AVONDET et al, 2003; FERREIRA; TIDON, 2005; TORRES; MADI-RAVAZZI,

2006, MATA et al, 2008; ACURIO et al, 2010; BIZZO et al, 2010; PENARIOL et al, 2008; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013). A sensibilidade do gênero *Drosophila* em relação às variáveis abióticas e bióticas se reflete na dinâmica populacional desses organismos. Além disso, a característica cosmopolita do grupo (grande diversidade na maior parte dos ecossistemas terrestres) e a facilidade de coletar esses organismos no ambiente natural torna-o um excelente material para estudos ambientais (PARSON, 1991; FOOTE; CARSON, 2004).

Um marcador morfológico amplamente utilizado no gênero *Drosophila* é a terminália masculina. Em espécies de *Drosophila*, ela é formada por um conjunto de apêndices diversos que podem servir como elementos de diferenciação específica. O estudo comparativo desses elementos facilita ao sistemata o estabelecimento das relações entre grupos de espécies (BREUER & PAVAN, 1954). A grande diferenciação nos caracteres da genitália masculina sofrida pelas moscas nem sempre é acompanhada por igual diferenciação na morfologia do restante do corpo (VILELA, 1983). O edeago de insetos, que é o órgão copulador intromitente da genitália masculina (MAGGENTI et al., 2005), é uma das principais características diagnósticas para a identificação de espécies de *Drosophila*, sendo que as fêmeas desse gênero muitas vezes são indistinguíveis morfológicamente (VILELA, 1983).

Durante séculos, características morfológicas externas, comportamentais e a distribuição geográfica dos espécimes eram os únicos dados disponíveis aos taxonomistas, os quais descreviam e delimitavam as espécies de acordo com a observação destas características. Atualmente, este já não é mais o caso (HEY, 2001; COOK et al., 2010). No gênero *Drosophila*, bem como outros insetos, o edeago é um órgão importante para fins taxonômicos (SILVA & SENE, 1991; KULLIKOV et al., 2004; FRANCO et al., 2006).

Alguns parâmetros da comunidade de *Drosophila* como a riqueza de espécies e a abundância populacional, têm sido utilizados para avaliar vários problemas ambientais como, fragmentos de diferentes tamanhos (TIDON, 2006; PENARIOL, 2013), ambientes em vários estados de conservação (SILVA et al., 2005; MATEUS et al., 2006; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006, PENARIOL et al, 2008), efeitos de borda (PENARIOL et al, 2008; PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2013), proximidade de recurso hídrico (MEDEIROS, 2006) e, até mesmo, o aquecimento global (BALANYA et al., 2006). Este trabalho tem como objetivo fazer um levantamento da

biodiversidade de drosofilídeos em fragmentos remanescentes da Mata Atlântica em diferentes regiões geográficas da região sudeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas em 4 localidades indicadas na tabela 1: Matão/SP e Nova Granada/SP nas duas estações climáticas, estação quente e úmida e na estação fria e seca; Parque Estadual da Serra do Mar e Parque Estadual Serra da Cantareira somente na estação quente e chuvosa. Para a captura das moscas foram utilizadas armadilhas fechadas (Figura 1) contendo isca de banana nanica macerada com fermento biológico fresco (*Saccharomyces cerevisiae*). O desenho amostral para as coletas foi constituído por seis transectos (trilhas) separados um do outro entre 500 a 1000 metros. Estes transectos foram feitos perpendicularmente da borda para o interior da mata, contendo dez armadilhas por transecto, distante uma da outra a cada 60 metros. Em cada ponto da trilha (60 metros, 120 metros, 180 metros, 240 metros e 300 metros) foram colocadas duas armadilhas, uma suspensa a 1,5 metros do solo e outra no dossel das copas das árvores, aproximadamente 4 metros (Figura 2). O recolhimento das armadilhas foi realizado após três dias da colocação das mesmas. As moscas coletadas foram transferidas para garrafas contendo meio de cultura padrão, identificadas por ponto, por armadilha e por transecto. Posteriormente, foram realizadas as triagens e as identificações das moscas por edeago. A preparação dos edeagos para as análises foi realizada a partir de modificações da técnica descrita por Kaneshiro (1969). Os dois últimos tergitos do abdômen de cada macho foram extraídos com uma microagulha e transferidos a um microtubo com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% e deixado em repouso por 12 horas. Após esse período a peça foi lavada em água destilada e colocada em outro microtubo contendo o corante diluído de Gage (quatro partes de fucsina ácida para uma parte de ácido acético glacial), também repousando por aproximadamente 12 horas. A peça foi lavada novamente em água e colocada em uma lâmina escavada contendo glicerina para a separação dos demais apêndices (*hipandrium* e *epandrium*), deixando somente o edeago.

Outro dado importante refere-se às estações do ano em que as coletas foram realizadas. Com isso, ao estipularmos a sazonalidade, duas estações do ano foram prontamente definidas, em especial, para a análise de como as estações do ano (o

clima) interferem na captura dos drosofilídeos e, conseqüentemente, na abundância e riqueza das espécies coletadas. As estações definidas foram: estação quente e úmida (entre os meses de dezembro a março) e estação fria e seca (entre os meses de junho a agosto).

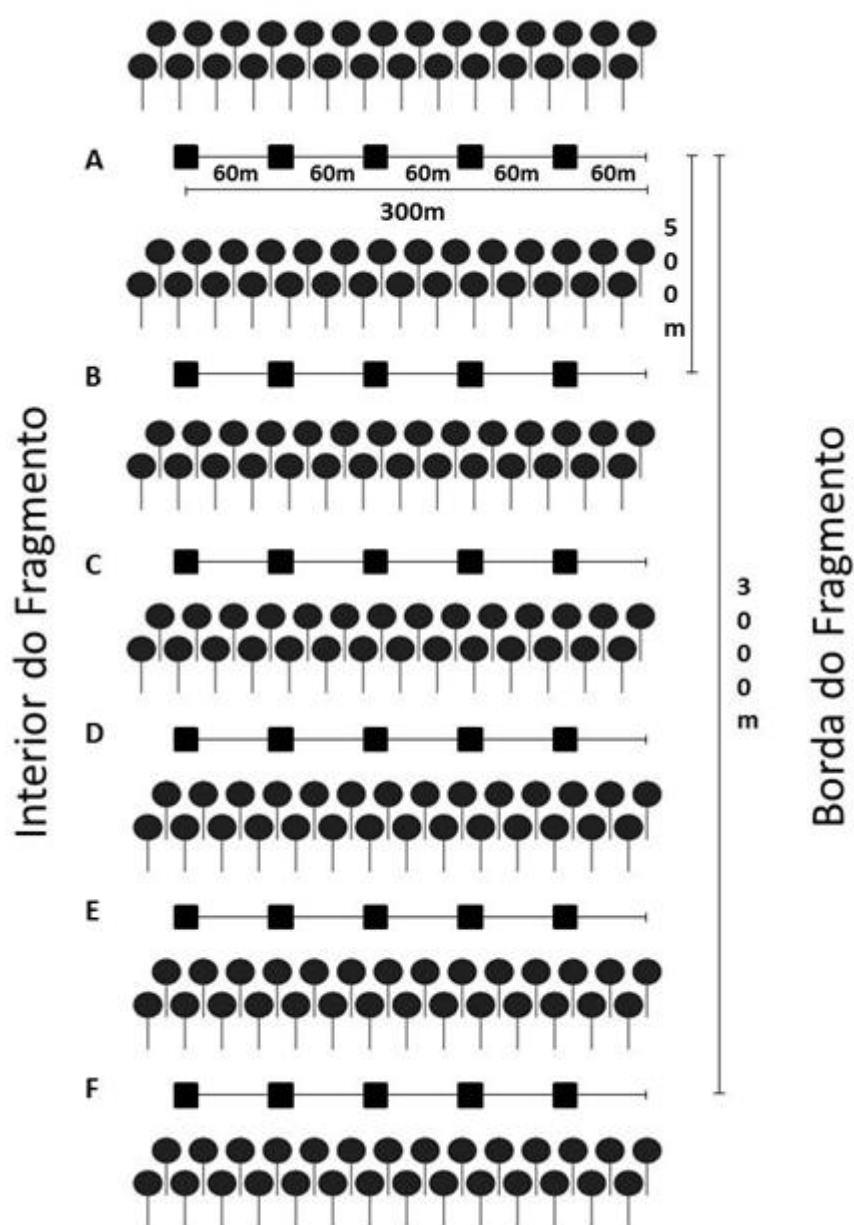
Tabela 1. Siglas, localidades amostradas e coordenada geográfica, tamanho da área em hectare.

Siglas	Localidades	Coordenadas	Área (ha)
NGR	Fazenda São João, Nova Granada/SP	20°58'S, 49°30'O	1.359,6
MAT	Fazenda Cambuhy, Matão/SP	21°61'S, 48°53'O	2.189,6
PIC	Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, Ubatuba/SP	23°96'S, 46°64'O	47.500
SDC	Parque Estadual Serra da Cantareira, São Paulo/SP	23°45'S, 46°63'O	64.800

Figura 1. Armadilha fechada para captura dos drosofilídeos segundo Medeiros e Klackzo (1999) com modificações por Penariol et al, 2008 (imagem extraída desta última referência).



Figura 2. Desenho amostral dos transectos (A-F) em que as armadilhas para a captura dos drosofilídeos foram colocadas a cada 60m a partir da borda do fragmento. Distância em metros.



A identificação dos drosofilídeos foi realizada com o auxílio de chaves de identificação específica para os grupos das espécies em análise (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949; VILELA; BÄCHLI, 1990; SOUZA et al, 2014). Os machos foram identificados por edeagos e, também, foram estabelecidas isolinhagens das fêmeas de determinados grupos com espécies crípticas (grupos: *saltans*, *cardini*, *repleta*, *tripunctata*, *guaramunu*, *guarani* entre outros) para a identificação das espécies por

meio da terminália dos machos F1. A técnica de preparação dos edeagos foi feita segundo a técnica de Kaneshiro (1969), com modificações (PENARIOL et al, 2008).

Tais dados foram analisados de forma descritiva a partir da elaboração de tabelas e gráficos, também foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Wiener (KREBS, 1999), de equitabilidade de Pielou e de dominância de Berger-Parkin (ODUM, 1995) elaborados no programa Excel® 7.0 para Microsoft windows®. A significância de cada transecto foi realizada através do Qui-Quadrado para a comparação dos drosofilídeos coletados nas regiões por meio do programa BioEstat 5.3.

RESULTADOS

Biodiversidade das áreas em estudo

Foram coletados, no total, 19.685 drosofilídeos, 4.515 na área de Picinguaba/SP; 4.016 na área de Serra da Cantareira/SP, sendo 71% fêmeas; sendo 68% fêmeas; 5.878 na área de Matão/SP, sendo 65% fêmeas e 5.276 drosofilídeos na área de Nova Granada/SP, sendo 75% fêmeas. Estes resultados em Matão (MAT) e Nova Granada (NGR) são referentes a duas coletas em cada região, nas diferentes condições climáticas, na estação quente e úmida (Q/U) e na estação fria e seca (F/S), e Picinguaba (PIC) e Serra da Cantareira (SDC) as coletas foram realizadas somente na estação quente e úmida. Foi utilizado uma padronização em todas as coletas em relação a disposição (posicionamento) das armadilhas (suspensas e dossel) e sua distribuição. A identificação das espécies baseou-se, principalmente, na análise da terminália dos machos. Assim, os resultados apresentados referem-se aos machos identificados.

Ocorrência das espécies de drosofilídeos

Um total de 5.886 machos de drosofilídeos foram identificados e detectado 43 espécies já descritas e seis espécies não identificadas, provavelmente, não descritas (Tabela 2/Anexo 1). Dessas espécies identificadas, 30 foram encontradas em SDC, 26 espécies em PIC, 24 espécies em MAT (20 espécies no período Q/U e 15 no período F/S) e 17 espécies em NGR (16 espécies em ambas as estações). Foram coletadas nove espécies em comum para as quatro áreas, sendo essas: *D.*

polymorpha, *D. guaru*, *D. immigrans*, *D. mercatorum*, *D. simulans*, *D. prosaltans*, *D. sturtevantii*, *D. willistoni* e *S. latifasciaeformis*. Em SDC, foram coletadas 13 espécies que não foram coletadas nas demais áreas, em PIC foram coletadas sete espécies, em MAT foram coletadas 5 espécies diferentes que as demais áreas e NGR não teve nenhuma espécie exclusiva do local.

Tabela 02. Número total de machos por espécie e localidade. SDC: Serra da Cantareira; PIC: Picinguaba; MAT: Matão; NGR: Nova Granada; Q/U: Quente e úmida e F/S: Frio e seco.

Subgênero	Grupo	Espécies	SDC	PIC	MAT		NGR	
			Q/U	Q/U	Q/U	F/S	Q/U	F/S
<i>Dorsilopha</i>	<i>Busckii</i>	<i>D. busckii</i>			1			
<i>Drosophila</i>	<i>Annulimana</i>	<i>D. annulimana</i>			1		1	
		<i>D. ararama</i>	1			1		1
	<i>Canalineia</i>	<i>D. albomarginata</i>		1				
	<i>Cardini</i>	<i>D. neocardini</i>	1	8				
		<i>D. polymorpha</i>	26	2	9	8	1	22
	<i>Guaramunu</i>	<i>D. grisolineata</i>	1					
	<i>Guarani</i>	<i>D. guaraja</i>	1					
		<i>D. guaru</i>	2	2	13	22	1	6
		<i>D. ornatifrons</i>	1					
	<i>Immigrans</i>	<i>D. immigrans</i>	5	4		112	2	
		<i>D. nasuta</i>	2	2				
	<i>pallidipennis</i>	<i>D. pallidipennis</i>	1					
	<i>Repleta</i>	<i>D. coroica</i>			16	3		
		<i>D. ellison</i>		7				
		<i>D. hydei</i>	3					
		<i>D. ivai</i>			4			
		<i>D. mercatorum</i>	5	1	4	92	18	98
		<i>D. nigricruria</i>	2					
		<i>D. onca</i>	6		5	2	1	1
		<i>D. paranaensis</i>			8	15	7	54
		<i>D. pictilis</i>		2				
		<i>D. pictura</i>	1					
	<i>D. senei</i>	2						
<i>Sophophora</i>	<i>tripunctata</i>	<i>D. mediopicta</i>	1					
		<i>D. paraguayensis</i>			2			
	<i>desagrupado</i>	<i>D. caponei</i>	1					
	<i>melanogaster</i>	<i>D. ananassae</i>		67	1			
		<i>D. malerkotliana</i>		50		1	91	11
		<i>D. melanogaster</i>		3	30			7
	<i>D. simulans</i>	116	2	12	745	1	8	

		<i>D. suzukii</i>	1					
	<i>Saltans</i>	<i>D. austrosaltans</i>		1	9		24	6
		<i>D. neoelliptica</i>	17	7				
		<i>D. neosaltans</i>		4				
		<i>D. prosaltans</i>	9	5	18	5	14	1
		<i>D. pseudosaltans</i>	1					
		<i>D. sturtevanti</i>	17	195	565	23	717	47
	<i>Willistoni</i>	<i>D. capricorni</i>	25	1				
		<i>D. nebulosa</i>		4		1	4	2
		<i>D. willistoni</i>	877	1025	19	192	9	19
<i>Scaptodrosophila</i>		<i>latifasciaeformis</i>	<i>S. latifasciaeformis</i>	13	9	6		99
<i>Zaprionus</i>	<i>Armatus</i>	<i>Z. indianus</i>	13		18	23	43	1
		<i>D. sp1</i>			3			
		<i>D. sp2</i>	1	1				
		<i>D. sp3</i>	1					
		<i>D. sp4</i>		4				
		<i>D. sp 5</i>		11				
		<i>D. sp 6</i>		1				
			Total de indivíduos	1153	1419	744	1245	1033
		Total de espécies			20	15	16	16
			30	26	24		17	

Área 1 – Fazenda Cambuhy/ Matão/SP

Esta área está situada na fazenda Cambuhy, na cidade de Matão/SP. Neste local, foram coletados o total de 5.878 drosofilídeos. Em janeiro, foram capturados 2.774 indivíduos (71,7% fêmeas; 28,3% machos) e em agosto, foram obtidos 3.104 indivíduos (59,5% fêmeas; 40,5% machos). Observamos, portanto, na abundância dos drosofilídeos coletados nas diferentes estações: no mês de janeiro (estação Q/U) 47,2%; no mês de agosto (estação F/S) 52,8%. Do total de drosofilídeos coletados foram identificados 22 espécies do gênero *Drosophila*, mais as espécies *Z. indianus* e *S. latifasciaeformis* (Tabela 3). Um número significativo de fêmeas crípticas não pôde ser identificado, pois não produziram prole (1.822 fêmeas, que equivalem a 47,34% do total de fêmeas capturadas).

- **Distribuição das espécies nas armadilhas suspensas e de dossel**

Como analisado para a área de MAT, aqui também as espécies coletadas na armadilhas suspensas e de dossel foram distribuídas em quatro categorias: 1.

Espécies neotropicais; 2. Espécies invasoras; 3. *Z. indianus*; 4. *S. latifasciaeformis* (Tabela 4). Na estação Q/U, tanto nas armadilhas suspensas quanto nas armadilhas de dossel, estes diferentes grupos evidenciaram uma maior abundância das espécies neotropicais. Já na estação fria e seca, não foram coletadas *S. latifasciaeformis*. Outro achado interessante é que a proporção de espécies neotropicais (52,8%) e de espécies invasoras (46,2%) coletadas nas armadilhas suspensas foi semelhante (Teste G 1.0882; $p=0,2969$). Nas armadilhas de dossel, houve uma maior abundância das espécies invasoras (67%) e menor abundância das espécies neotropicais (33%).

- **Sazonalidade**

Durante a estação quente e úmida, a abundância de *D. sturtevanti* obtida foi acentuadamente maior do que o restante de drosofilídeos, dado observado também na área de NGR. Na estação F/S *D. simulans* foi a espécie mais abundante. As espécies de drosofilídeos mais abundantes no mês de janeiro, em ordem decrescente, foram: *D. sturtevanti* (565), *D. melanogaster* (30), *D. willistoni* (19), *Z. indianus* (18), *D. prosaltans* (17) e *D. coroica* (15). Houve predominância destas espécies na armadilha de dossel (60,8%). A armadilha suspensa teve um menor número de indivíduos coletados (39,2%). Dos indivíduos capturados, em agosto, as espécies mais abundantes foram: *D. simulans* (745), *D. willistoni* (192), *D. immigrans* (112) e *D. mercatorum* (92).

- **Abundância de drosofilídeos nos transectos**

Estação quente e úmida

D. sturtevanti foi a espécie mais dominante nos dois tipos de armadilhas: suspensa (83,9%); dossel (72,2%). Um dado interessante foi a maior porcentagem de indivíduos desta espécie no final do transecto, com diferença significativa tanto na armadilha suspensa quanto na armadilha de dossel (teste G = 29, 6110 e $p = 0,0001$; Teste-G = 26,5496; $p=0,0001$) (Figura 3).

Outras espécies também foram coletadas em abundância nas armadilhas suspensas, como: *D. melanogaster* (18), *D. guaru* (7) e *D. willistoni* (7). Estas espécies não foram capturadas nas últimas armadilhas dos transectos (300m). *D. melanogaster* foi encontrada em número/quantidade semelhante ao longo dos

transectos. Nos casos da *D. guaru* e da *D. willistoni*, percebe-se que, tais espécies, foram encontradas, principalmente, no início dos transectos. Portanto, o valor de p foi significativo para ambas as espécies, menos para a *D. melanogaster*. As espécies dominantes, além da *D. sturtevanti* (319), nas armadilhas de dossel, foram: *D. melanogaster* (18), *D. prosaltans* (14), *D. coroica* (14), *Z. indianus* (13) e *D. willistoni* (12). Foi observado também, durante os transectos, um padrão na distribuição da espécie *D. melanogaster*, com maior frequência, nas últimas armadilhas. Nas demais espécies – no caso, *D. prosaltans*, *D. coroica*, *Z. indianus*, e de *D. willistoni* – não houve valor significativo para o teste G, ou seja, as espécies citadas foram encontradas no decorrer dos transectos. Logo, tais espécies foram encontradas do início ao fim em quantidade proporcional ao esperado nas armadilhas de dossel (Figura 4/Tabela 5).

Estação fria e seca

Nas armadilhas suspensas foram coletadas as espécies: *D. simulans* (234), *D. willistoni* (110), *D. mercatorum* (73) e *D. immigrans* (45). Outra particularidade encontrada nas armadilhas suspensas foi o número crescente de indivíduos de *D. mercatorum* ao longo dos transectos – o inverso ocorrido com as demais espécies, que seguiram um padrão decrescente ao longo dos transectos. Já nas armadilhas de dossel, além das espécies *D. simulans* (511), *D. willistoni* (82), *D. immigrans* (67) e *D. mercatorum* (12), foi coletada *Z. indianus* (18). Nas armadilhas de dossel *D. willistoni* e *D. mercatorum* foi observado um maior número de indivíduos destas espécies nos últimos pontos dos transectos, o oposto ocorreu com as espécies *D. immigrans* e *Z. indianus*. Estas diferenças foram significativas para o valor p no teste-G (Figura 5/Tabela 5).

<i>Z. indianus</i>	8	5	19	13	27	18	11	5	9	18	20	23	47	41
<i>D. sp1 L35</i>	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
Grupo <i>repleta</i> *	13	1	41	6	54	7	136	1	111	6	247	7	301	14
Grupo <i>tripunctata</i> *	3	1	0	0	3	1	5	1	3	2	8	3	11	4
Espécies amarelas*	87	8	115	10	202	18	576	0	686	0	1262	0	1464	18
Espécies escuras*	6	0	28	13	34	13	2	1	2	0	4	1	38	14
Total	916	306	1075	477	1991	783	893	503	955	753	1848	1256	3839	2039

Tabela 4. Abundância dos grupos de drosofilídeos em armadilhas suspensas e de dossel, na mata Cambuhy, Matão/SP, em ambas estações climáticas.

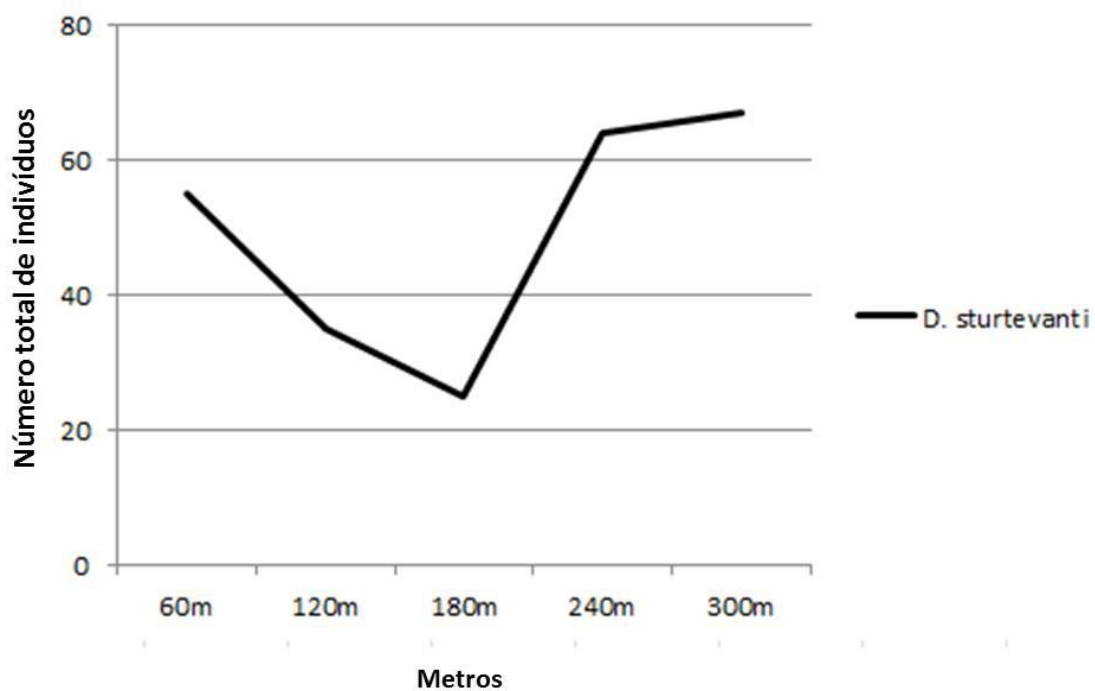
Estações	Grupos de Espécies	Suspensa	%	Dossel	%
Quente/Úmida	Neotropicais	285	91,6	443	91,5
	Invasoras	17	5,5	26	5,4
	<i>Z. indianus</i>	5	1,6	13	2,7
	<i>S. latifasciaeformis</i>	4	1,3	2	0,4
	Total	311	100	484	100
Fria/Seca	Neotropicais	267	48,4	234	27,6
	Invasoras	279	50,6	594	70,2
	<i>Z. indianus</i>	5	1	18	2,2
	<i>S. latifasciaeformis</i>	0	0	0	0
	Total	551	100	846	100
Total	Neotropicais	552	64	677	50,9
	Invasoras	296	34,4	620	46,6
	<i>Z. indianus</i>	10	1,2	31	2,3
	<i>S. latifasciaeformis</i>	4	0,4	2	0,2
	Total	862	100	1330	100

Tabela 5. Análise do teste-G e sua significância (p) dos grupos de drosofilídeos mais abundantes, nas armadilhas suspensas e armadilhas de dossel, no decorrer dos transectos (60m a 300m), da fazenda Cambuy, Matão/SP, nas estações quente e úmida e fria e seca. Em negrito p <0.05.

Estações	Armadilhas	Espécies	60m	120m	180m	240m	300m	Total	Teste-G	p	
Quente e úmida	Suspensa	<i>D. melanogaster</i>	2	2	6	2	0	12	8.6980	0.0691	
		<i>D. guaru</i>	5	0	0	2	0	7	18.5907	0.0009	
		<i>D. willistoni</i>	3	3	1	0	0	7	12.9991	0.0113	
		Total	10	5	7	4	0	26	19.3133	0.08	
	Dossel	<i>D. melanogaster</i>	2	0	7	1	8	18	17.0551	0.0019	
		<i>D. prosaltans</i>	2	8	1	2	2	15	8.6305	0.0710	
		<i>D. coroica</i>	3	3	2	0	6	14	8.5150	0.0744	
		<i>Z. indianus</i>	3	2	4	2	2	13	1.1565	0.8852	
		<i>D. willistoni</i>	4	5	1	0	2	12	8.8365	0.0653	
		Total	14	18	15	5	20	72	43.8387	0.0016	
Fria e seca	Suspensa	<i>D. simulans</i>	178	13	4	6	33	234	374.891	0.0001	
		<i>D. willistoni</i>	77	5	14	8	6	110	3	133.676	0.0001
		<i>D. mercatorum</i>	26	3	3	1	40	73	9	86.2856	0.0001
		<i>D. immigrans</i>	31	5	3	6	0	45	59.2652	0.0001	
		Total	312	26	24	21	79	462	142.183	0.0001	
	Dossel	<i>D. willistoni</i>	6	3	29	41	3	82	75.7464	0.0001	
		<i>D. immigrans</i>	4	32	3	25	3	67	59.2605	0.0001	
		<i>D. mercatorum</i>	1	5	2	10	1	19	14.18.8	0.0067	
		<i>Z. indianus</i>	10	1	0	5	2	18	6	18.8051	0.0003
		Total	21	41	34	81	9	186	97.7406	0.0001	

Figura 3 A-B. Número total de indivíduos de *D. sturtevantii*, espécie mais abundante, coletados na fazenda Cambuhy, Matão/SP, durante as estações quente e úmida, ao longo dos transectos.

A. Armadilha Suspensa



B. Armadilha Dossel

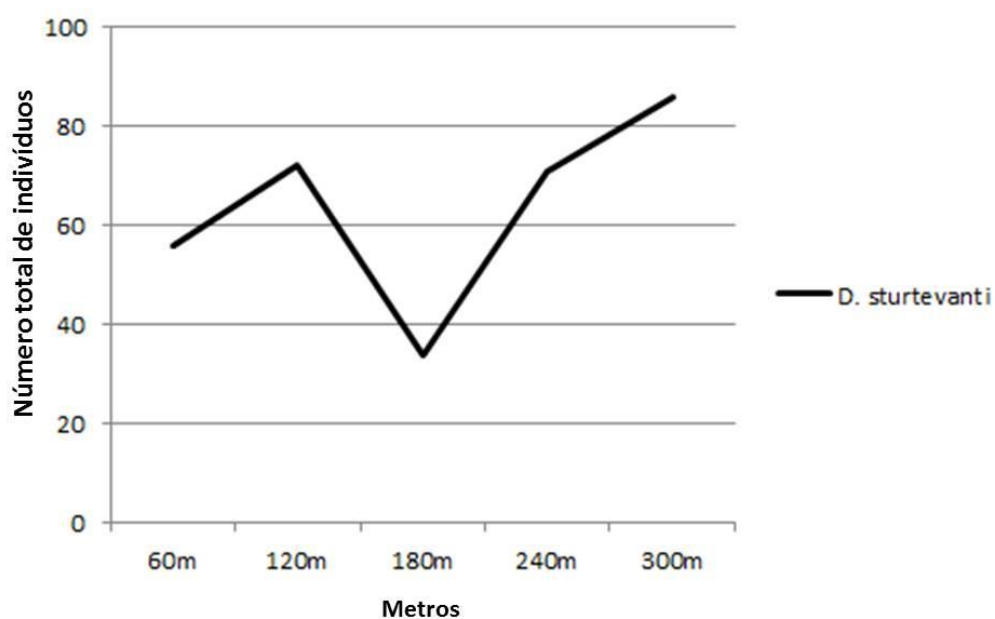
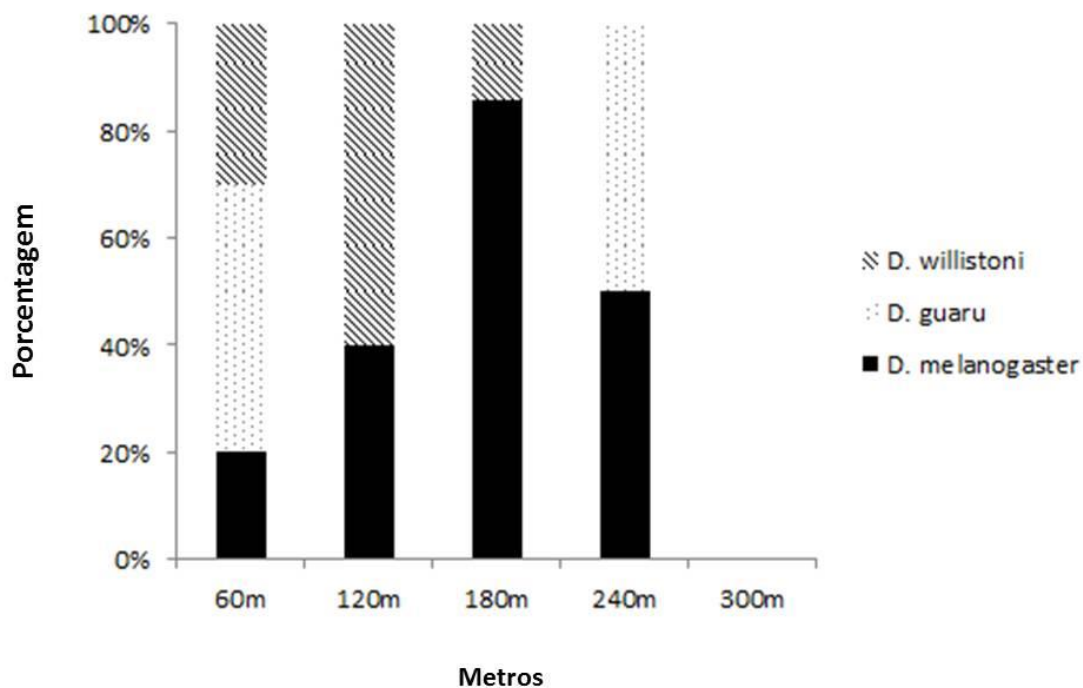


Figura 4 A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação Quente e úmida, na fazenda Cambuhy, Matão/SP.

A. Armadilha Suspensa



B. Armadilha de dossel

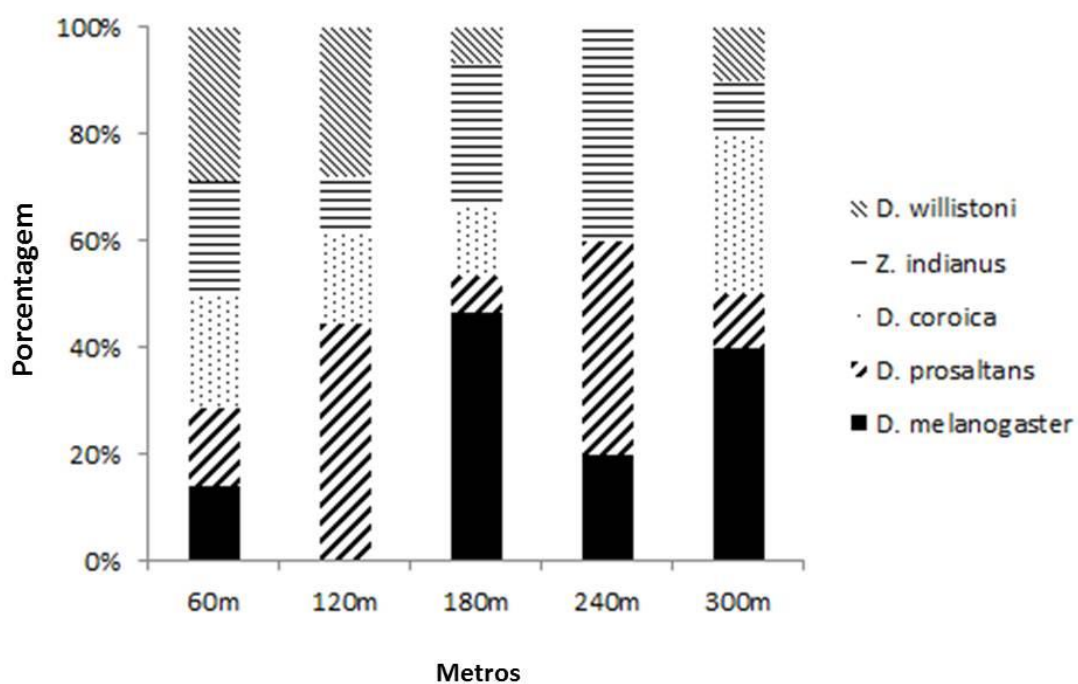
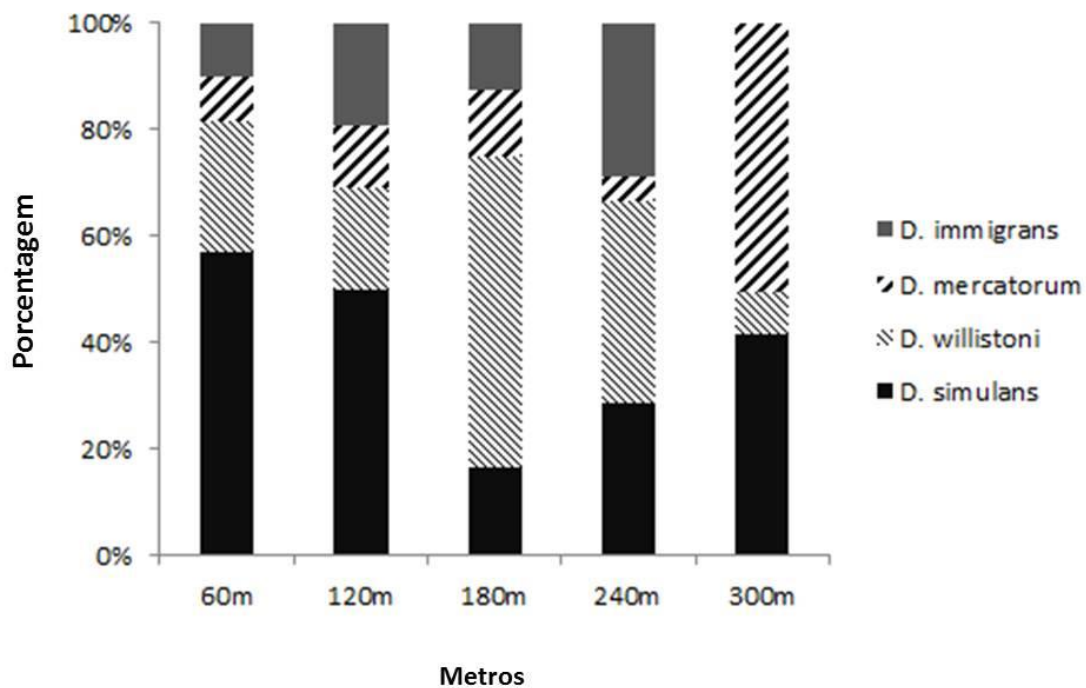
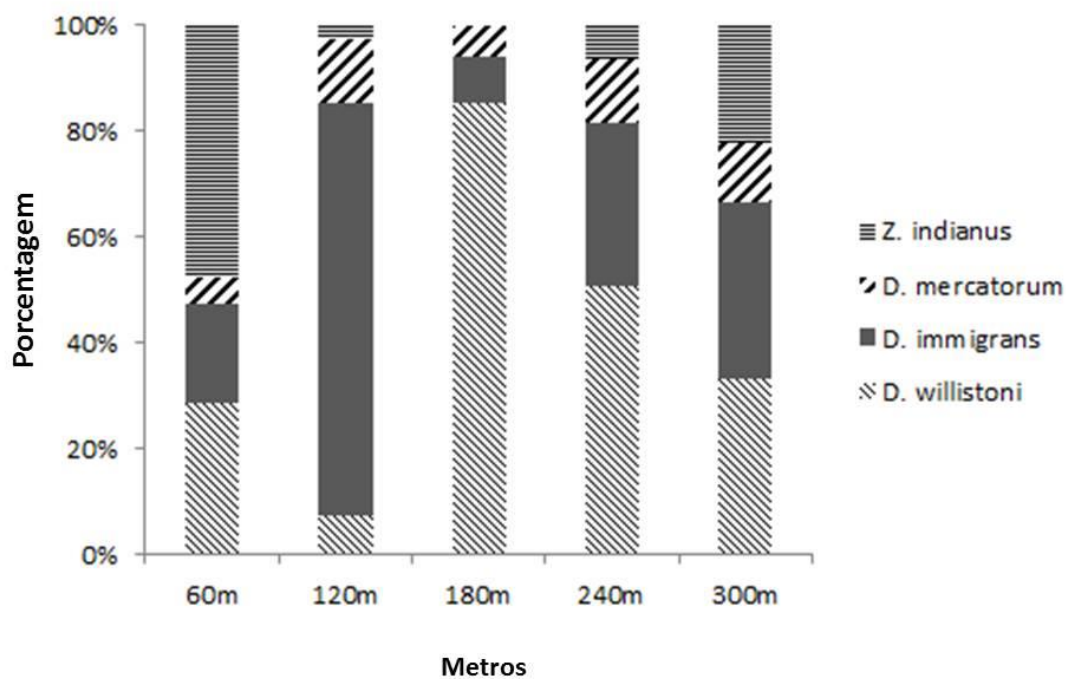


Figura 5 A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação fria e seca, na fazenda Cambuhy, Matão/SP.

A. Armadilha Suspensa



B. Armadilha de dossel



Área 2 - Fazenda São João/ Nova Granada/SP

Neste local foram coletados o total de 5.276 drosofilídeos, destes 74,7% foram fêmeas e 25,3% machos. Este total de indivíduos foram obtidos em duas coletas, uma realizada no mês de fevereiro e a outra em julho de 2016. Em fevereiro, época do ano em que a estação é Q/U, foram capturados 4.021 indivíduos (73,8% fêmeas; 26,2% machos). Em julho, em que a estação é considerada F/S, foram obtidos 1.255 indivíduos (77,3% fêmeas; 23,7% machos). Observamos, portanto, uma diferença acentuada na abundância dos drosofilídeos coletados nas diferentes estações: no mês de fevereiro 76,2%; no mês de julho 23,8% e uma porcentagem muito maior para fêmeas do que para machos, este último resultado não era esperado baseado em coletas anteriores para a região noroeste.

Do total de drosofilídeos coletados foram identificadas 15 espécies do gênero *Drosophila*, mais as espécies *Zaprionus indianus* e *Scaptodrosophilla latifasciaeformis* (Tabela 6). Uma quantidade significativa de fêmeas crípticas não foi identificada pois não produziram prole (1.149 fêmeas; 28,8% do total de fêmeas).

- **Distribuição das espécies nas armadilhas suspensas e de dossel**

As espécies coletadas nas armadilhas suspensas e de dossel foram distribuídas em quatro categorias: 1. Espécies neotropicais; 2. Espécies invasoras; 3. *Zaprionus indianus*; 4. *S. latifasciaeformis*. Na tabela 7, as categorias estão representadas de acordo com o número total/porcentagem de indivíduos e também por condições climáticas: estação Q/U e estação F/S. A análise destes diferentes grupos evidenciou uma maior abundância das espécies neotropicais, tanto nas armadilhas suspensas como nas armadilhas de dossel. Seguida das abundâncias das espécies invasoras que incluem *D. malerkotliana* (56), *S. latifasciaeformis* (52), *Z. indianus* (27) e *D. simulans* (1), houve uma predominância de indivíduos capturados nas armadilhas de dossel – no caso, na estação quente e úmida. Já na estação fria e seca, esta predominância foi observada nas armadilhas suspensa: *D. simulans* (7), *D. melanogaster* (5), *S. latifasciaeformis* (5), *D. malerkotliana* (2) e *Z. indianus* (1). Estes resultados nos permitem sugerir que *D. malerkotliana* (11%), *S.*

latifascieformis (9,4%) e *Z. indianus* (4%) foram as principais espécies exóticas de drosofilídeos neste ambiente.

- **Sazonalidade**

Durante a estação quente e úmida a abundância de drosofilídeos obtida foi acentuadamente maior do que na estação F/S, como já esperado em coletas nesta região (Figura 6). As espécies de drosofilídeos mais abundantes no mês de fevereiro, em ordem decrescente, foram: *D. sturtevanti*, *D. malerkotliana*, *S. latifascieformis*, *Z. indianus*, *D. austrosaltans* e *D. mercatorum*. Houve predominância destas espécies na armadilha de dossel, com exceção de *D. sturtevanti*, que foi encontrada em maior quantidade nas armadilhas suspensas. Em julho, as espécies mais abundantes foram: *D. mercatorum*, *D. paranaensis*, *D. sturtevanti*, *D. willistoni* e *D. cardini* (Figura 7).

- **Abundância de drosofilídeos nos transectos**

D. sturtevanti possui uma ampla distribuição no território brasileiro (MAGALHÃES, 1962). Esta espécie foi dominante nos dois tipos de armadilhas: 73,5 % na armadilha suspensa e 62,2% na armadilha de dossel, na estação quente e úmida. Ao analisarmos mais detalhadamente a distribuição desta espécie nas armadilhas do dossel e suspensa foi verificado que houve uma maior porcentagem de indivíduos coletados nas armadilhas suspensas (armadilha suspensa: 394 indivíduos; armadilha dossel: 323 indivíduos). Além disto, houve um padrão significativo na distribuição da abundância desta espécie ao longo dos transectos, sua ocorrência foi de forma decrescente, nas armadilhas de dossel (Teste-G=34.7335; $p=0,0001$), no decorrer dos transectos, e crescente ao longo dos transectos nas armadilhas suspensas (Teste-G= 22.6789; $p=0,0001$). A distribuição da *D. sturtevanti*, ao longo dos transectos, na estação fria e seca foi semelhantes ao da estação quente e fria, mas foram coletados em menor quantidade, para as armadilhas suspensas (25) e de dossel (22), porém estes não deram significativos para o Teste-G (Figura 8).

Estação quente e úmida

S. latifaciaesformis, *D. malerkotliana* e *Z. indianus* foram as outras espécies dominantes nas armadilhas suspensas na estação Q/U, nas armadilhas do dossel além destas espécies mencionadas foram também abundantes as espécies *D. austrosaltans* e *D. mercatorum* (Figura 9). Nas armadilhas suspensas, *S. latifaciaesformis*, *D. malerkotliana* e *Z. indianus* mostraram um padrão decrescente de abundância ao longo do transecto mas este padrão de distribuição ao longo do transecto foi significativo para o Teste-G apenas para a espécie *S. latifaciaesformis*. Nas armadilhas de dossel, as espécies *Z. indianus*, *D. austrosaltans* e *D. mercatorum* foram crescentes em sua abundância no decorrer do transecto, ao contrário das demais espécies, *S. latifaciaesformis* e *D. malerkotliana*, que foram diminuindo no decorrer do transecto, esse padrão de distribuição foi significativo apenas para *D. malerkotliana* e *D. mercatorum* (Tabela 8).

Estação fria e seca

Na estação fria e seca as espécies dominantes foram diferentes. Nas armadilhas suspensas as espécies mais abundantes foram respectivamente *D. mercatorum* (25), *D. willistoni* (14) e *D. cardini* (10). Nas armadilhas do dossel foram *D. mercatorum* (73), *D. paranaensis* (46) e *D. cardini* (12) as mais abundantes (Figura 10). A abundância de *D. willistoni* foi decrescente ao longo dos transectos (borda-interior), sendo significativo o valor de p em ambos os tipos de armadilhas. Já para a *D. cardini*, sua abundância foi crescente ao longo dos transectos, mas apenas para as armadilhas de dossel que essa distribuição foi significativa. Nas armadilhas de dossel, *D. paranaensis* também seguiu este padrão decrescente, tendo o valor de p significativo (Tabela 8).

Tabela 06. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do fragmento florestal de Nova Granada, nas estações chuvosa e seca. F= Fêmea; M= Macho; T= total; * não identificadas.

Espécies	Chuvosa						Seca						T	
	Suspensa		Dossel		T		Suspensa		Dossel		T			
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
<i>D. annulimana</i>	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>D. ararama</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
<i>D. polymorpha</i>	1	1	0	0	1	1	18	10	17	12	35	22	36	23
<i>D. guaru</i>	1	1	0	0	1	1	15	2	3	4	18	6	19	7
<i>D. immigrans</i>	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>D. mercatorum</i>	0	6	0	12	0	18	0	25	0	73	0	98	0	116
<i>D. onca</i>	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2
<i>D. paranaensis</i>	0	0	0	7	0	7	0	8	0	46	0	54	0	61
<i>D. malerkotliana</i>	5	35	23	56	28	91	0	9	0	2	0	11	28	102
<i>D. melanogaster</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	4	5	5	7	5	7
<i>D. simulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	2	7	2	8	3	9
<i>D. austrosaltans</i>	0	5	0	19	0	24	0	1	3	5	3	6	3	30
<i>D. prosaltans</i>	7	5	27	9	34	14	5	1	22	0	27	1	61	15
<i>D. sturtevanti</i>	1147	394	727	323	1874	717	155	25	134	22	289	47	2163	764
<i>D. nebulosa</i>	36	4	15	0	51	4	7	1	4	1	11	2	62	6
<i>D. willistoni</i>	0	7	0	2	0	9	7	14	0	5	7	19	7	28
<i>S. latifasciaeformis</i>	120	47	170	52	290	99	11	5	17	3	28	8	318	107
<i>Z. indianus</i>	44	16	67	27	111	43	0	1	6	0	6	1	117	44
<i>Grupo repleta*</i>	23	2	46	7	69	9	127	4	324	7	451	11	520	20
<i>Grupo tripunctata*</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	4	0	4	0

Grupo das amarelas*	266	12	243	1	509	13	39	1	49	0	88	1	597	14
Grupo das escuras*	1	1	2	1	3	2	0	0	2	0	2	0	5	2
Total	1653	539	1320	518	2973	1057	386	112	591	192	977	304	3950	1361

Tabela 07. Abundancia dos grupos de drosofilídeos em armadilhas suspensas e armadilhas de dossel, da fazenda São João, Nova Granada/SP, nas estações quente e úmida e fria e seca.

Estações	Grupos de Espécies	Suspensa	%	Dossel	%
Quente/Úmida	Neotropicais	438	81,7	383	73,8
	Invasoras	35	6,5	57	11
	<i>Z. indianus</i>	16	3	27	5,2
	<i>S. latifasciaeformis</i>	47	8,8	52	10
	Total	536	100	519	100
Fria/Seca	Neotropicais	95	84	175	91,1
	Invasoras	12	10,6	14	7,4
	<i>Z. indianus</i>	1	0,9	0	0
	<i>S. latifasciaeformis</i>	5	4,5	3	1,5
	Total	113	100	192	100
Total	Neotropicais	533	82,1	558	78,5
	Invasoras	47	7,2	71	10
	<i>Z. indianus</i>	17	2,7	27	3,8
	<i>S. latifasciaeformis</i>	52	8	55	7,7
	Total	649	100	711	100

Tabela 08. Análise do teste-G e sua significância (p) dos grupos de drosofilídeos mais abundantes, nas armadilhas suspensas e armadilhas de dossel, no decorrer dos transectos (60m a 300m), da fazenda São João, Nova Granada/SP, nas estações quente e úmida e fria e seca. Em negrito p <0.05.

Estações	Armadilhas	Espécies	60m	120m	180m	240m	300m	Teste-G	P
Quente e úmida	Suspensa	<i>S. latifasciaeformis</i>	11	4	16	5	11	10.7883	0.0290
		<i>D. malerkotliana</i>	9	9	8	6	3	4.2502	0,3732
		<i>Z. indianus</i>	6	1	3	5	1	6.9663	0,1377
		Total	26	14	27	16	15	13.9545	0.0830
	Dossel	<i>D. malerkotliana</i>	11	16	13	13	3	10.8632	0,0281
		<i>S. latifasciaeformis</i>	12	11	14	11	4	6.5813	0,1597
		<i>Z. indianus</i>	4	6	4	9	4	3.2567	0,5158
		<i>D. austrosaltans</i>	4	1	2	8	4	7.4943	0.1120
		<i>D. mercatorum</i>	3	1	1	1	6	11.4573	0.0219
		Total	34	35	34	42	21	27.8301	0.0331
Fria e seca	Suspensa	<i>D. mercatorum</i>	12	0	7	3	3	19.4677	0,0006
		<i>D. willistoni</i>	2	0	2	6	4	9.1946	0.0564
		<i>D. cardini</i>	1	1	2	2	4	2.7726	0.5966
		Total	15	1	11	11	11	15.8427	0.0447
	Dossel	<i>D. mercatorum</i>	22	8	18	7	18	13.1973	0.0104
		<i>D. paranaensis</i>	10	13	8	0	15	22.9497	0.0001
		<i>D. cardini</i>	1	1	0	2	8	14.9228	0.0049
		Total	33	22	26	9	41	26.6856	0.0008

Figura 6. Número total de indivíduos por espécie mais abundantes coletados na fazenda São João, Nova Granada/SP durante as estações quente e úmida e a estação fria e seca. stur: *D. sturtevanti*; scap: *S. latifasciaeformis*; merc: *D. mercatorum*; male: *D. malerkotliana*; para: *D. paranaensis*.

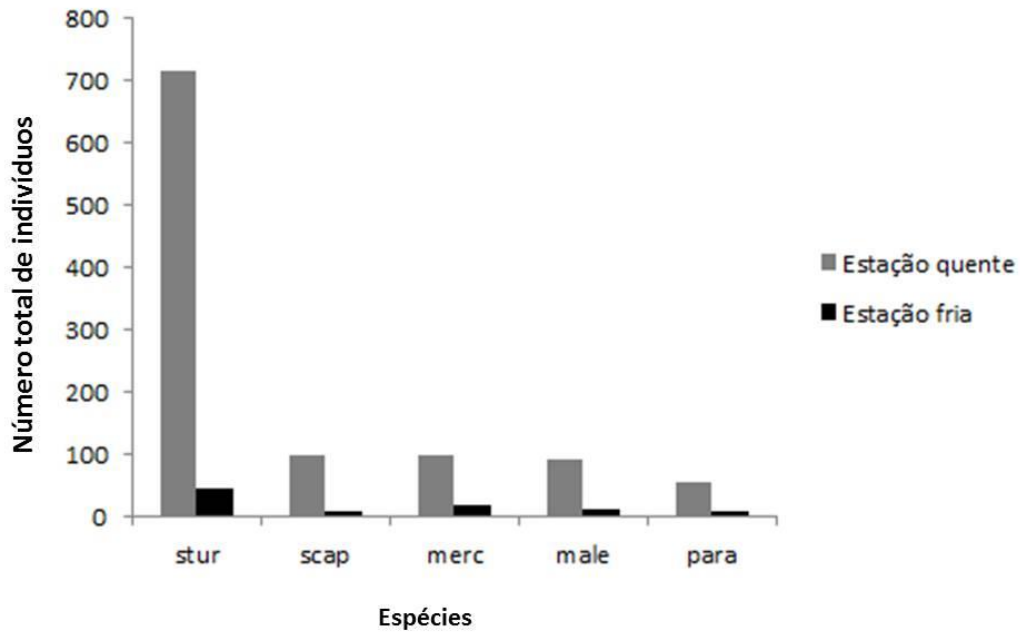
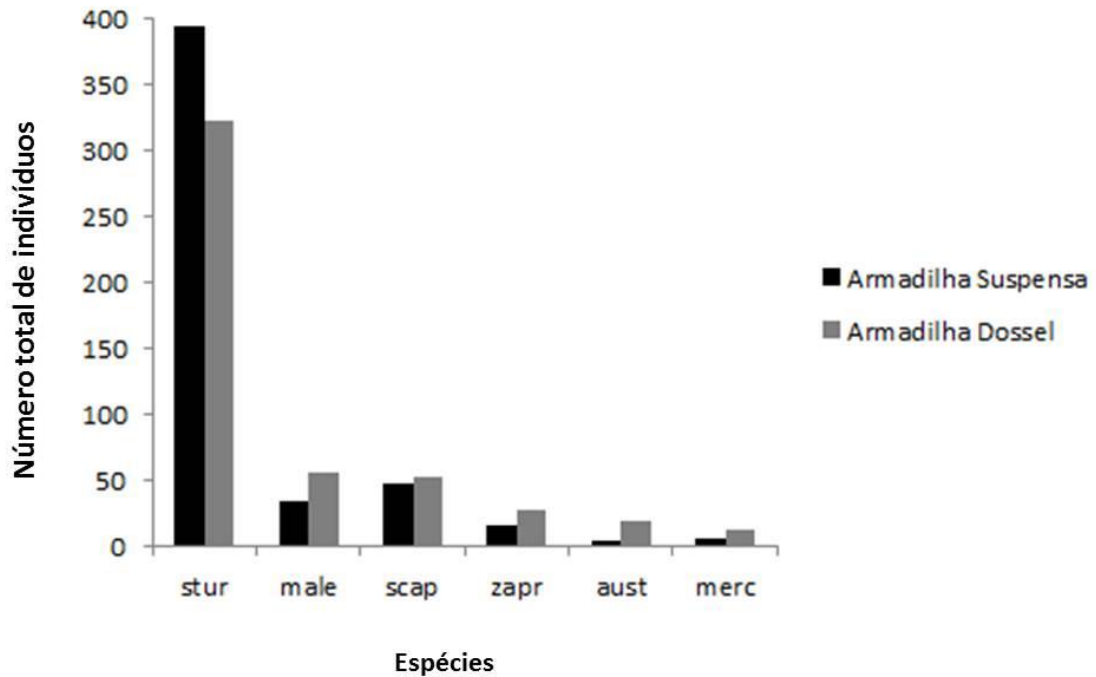


Figura 7. Número total de indivíduos por espécie mais abundantes coletados na fazenda São João, Nova Granada/SP durante as estações quente e úmida (A) e a estação fria e seca (B). stur: *D. sturtevantii*; male: *D. malerkotliana*; scap: *S. latifasciaeformis*; zapr: *Z. indianus*; aust: *D. austrosoltans*; merc: *D. mercatorum*; para: *D. paranaensis*; will: *D. willistonii*; card: *D. cardini*.

A. Estação quente e úmida



B. Estação fria e seca

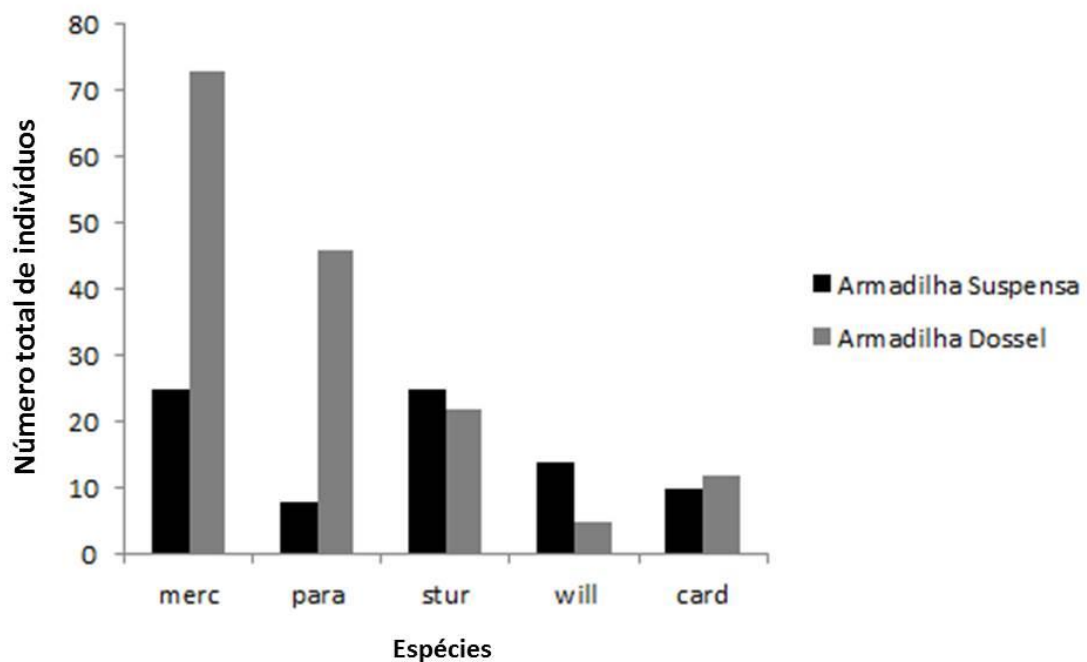
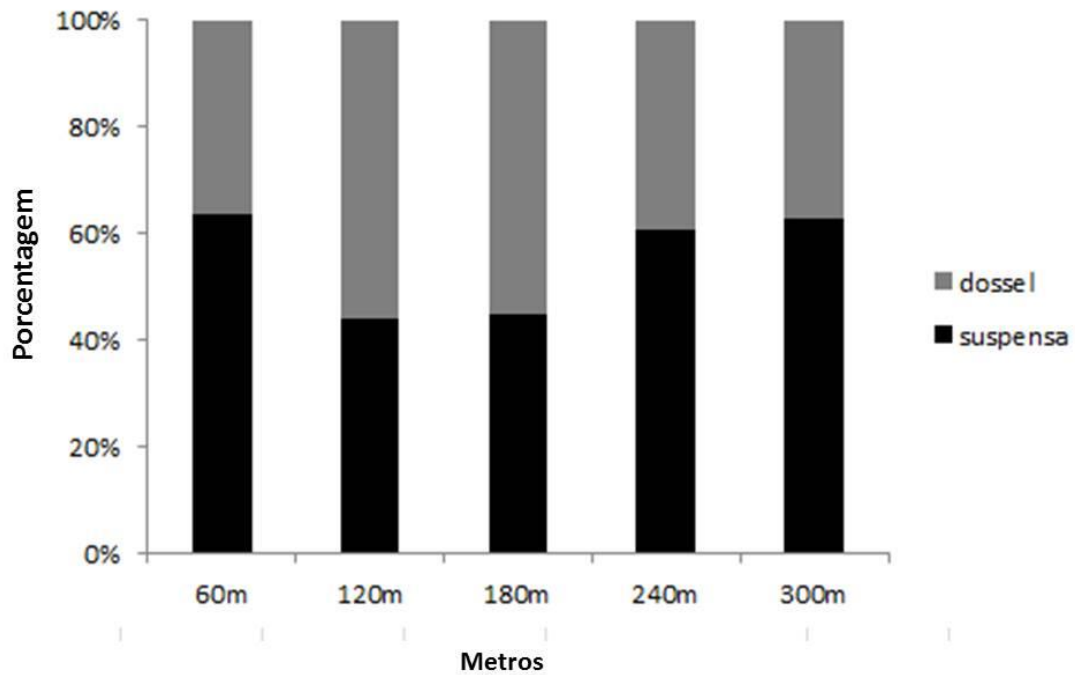


Figura 8 A-B. Abundância relativa de *D. sturtevanti* coletada ao longo dos transectos (borda-interior), na fazenda São João, Nova Granada/SP.

A. Estação quente e úmida



B. Estação fria e seca

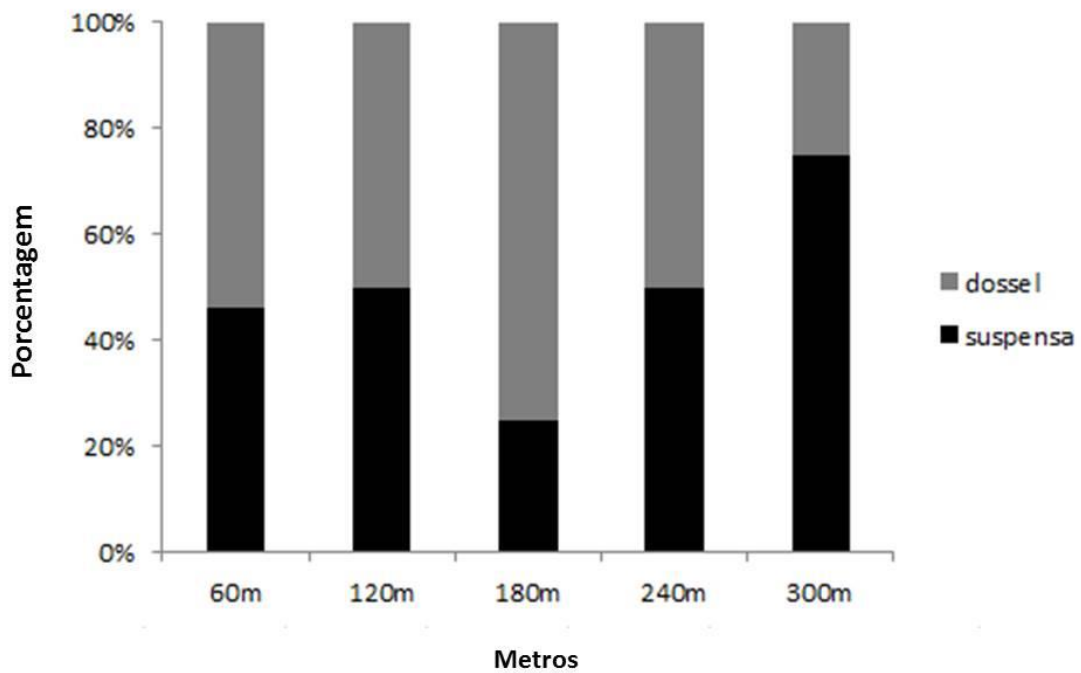
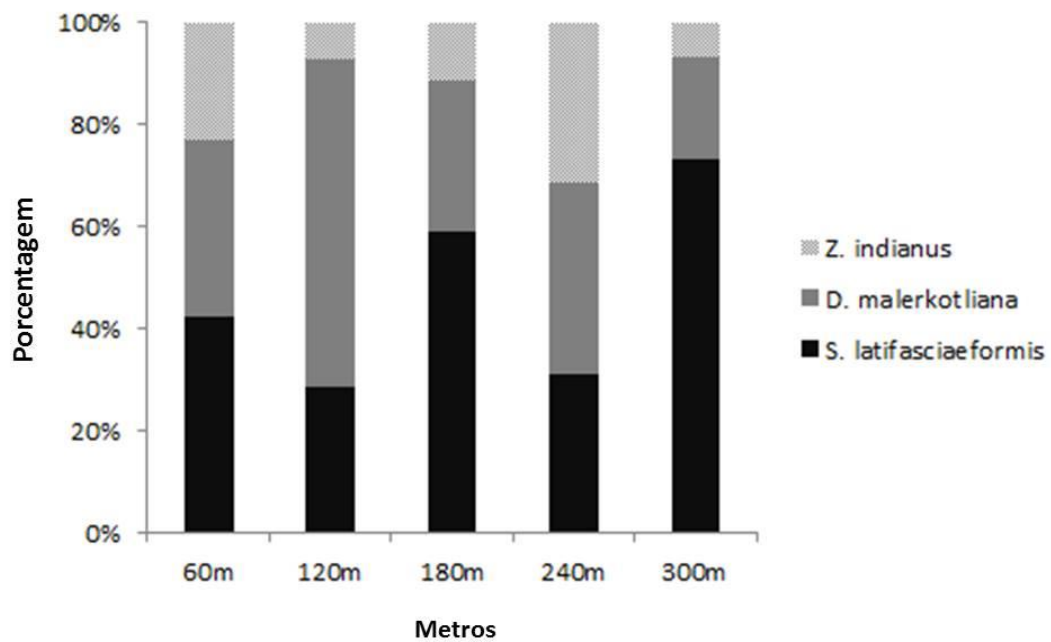


Figura 9 A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação quente e úmida, na fazenda São João, Nova Granada/SP.

A. Armadilha Suspensa



B. Armadilha Dossel

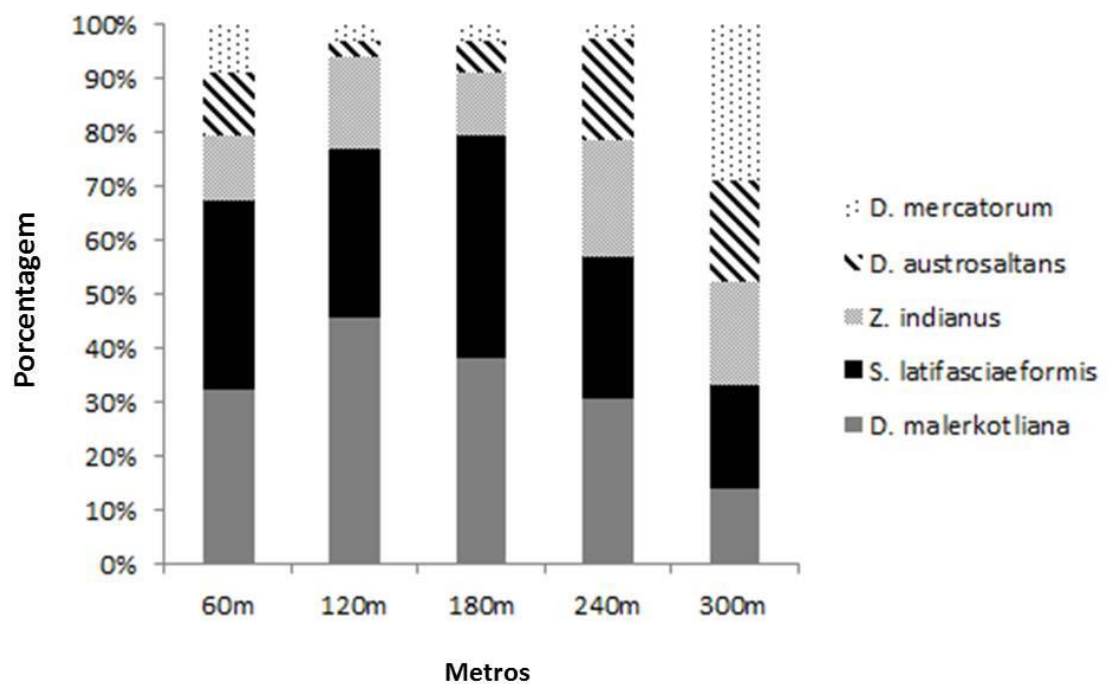
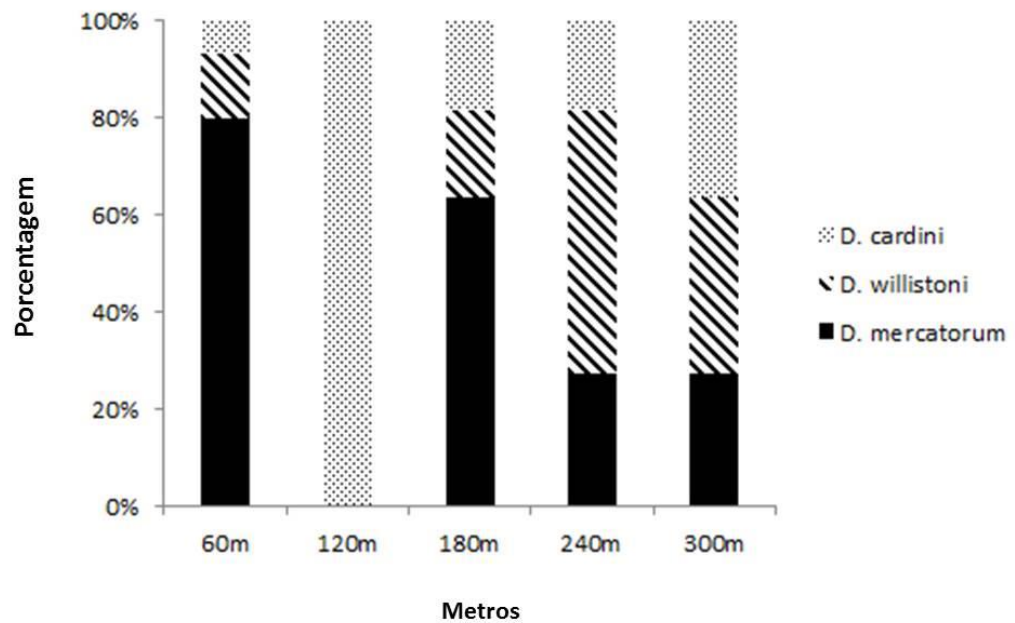
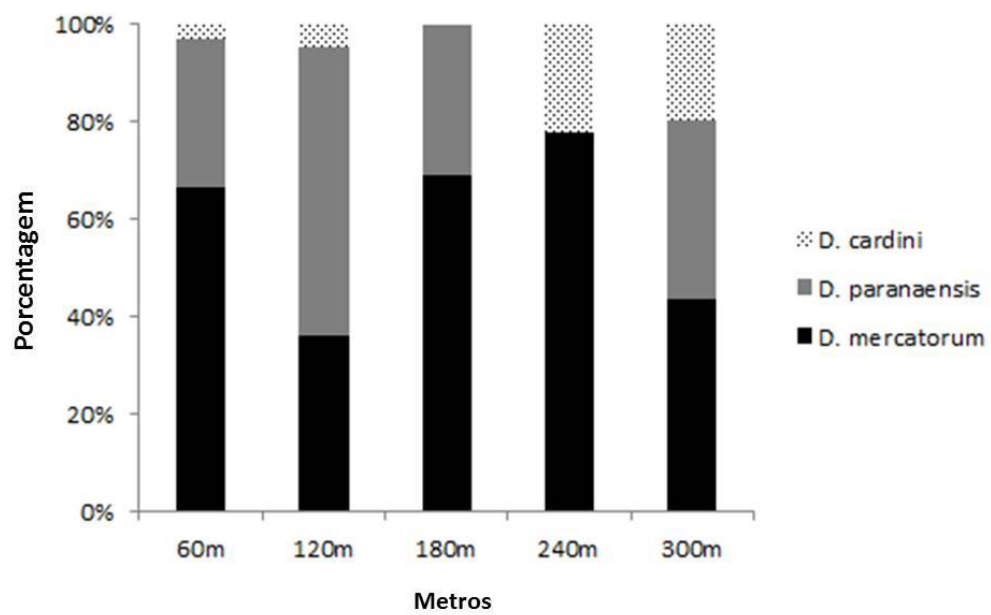


Figura 10 A-B. Abundância relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior), na estação fria e seca, na fazenda São João, Nova Granada/SP.

A. Armadilha suspensa



B. Armadilha dossel



Área 3: Parque Estadual da Serra do Mar/ Núcleo Picinguaba/SP

Neste local foram coletados 4.515 drosofilídeos, 67,6% fêmeas e 32,4% machos e foram identificados 2.048 indivíduos (46,60%). Esta coleta foi realizada no mês de março de 2016, época do ano que a estação Q/U. Foram identificadas 26 espécies de drosofilídeos (Tabela 9). As principais características morfológicas destas espécies foram anotadas quando possível e as moscas e os edeagos foram fotografados para documentação, há a possibilidade de alguns destes espécimes se tratarem de novas espécies.

- **Distribuição das espécies nas armadilhas suspensas e de dossel**

As espécies coletadas nas armadilhas suspensas e de dossel com maior abundância foram: *D. willistoni*, *D. sturtevanti* e *D. malerkotliana* em ambos os níveis e *D. ananassae* nas armadilhas suspensas (Figura 11). As espécies invasoras foram pouco abundantes, representando apenas 9,2% do total dos drosofilídeos coletados: *D. ananassae* (4,8%), *D. malerkotliana* (3,4%), *S. latifascieformis* (0,7%) *D. melanogaster* (0,22%) e *D. simulans* (0,08%), e ocorreram com certa predominância nas armadilhas de dossel.

- **Abundância de drosofilídeos nos transectos**

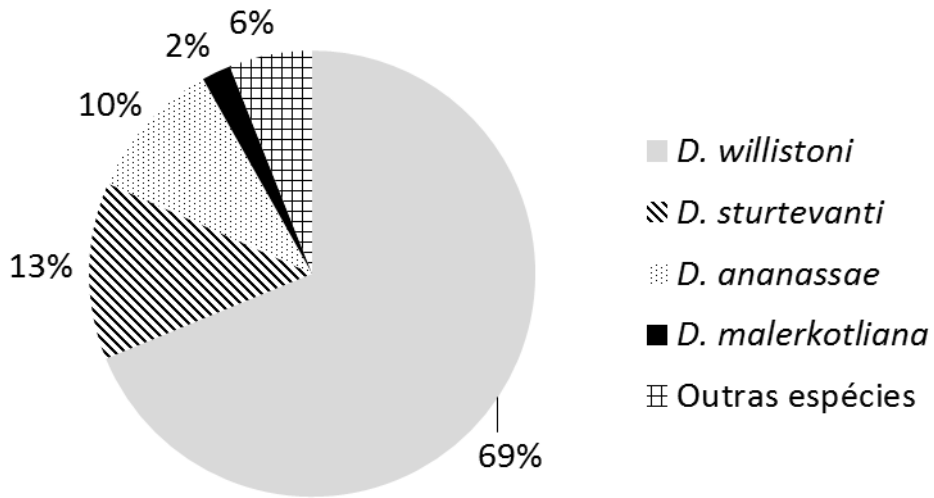
D. willistoni foi a espécie dominante na coleta nos dois tipos de armadilhas: 69% nas armadilhas suspensas e 75% nas de dossel, representando 72% do total de machos coletados (Figura 12). *D. sturtevanti* foi a segunda espécie mais abundante, representando 14,4% do total de machos coletados. Ao analisarmos mais detalhadamente a distribuição desta espécie nas armadilhas suspensas e de dossel observamos que houve uma maior porcentagem de indivíduos coletados nas armadilhas de dossel. A distribuição da abundância de *D. willistoni* e *D. sturtevanti* ao longo dos transectos nas armadilhas foi maior nos primeiros 180m, tanto para as armadilhas suspensas (*D. willistoni*: $X^2= 148.052$; $p=0,0001$; *D. sturtevanti*: $X^2=40.557$; $p=0,0001$) quanto para as de dossel (*D. willistoni*: $X^2=252.789$; $p=0,0001$; *D. sturtevanti*: $X^2=81.000$; $p=0,0001$).

Tabela 9. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do Parque Estadual de Picinguaba/SP, nas armadilhas suspensa (S) e de dossel (D). F = fêmeas. M = machos.

Espécies	S		D		Total	
	F	M	F	M	F	M
<i>D. albomarginata</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. neocardini</i>	0	6	0	2	0	8
<i>D. polymorpha</i>	0	0	0	2	0	2
<i>D. guaru</i>	1	2	0	0	1	2
<i>D. immigrans</i>	0	1	11	3	11	4
<i>D. nasuta</i>	0	2	0	0	0	2
<i>D. ellison</i>	0	5	0	2	0	7
<i>D. mercatorum</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. pictilis</i>	0	2	0	0	0	2
<i>D. ananassae</i>	0	63	0	2	0	65
<i>D. malerkotliana</i>	0	14	3	36	3	50
<i>D. melanogaster</i>	0	0	0	3	0	3
<i>D. simulans</i>	0	1	0	1	0	2
<i>D. austrosaltans</i>	0	0	1	1	1	1
<i>D. neolliptica</i>	0	3	0	4	0	7
<i>D. neosaltans</i>	0	0	0	4	0	4
<i>D. prosaltans</i>	5	1	21	4	26	5
<i>D. sturtevanti</i>	190	81	224	114	414	195
<i>D. capricorni</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. nebulosa</i>	0	0	0	4	0	4
<i>D. willistoni</i>	187	478	55	547	242	1025
<i>S. latifascieformis</i>	11	2	42	7	53	9
<i>Z. indianus</i>	0	0	1	0	1	0
<i>D. sp2</i>	0	0	0	1	0	1
<i>D. sp4</i>	0	3	0	1	0	4
<i>D. sp5</i>	0	7	0	4	0	11
<i>D. sp6</i>	0	1	0	0	0	1
Grupo <i>cardini</i> *	10	0	11	6	21	6
Grupo <i>repleta</i> *	7	2	18	1	25	3
Grupo amarelas*	984	29	1268	7	2252	36
Grupo escuras*	0	0	3	0	3	0
Total	1395	706	1658	756	3053	1462

Figura 11. Porcentagem total de indivíduos machos por espécies mais abundantes coletados no Parque Estadual Serra do Mar/Picinguaba/SP durante a estação quente e úmida. Armadilhas Suspensas (A); Armadilhas Dossel (B).

A



B

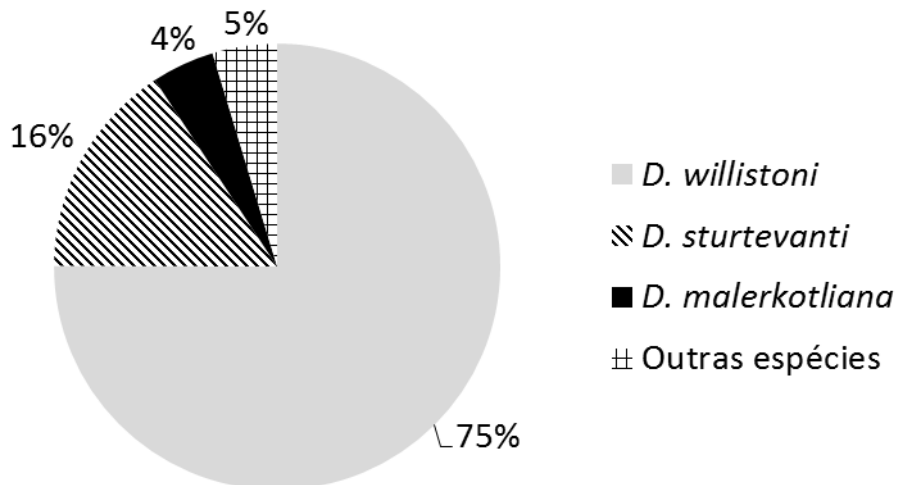
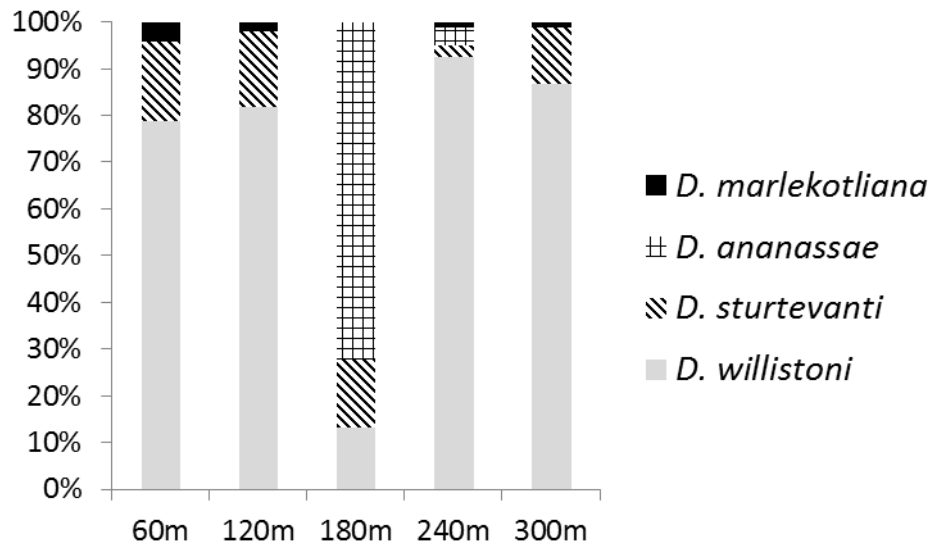
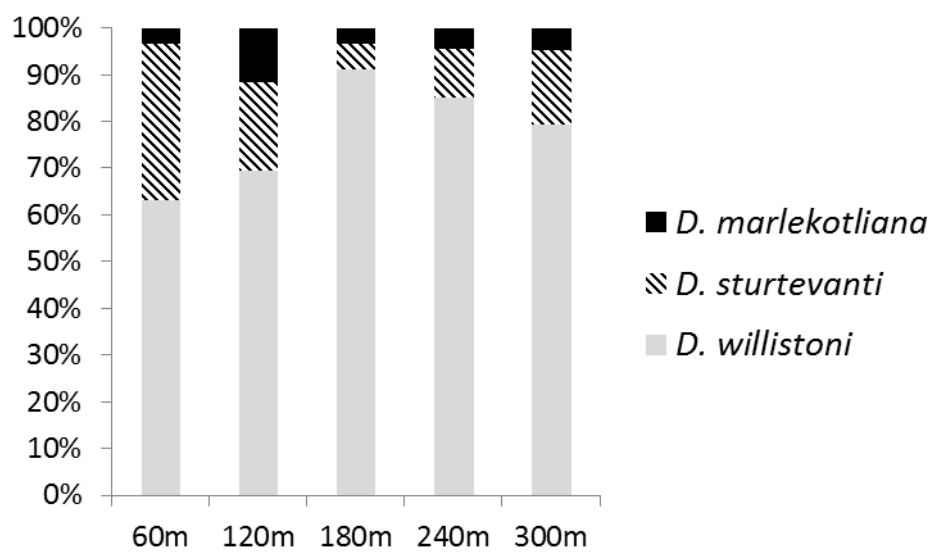


Figura 12. Porcentagem relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior) no Parque Estadual Serra do Mar/Picinguaba/SP. Armadilhas Suspensas (A); Armadilhas Dossel (B).

A



B



Área 4: Parque Estadual da Serra da Cantareira/SP (SDC)

Nesta área foram coletados 4.016 drosofilídeos, 71% fêmeas e 29% machos. Destes foram identificados 1.149 indivíduos (28,6%). Esta coleta foi realizada no mês de dezembro de 2016, época do ano que a estação é quente e úmida. Do total de drosofilídeos coletados foram identificadas 28 espécies do gênero *Drosophila*, mais os drosofilídeos *Zaprionus indianus* e *Scaptodrosophila latifasciaeformis*, espécies com invasão recente (VILELA, 1999) (Tabela 10).

- **Distribuição das espécies nas armadilhas suspensas e de dossel**

As espécies coletadas nas armadilhas suspensas e de dossel com maior abundância foram: *D. willistoni*, *D. simulans* e *D. polymorpha*. A espécie *D. capricorni* ocorreu somente nas armadilhas suspensas (Figura 13A). Nesta área as espécies invasoras também foram pouco abundantes, representando apenas 11% do total de drosofilídeos coletados que foram: *D. simulans* (10%) e *Z. indianus* (1,1%), que teve predominância nas armadilhas de dossel (Figura 13B).

- **Abundância de drosofilídeos nos transectos**

D. willistoni foi a espécie dominante na coleta nos dois tipos de armadilhas: 82,1% nas armadilhas suspensas e 65,7% nas de dossel, representando 75,2% do total de machos coletados e a segunda espécie mais abundante foi *D. simulans* representando 10% do total de machos coletados.

A abundância de *D. willistoni* nas armadilhas suspensas foi maior no interior da mata (180m-300m) ($X^2=93.085$; $p=0,0001$) (Figura 14A), entretanto, nas armadilhas de dossel a maior abundância ocorreu nos primeiros 180 metros do transecto ($X^2=121.216$; $p=0,0001$) (Figura 14B).

A abundância de *D. simulans* foi maior no interior da mata tanto nas armadilhas suspensas ($X^2=10.684$; $p=0,0304$) quanto nas armadilhas de dossel ($X^2=16.487$; $p=0,002$).

- **Amostragem das fêmeas crípticas**

Não foi possível identificar todas as moscas em nível de espécie, pelo fato de muitas fêmeas não ovipositarem e alguns machos estarem com a terminália destruída, dificultando a identificação (Tabela 10). As fêmeas amarelas crípticas

representaram 60% do total de drosofilídeos coletados, dessas fêmeas, uma amostragem aleatória por armadilha foi tomada totalizando 600 fêmeas amarelas (300 das armadilhas suspensas e 300 das de dossel) que foram colocadas para ovipositar. Destas fêmeas, 136 morreram antes de ovipositar (22%), 43 não ovipositaram (7%) e as que tiveram sucesso na oviposição foram identificadas como: *D. willistoni* (50%), *D. simulans* (18%) e *D. capricorni* (3%) (Tabela 11).

Tabela 10. Abundância total de drosofilídeos coletados nos transectos do Parque Estadual Serra da Cantareira, nas armadilhas suspensas (D) e de dossel (D). F = fêmeas. M = machos.

Espécies	S		D		Total	
	F	M	F	M	F	M
<i>D. ararama</i>	0	0	0	1	0	1
<i>D. neocardini</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. polymorpha</i>	32	12	15	14	47	26
<i>D. grisolineata</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. guaraja</i>	0	0	0	1	0	1
<i>D. guaru</i>	3	1	3	1	6	2
<i>D. ornatifrons</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. immigrans</i>	6	3	12	2	18	5
<i>D. nasuta</i>	0	1	0	1	0	2
<i>D. pallidipennis</i>	0	0	0	1	0	1
<i>D. hydei</i>	0	0	0	3	0	3
<i>D. mercatorum</i>	0	4	0	1	0	5
<i>D. nigricuria</i>	0	0	0	2	0	2
<i>D. onca</i>	0	5	0	1	0	6
<i>D. pictura</i>	0	0	0	1	0	1
<i>D. senei</i>	0	1	0	1	0	2
<i>D. mediopicta</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. caponei</i>	0	0	0	1	0	1
<i>D. simulans</i>	7	38	0	78	7	116
<i>D. Suzuki</i>	0	1	4	0	4	1
<i>D. neoelliptica</i>	11	7	21	10	32	17
<i>D. prosaltans</i>	7	1	7	8	14	9
<i>D. pseudosaltans</i>	0	1	2	0	2	1
<i>D. sturtevanti</i>	10	7	3	10	13	17
<i>D. capricorni</i>	0	17	0	8	0	25
<i>D. willistoni</i>	216	553	10	324	226	877
<i>S. latifasciaeformis</i>	0	5	0	8	0	13
<i>Z. indianus</i>	16	4	21	9	37	13
<i>D. sp2 L 57</i>	0	1	0	0	0	1
<i>D. sp 3 L56</i>	0	1	0	0	0	1
Grupo <i>saltans</i> *	10	0	16	0	26	0
Grupo <i>repleta</i> *	7	0	12	0	19	0
Grupo <i>tripunctata</i> *	0	1	0	1	0	2
Grupo amarelas *	1376	0	1032	0	2408	0
Grupo escuras *	2	0	0	0	2	0
Total	1703	668	1158	487	2861	1155

Tabela 11. Espécies de *Drosophila* grupo amarelo, identificadas por meio de edeagos de machos F1 obtidos de isolinhagens das fêmeas amarelas coletadas no Parque Estadual Serra da Cantareira/SP. S = armadilhas suspensas; D = armadilhas no dossel. T1 – T6 = transectos.

Espécies	T1		T2		T3		T4		T5		T6		TOTAL		TOTAL
	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	
<i>D. willistoni</i>	0	27	15	5	43	25	17	32	31	36	36	34	142	159	301
<i>D. simulans</i>	0	16	20	3	6	20	7	15	5	10	0	2	38	66	104
<i>D. capricorni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	6	10	6	16
Sem oviposição	0	5	4	6	1	1	3	3	8	4	2	6	18	25	43
Moscas mortas	50	2	11	36	0	4	23	0	1	0	7	2	92	44	136
Total	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	300	300	600

Figura 13. Porcentagem total das espécies mais abundantes coletadas no Parque Estadual Serra da Cantareira/SP durante a estação quente e úmida. Armadilhas Suspensas (A); Armadilhas Dossel (B).

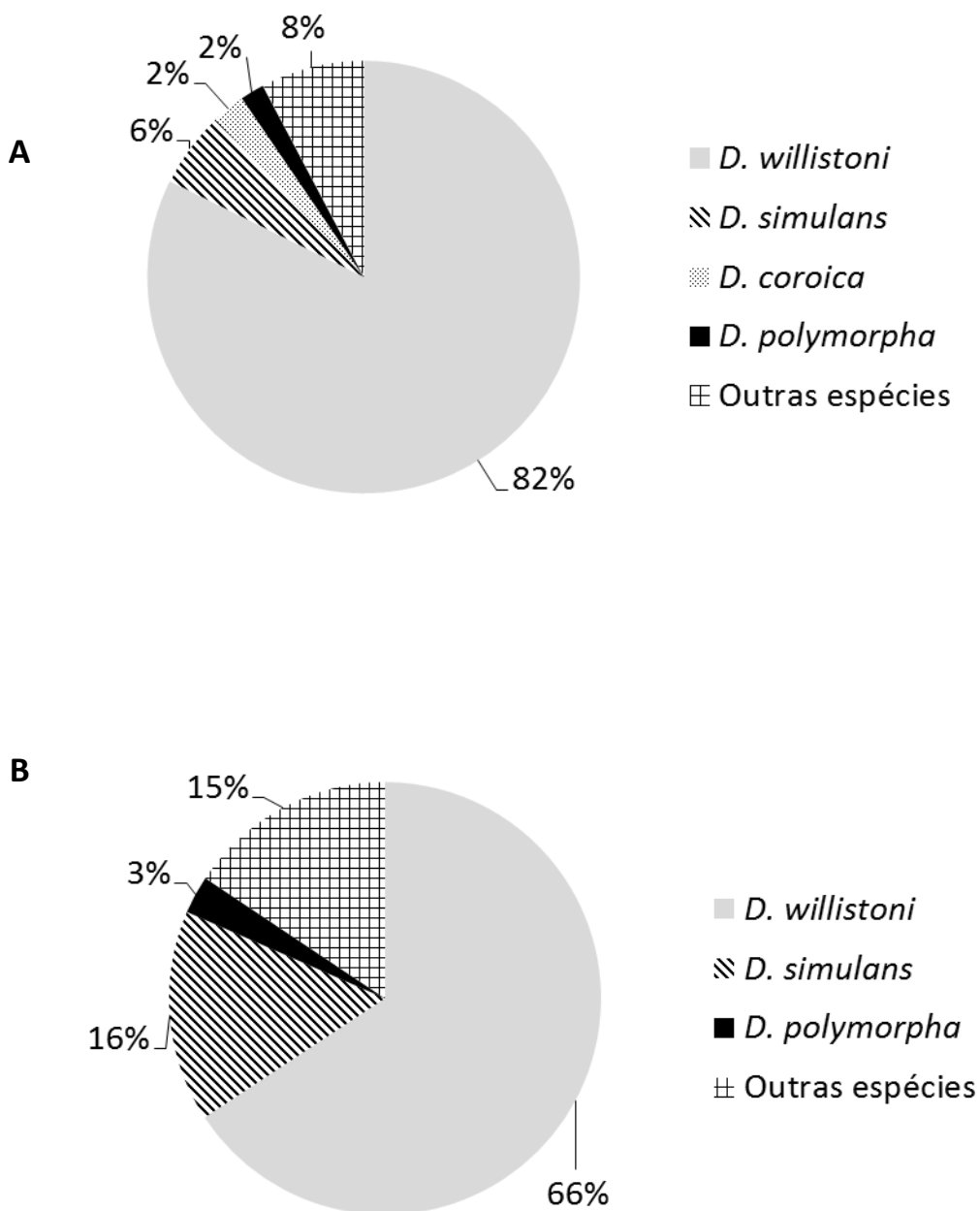
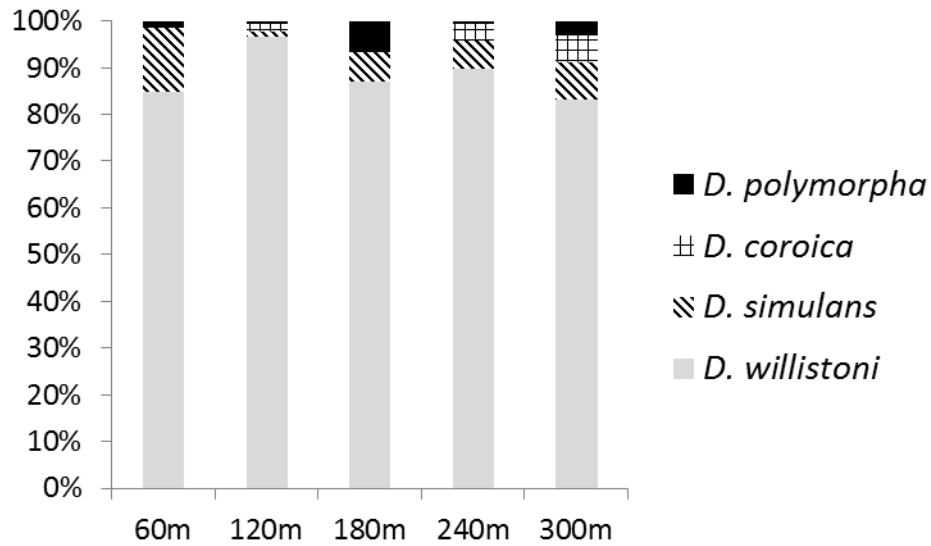
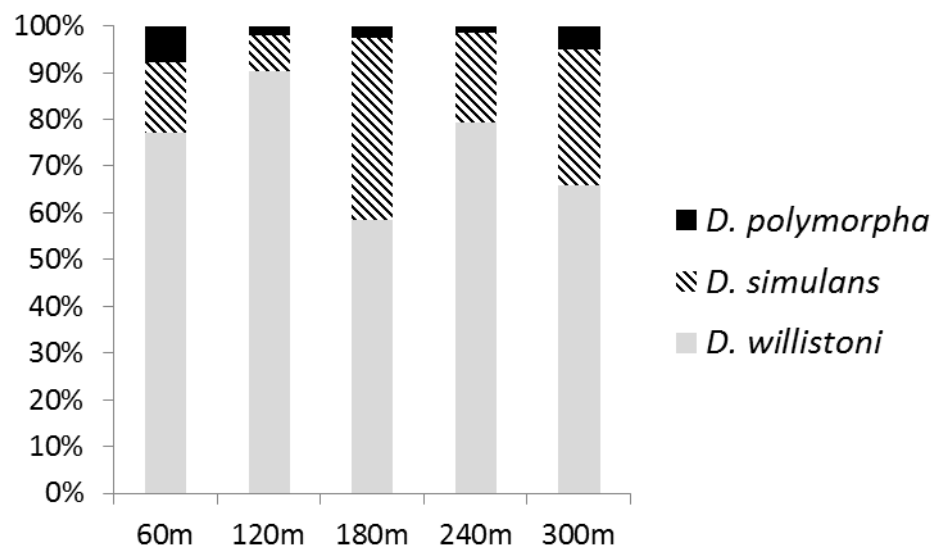


Figura 14. Porcentagem relativa das espécies mais abundantes coletadas ao longo dos transectos (borda-interior) no Parque Estadual da Serra da Cantareira/SP. A= Armadilhas Suspensas; B = Armadilhas Dossel.

A



B



Índices Ecológicos das áreas em estudo

Também foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Wiener (KREBS; 1999), de equitabilidade de Pielou e de dominância de Berger-Parkin (ODUM; 1995) para cada fragmento, por estação climática. Os valores dos índices ecológicos calculados estão representados na tabela 13 e não diferiram muito entre as duas áreas. *D. sturtevanti* foi a espécie dominante para as duas áreas na estação quente e úmida, representando 75% dos drosofilídeos no fragmento de MAT e 70% dos drosofilídeos em NGR. Já na estação fria, *D. simulans* foi a espécie dominante, representando 59% dos drosofilídeos no fragmento de MAT e *D. mercatorum* representou 33%, apesar de apresentar um baixo valor, este ainda foi a espécie mais abundante para o fragmento de NGR. Para PIC e SDC, a espécie dominante em ambas as áreas foi *D. willistoni*, representando 72% dos drosofilídeos no fragmento de PIC e 75% dos drosofilídeos em SDC.

Tabela 13. Valores dos índices ecológicos calculados para os quatro fragmentos florestais. H' = índice de diversidade de Shannon-Wiener, H_{máx} = índice de diversidade teórica máxima, e = índice de equitabilidade de Pielou, d = índice de dominância de Berger-Parkin, MAT=Matão, NGR=Nova Granada, Q/U= Estação quente e úmida; F/S= Estação fria e seca PIC= Parque Estadual Serra do Mar/Picinguba e SDC= Parque Estadual Serra da Cantareira.

Índices Ecológicos	MAT		NGR		PIC	SDC
	Q/U	F/S	Q/U	F/S		
H'	0,48	0,88	0,54	0,60	0,44	0,49
H _{máx}	1,07	1,23	1,43	1,23	1,14	1,50
e	0,45	0,71	0,37	0,49	0,38	0,32
d	0,70	0,33	0,75	0,59	0,72	0,75

DISCUSSÃO

Por meio do estudo da assembléia de drosofilídeos podemos ter indicativos da preservação das áreas em estudo. Algumas espécies de drosofilídeos são excelentes ferramentas para estudos ambientais devido à sensibilidade do gênero *Drosophila* em relação às variáveis abióticas e bióticas refletirem na dinâmica populacional desses organismos, algumas espécies de drosofilídeos são utilizadas como bioindicadoras, por serem organismos de característica cosmopolita e facilmente coletada na natureza (PARSON, 1991; FOOTE; CARSON, 2004; BIZZO et al, 2010).

Os resultados apresentados avaliam a composição das assembleias de drosofilídeos em quatro áreas de Mata Atlântica, Fazenda Cambuhy/Matão, Fazenda São João/ Nova Granada, Parque Estadual Serra do Mar/Picinguaba e Parque Estadual Serra da Cantareira, do qual a principal fitofisionomia é a Floresta Ombrófila semidecidual para as áreas localizadas dentro das Fazendas, e Floresta Ombrófila Densa para as áreas localizadas na reservas do Parque (INPE, 2011).

MAT e NGR, coletadas em duas épocas do ano, tiveram baixa abundância de drosofilídeos coletados no verão, sendo observada uma maior riqueza no fragmento de MAT (23), coletadas na estação quente e úmida, em armadilhas de dossel, ao contrário de NGR (14), onde a maior riqueza de drosofilídeos foi coletadas em armadilhas suspensas e na estação fria e seca. Esta baixa diversidade na riqueza de espécies de drosofilídeos também foi observada em estudos de biodiversidade de drosofilídeos em outros fragmentos de mata semidecidual desta região (TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006. PENARIOL et al. 2008, PENARIOL; MADI-RAVAZZI, 2012), pequeno número amostral de drosofilídeos na estação fria e seca, juntamente com a riqueza de espécies neste período (TIDON, 2006; DE TONI et al. 2007) e uma maior abundância de drosofilídeos nas estações verão e outono (BENADO; BRNCIC, 1994; TIDON, 2006; SCHMITZ et al. 2007). Houve também uma diferença significativa entre as estações do ano e a diferença no posicionamento das armadilhas.

No fragmento de MAT e NGR, *D. sturtevanti* foi a espécie mais abundante na estação quente e úmida, representando 70,6% em MAT e 52,6% do total de drosofilídeos coletados em NGR, sendo capturados em grande quantidade para ambas armadilhas. Já para a estação fria e seca, *D. mercatorum*, pertencente ao grupo *repleta*, no fragmento de MAT a *D. simulans* foi a espécie mais abundante (59%) e em NGR foi a mais abundante (32,3%), ambas espécies foram coletadas em maior quantidade nas armadilhas de dossel. A terceira espécie mais abundante foi *D. willistoni*, coletada em maior quantidade na estação fria e seca, sendo coletada em maior quantidade no fragmento de MAT, em armadilha de dossel, na estação fria e seca. A armadilha de dossel teve maior eficiência em captura tanto para riqueza de drosofilídeos quanto para abundancia no fragmento de MAT, mas a armadilha suspensa foi mais eficiente para a riqueza de drosofilídeos para o fragmento de NGR e valores aproximados para a abundancia em ambas as estações.

O índice de diversidade (H') tanto NGR quanto MAT não foi significativo para as espécies dominantes quando comparada uma estação com a outra ($p=0,8059$; $p=0,9683$). *D. sturtevanti*, espécie neotropical, teve predominância a estação chuvosa para as duas áreas estudadas, o que reflete a ampla diversidade de ambientes no qual essa espécie é encontrada (MATEUS et al. 2006, GOTTSCHALK et al. 2007, MATA et al. 2008) e sua associação com alta umidade como observado em outros trabalhos (TIDON-SKLORZ; SENE, 1992; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006).

No fragmento da SDC e PIC, a espécie dominante foi *D. willistoni* (PIC=72%; SDC=75%) seguida por *D. sturtevanti* em PIC e *D. simulans* em SDC, representando menos que 15% dos drosofilídeos coletados. *D. willistoni* é uma espécie neotropical, encontrada em ambientes de mata e tem sido associada a ambientes preservados (SAAVEDRA et al, 1995; GOTTSCHALK, 2004; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; MATA et al, 2008; PENARIOL et al, 2008, PENARIOL et al, 2017, em preparação). Desse modo, o predomínio de *D. willistoni* nessas áreas demonstra o alto grau de preservação nessas unidades de conservação do Estado de São Paulo. Essa espécie também foi encontrada na área de MAT (10%) e em NGR (2%), mostrando alto grau de impacto ambiental.

Essa preservação nas duas áreas de reserva também corrobora com os dados da riqueza de espécies em SDC (30), em seguida PIC (26), de MAT (24) e NGR(17), lembrando que MAT e NGR tiveram um esforço amostral maior, por terem sido coletadas em duas épocas do ano. Assim, as áreas de PIC e SDC contem um número maior na riqueza de espécies por serem áreas mais preservadas, incluídas em unidades de conservação, ao contrário de NGR e MAT. As populações de MAT e NGR são procedentes de remanescentes florestais que estão imersos em uma matriz de uso predominantemente agrícola, existindo cultivos de laranja, cana de açúcar e seringueira, localizada na região noroeste de São Paulo, o grau de conservação atual coloca a região como a mais desmatada e fragmentada do Estado e com a menor concentração de Unidade de Conservação nos últimos tempos (KRONKA et al., 1993; BARROS et al., 2017).

Devido às alterações na Mata Atlântica provocada por sua devastação ao longo dos anos, esta foi subdividida em fragmentos de mata de diferentes tamanhos e fitofisionomias. Esta diversificação dos fragmentos age diretamente na dinâmica biológica das espécies, alterando a composição da diversidade local como no

equilíbrio dinâmico, taxas de crescimento, fluxo gênico entre outros (ALMEIDA et al, 2010). Entretanto, as áreas amostradas no presente estudo embora tenham certo grau de interferência antrópica elas têm sido monitoradas em sua preservação há longo tempo, favorecendo uma riqueza de espécies considerável para este gênero, podendo incluir inclusive novas espécies.

Espécies invasoras habitam tanto ambientes naturais, quanto ambientes urbanos, ao contrário de *D. willistoni* que tende a ser mais frequente em áreas não urbanizadas (GOTTSCHALK, 2004). Os drosofilídeos invasores mais comuns encontrados nas nossas coletas são *Z. indianus* e *S. latifasciaeformis* e do gênero *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. malerkotliana*, *D. ananassae*, *D. kikkawai*, *D. hydei*, *D. immigrans*, *D. repleta*, *D. virilis* e *D. busckii* (FERREIRA; TIDON, 2005; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; MATA et al, 2008; PENARIOL et al, 2008, PENARIOL et al, 2017, em preparação) e recentemente *D. suzukii* (SOUZA et al, 2013; RAMIREZ et al, 2013).

Nas coletas em NGR e MAT, sete espécies consideradas invasoras foram encontradas nas regiões investigadas. Com isso, as espécies invasoras coletadas com maior frequência em NGR (20,6%) e MAT (43%) foram: *Z. indianus*, *S. latifasciaeformis*, *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. malerkotliana*, *D. immigrans* e *D. ananassae*.

Ao compararmos as duas regiões na estação quente e úmida, as espécies nativas foram predominantes. Em NGR, 77,8% foram de espécies nativas. Em MAT, a porcentagem de indivíduos de espécies nativas foi de 91,6%. Já na estação fria e seca, em NGR, foram encontradas 88,5% de espécies nativas. Em MAT, na estação fria e seca, houve uma queda brusca nas espécies nativas coletadas, apenas 39,5% dos indivíduos. A alta porcentagem de espécies invasoras em MAT – 73,3% na estação fria e seca – também foi observada no trabalho de Rodhe et al. (2010), em que as espécies invasoras representaram 64,1% dos indivíduos coletados sob condições climáticas semelhantes. De toda a abundância de espécies invasoras coletadas em MAT, 58,3% foram de *D. simulans*.

Na cidade de NGR, *Z. indianus* foi coletada em menor quantidade na estação fria e seca (1) do que na estação quente e úmida (43). Em MAT, na estação fria e seca foram coletados 23 indivíduos de *Z. indianus*, enquanto na estação quente e úmida foram coletados apenas 18 indivíduos da mesma espécie. Segundo os dados de Gottschalk (2004), de pesquisas realizadas entre os anos de 2000 e 2003, a

sazonalidade pode influenciar diretamente na predominância de certas espécies. No mesmo trabalho, Gottschalk observou a predominância de *D. simulans* no inverno; igualmente, encontrou menor quantidade de *Z. indianus* em condições climáticas mais frias. A abundância da espécie *Z. Indianus* no período quente também foi encontrado em estudos anteriores (CASTRO; VALENTE, 2001; TIDON et al. 2003; SILVA et al. 2005; DE TONI et al. 2007). Para grande parte dessas espécies invasoras, o processo de invasão no Brasil é antigo, apenas *Z. indianus* é considerada uma espécie menos antiga, sendo registrada pela primeira vez no Brasil em 1999, numa região metropolizada de São Paulo (VILELA, 1999).

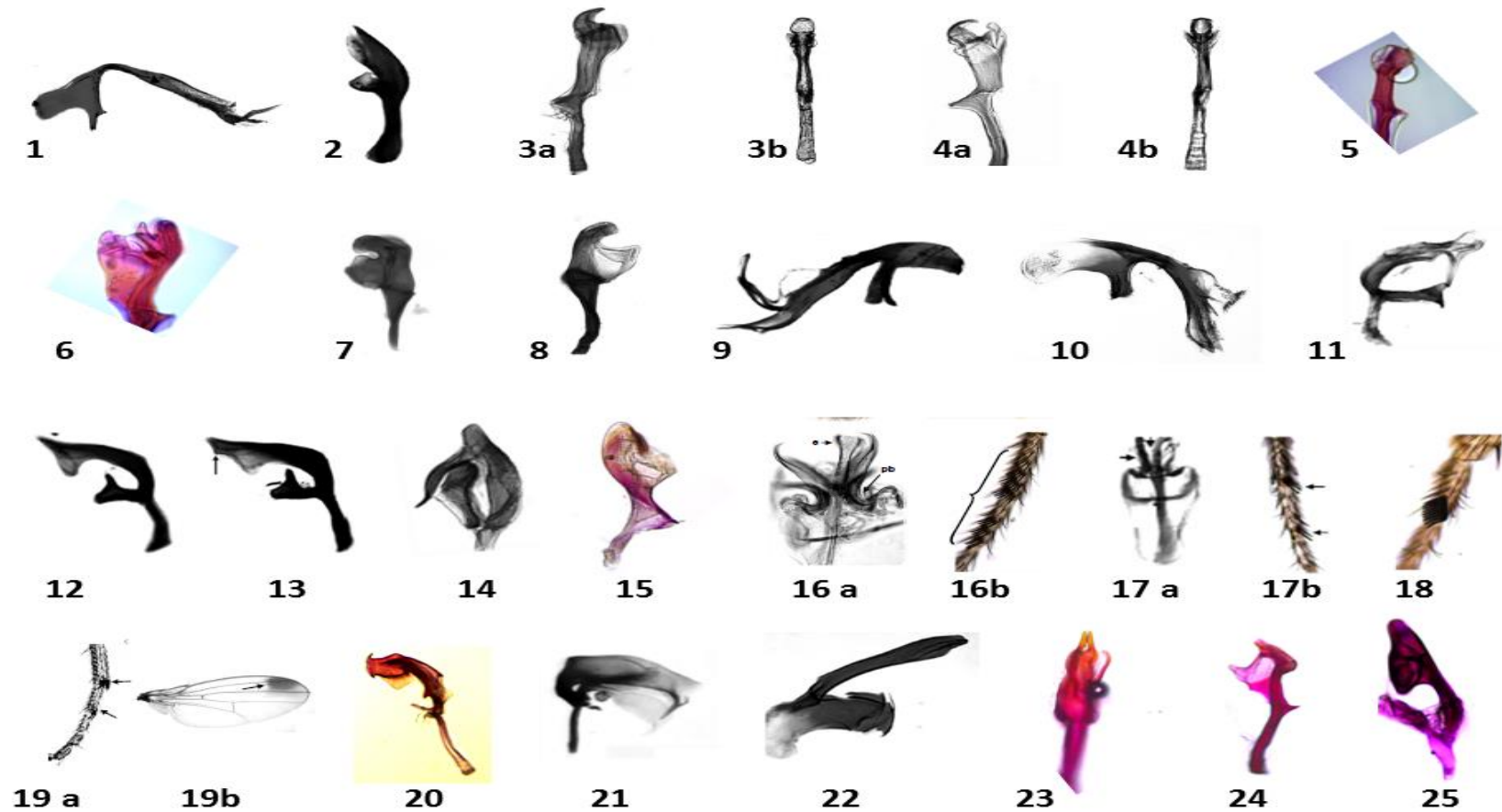
As espécies invasoras foram pouco abundantes nos fragmentos de PIC e SDC, foi observado em PIC a ocorrência de *Z. indianus*, *S. latifasciformes*, *D. simulans*, *D. melanogaster*, *D. immigrans*, *D. malerkotliana* e *D. ananassae*, representando 9,7% do total de drosofilídeos. E em SDC foi registrada apenas quatro espécies invasoras: *S. latifasciaeformis*, *Z. indianus*, *D. immigrans* e *D. simulans* representando menos do que 11% do total da assembléia de drosofilídeos identificadas, isto corrobora ainda mais o grau de preservação e estabilidade destas áreas, devido a associação das espécies invasoras com alta instabilidade ambiental (MACK et al. 2000; SIMBERLOFF, 2001).

Não foi observado um gradiente acentuado na distribuição das espécies ao longo dos transectos como ocorreu em outras áreas estudadas no interior do Estado de São Paulo (PENARIOL et al, 2008, PENARIOL et al 2017, em preparação) e outros biomas (CHAVES; TIDON, 2010). Em que espécies invasoras e mais resistentes às condições climáticas de temperatura e umidade, como *Z. indianus*, *D. simulans* e outras são mais abundantes na borda do fragmento e espécies mais sensíveis a mudanças ambientais ocorrem com maior abundância no interior da mata (Penariol et al., em preparação, 2018). Além das espécies invasoras, percebe-se certa predominância de indivíduos pertencentes ao grupo repleta na estação fria e seca, para o fragmento de MAT, e certa preferência pela borda dos transectos, isso ocorre devido sua preferencia por climas mais secos (MATEUS et al. 2006, HOCHMULLER, et al., 2010). Este grupo é encontrado em todos os ambientes brasileiros, sendo muito mais abundantes no cerrado (VILELA et al., 1983) e savana (MATA et al. 2008). *D. cardini*, também foi coleta nas regiões de NGR e MAT, estas possuem ampla distribuição, um dos motivos para sua versatilidade ecológica (HEED, 1957; PIPKIN, 1965; PIPKIN et al. 1966).

Com o decorrer dos anos, alterações na assembleia de drosofilídeos são esperadas devido às mudanças nas condições ambientais e a variação de recursos (DOBZHANSKY; PAVAN, 1950; PIPKIN, 1953). Com a complexidade ecológica, por causa de “n” fatores que influenciam de forma direta e indiretamente a *Drosophila* acabam ocorrendo imprevisibilidade na flutuação das espécies. Com isso, essa falta de padrão é um indicativo de que cada vez mais é necessária a preservação dos ambientes para que a composição da fauna não seja afetada.

Concluimos que o presente estudo mostrou que as armadilhas de dossel foram mais eficientes em MAT, tanto para a abundância de drosofilídeos quanto a riqueza de espécies em ambas estações. Já para as demais localidades, os valores de riqueza e abundancia foram muitos próximos. Nas áreas de MAT e NGR, *D. sturtevanti* foi a espécie mais abundante em todas as coletas na região quente e úmida, *D. simulans* e *D. mercatorum* para a estação fria e seca. E em relação à riqueza de espécies, não houve um período mais indicado para fazer coletas pois a assembleia de drosofilídeos varia muito de uma estação para outra, no entanto, na estação quente e úmida, encontramos maior abundância de drosofilídeos. Percebe-se também maior degradação na área de Nova Granada quando comparada com a área de Matão. No Parque Estadual de Picinguaba e o Parque Estadual da Serra da Cantareira, áreas maiores de preservação ambiental da Mata Atlântica, mostraram claramente pelo estudo da abundância dos drosofilídeos e da riqueza das espécies que estas áreas abrigam uma riqueza significativa de espécies de drosofilídeos da nossa fauna, tendo maior quantidade de riqueza e abundancia de espécies bioindicadoras de áreas mais preservadas. Com possibilidade da existência de novas espécies, análise em andamento, indicando a eficiência deste método de estudo para o monitoramento de áreas e avaliação do grau de preservação ambiental das mesmas.

Anexo 1. Edeagos de alguns drosofilídeos coletados nas áreas de estudo. Autoria de Gabriel Tripode e Bruna Trava. 1: *Drosophila buscki*; 2: *D. ararama*; 3a: *D. neocardini* vista lateral, 3b: vista frontal; 4a: *D. polymorpha* vista lateral, 4b: vista frontal; 5: *D. grisolineata*; 6: *D. guaraja*; 7: *D. guaru*; 8: *D. ornatifrons*; 9: *D. immigrans*; 10: *D. nasuta*; 11: *D. hydei*; 12: *D. mercatorum*; 13: *D. paranaensis*; 14: *D. senei*; 15: *D. paraguayensis*; 16a: *D. ananassae*, 16b: 1º e 2º tarso; 17a: *D. malerkotliana*, 17b: 1º e 2º tarso; 18: 1º e 2º tarso de *D. simulans* e *D. melanogaster*; 19 a: *D. Suzuki*, 19b: asa esfumada na ponta; 20: *D. capricorni*; 21: *D. willistoni*; 22: *Zaprionus indianus*; 23: *D. sp 1*; 24: *D. sp 3*; 25: *D. sp 4*.



REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.; BATISTA, J. L.; DAMASCENA, L.S. Análise da Fragmentação dos Remanescentes de Mata Atlântica na APA do Pratigi para a Identificação de áreas com maior potencial para a Construção de Corredores Ecológicos. III Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação, p.1-8, 2010.
- BIZZO, L.; GOTTSCHALK, M. S.; TONI, D. C.; HOFMANN, P.R.P. Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potencial as bioindicator in open environments. *Iheringia, Série. Zoologia*, v.100, p.185-191, 2010.
- CHAVES, N. B.; TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savana. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.52(3), p.340-348, 2008.
- FERREIRA, L. B.; TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodiversity and Conservation*, v. 14, p. 1809-1821, 2005.
- FOOTE, D.; CARSON, H. L. Drosophila as monitor of change in hawailian ecosystems. *Our Living Resources. National Biological Service*, p. 1-9, 2004.
- FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo de Drosophila. *Cultus*, n. 5, p. 71, 1949.
- GOTTSCHALK, M.S. Influência da urbanização sobre assembleias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. 2004.
- INPE. ATLAS DOS REMANESCENTES FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA PERÍODO 2008-2010. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, p.1-120, 2011.
- KANESHIRO, K. Y. A study of the relationship of Hawaiian Drosophila species based on external male genitalia. *The University of Texas Publication*, v. 6918, p. 55-70, 1969.
- KREBS, C. J. *Ecological methodology*. Addison Wesley Educational Publishers, p. 654, 1999.
- MACK, R.N.; SIMBERLOFF, D.; LONSDALE, W.M.; EVANS, H.; CLOUT, M.; BAZZAZ, F.A. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, v. 10, p. 689–710, 2000.
- MATA, R. A.; MC GEOCH, M; TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. *Biodiversity Conservation*, v. 17, p. 2899-2916, 2008.
- ODUM, E. P. *Ecologia*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988.
- PARSON, P. A. Biodiversity conservation under global climatic change: the insect Drosophila as a biological indicator. *Global Ecology and Biogeography*, v.1, p. 1195-1198, 1991.
- PENARIOL, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MADI-RAVAZZI, L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. *Biota Neotropical*, v. 8(2), 2008. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v8n2/pt/abstract?article+bn00408022008>.

RAMIREZ, F. M.; VANDERLINDE, T.; BIZZO, L. E. M.; SCHMIDT, H. J.; DE TONI, D. C. First record of *Drosophila suzukii* in Santa Catarina State. In: SIMPÓSIO DE ECOLOGIA, GENÉTICA E EVOLUÇÃO DE DROSOPHILA. Anais. Porto de Galinhas, v. 1, p. 40-40, 2013.

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

SIMBERLOFF, D. Biological invasions – how are they affecting us and what can we do about them? Western North American Naturalist, v. 61, p.308–315, 2001.

SOUZA, D. S.; VALER, F. B.; CORDEIRO, J.; GOTTSCHALK, M. S. Primeiro registro de *Drosophila suzukii* no Brasil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, Anais. Pelotas, RS: UFPEL, 2013. Disponível em: <http://cti.ufpel.edu.br/cic/arquivos/2013/CB_03132.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2014.

SOUZA, T.A.J.; NOLL, F.B.; BICUDO, H.E.M.D.C.; MADI-RAVAZZI, L. Scanning Electron Microscopy of Male Terminalia and Its Application to Species Recognition and Phylogenetic Reconstruction in the *Drosophila saltans* Group. PLoS ONE, v.9, n.6, 2014.

TORRES, F. R.; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp (Diptera) in two woodlond in the state of São Paulo, Brazil. Iheringia, Serie Zoologia, v. 96, n. 4, p. 437-444, 2006.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomics studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, v. 63, p. 1 - 332, 1990.

VILELA, C. R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Drosophila* Information Service, v. 82, p. 37- 39, 1999.

3 CONCLUSÕES

- Não foi possível utilizar por meio da técnica de transferibilidade os microsátélites específicos de *D. mediopunctata* para as populações de *D. sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*, grupo *saltans*).
- Foram desenvolvidos 16 iniciadores de microssátélites específicos para *Drosophila sturtevantii*, sendo que destes 13 amplificaram e 11 foram polimórficos.
- A transferibilidade dos 13 marcadores microssátélites desenvolvidos para *Drosophila sturtevantii* foi realizada com sucesso em 15 espécies do grupo *saltans* de *Drosophila* o que irá permitir estudos populacionais utilizando estes marcadores para este grupo de espécies.
- Os marcadores microssátélites desenvolvidos para a espécie *Drosophila sturtevantii* foram eficientes para a caracterização da estrutura de nove populações geográficas desta espécie em diferentes fitofisionomias de Mata Atlântica.
- No estudo populacional realizado com *D. sturtevantii* todos os 11 locos de microssátélites foram polimórficos, dois deles se destacaram por serem monomórficos em algumas populações e em outras apresentarem somente dois alelos.
- Os locos não se encontram em equilíbrio de H-W, indicando que algum fator evolutivo, como a deriva genética, o fluxo gênico ou mesmo a seleção natural pode estar atuando.
- Os 11 locos produziram um total de 109 alelos com uma média de 10 alelos por locos, variando de 2 a 16 alelos entre os microssátélites.
- Embora o teste de Mantel indicou a inexistência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas na análise de distância e identidade genética de Nei a menor distância genética foi encontrada entre populações de maior proximidade geográfica (140km), MAT e NGR. A maior distância genética foi obtida entre populações de grande distância geográfica (683 km), MAT e RDI.
- A estatística F de Wright indicou diferenciação genética moderada entre todas as populações e o índice de fixação de Wright revelou alta deficiência de

heterozigotos que pode ser resultado de alelos nulos, efeito Wahlund, endogamia ou processos demográficos.

- A população a qual apresentou maior nível de heterozigotos foi a de SDC/ SP, que se encontra na área de maior extensão e altitude amostrada, com alto grau de preservação ambiental, o cinturão verde da cidade de São Paulo.
- A população com o nível mais baixo de heterozigosidade foi GUA (PB), devido a um recente gargalo genético sofrido por esta população, advindo provavelmente de uma queimada ocorrida na área da Reserva.
- A população mais diferenciada de *D. sturtevanti* provém de uma ilha de Santa Catarina (Ribeirão da Ilha), com bioma de Floresta Ombrófila Densa e é uma área de preservação ambiental de difícil acesso. Esta população também apresentou o menor índice de fluxo gênico e maior distância genética.
- Em biodiversidade, concluímos que o presente estudo mostrou que as armadilhas de dossel foram mais eficientes em MAT, tanto para a abundância de drosofilídeos quanto a riqueza de espécies em ambas estações. Já para as demais localidades os valores de riqueza e abundancia foram muitos próximos.
- Nas áreas de MAT e NGR, *D. sturtevanti* foi a espécie mais abundante em todas as coletas na região quente e úmida, *D. simulans* e *D. mercatorum* para a estação fria e seca. E em relação à riqueza de espécies, não houve um período mais indicado para fazer coletas pois a assembleia de drosofilídeos varia muito de uma estação para outra, no entanto, na estação quente e úmida, encontramos maior abundância de drosofilídeos.
- Percebe-se também maior degradação na área de Nova Granada quando comparada com a área de Matão. No Parque Estadual de Picinguaba e o Parque Estadual da Serra da Cantareira, áreas maiores de preservação ambiental da Mata Atlântica, mostraram claramente pelo estudo da abundância dos drosofilídeos e da riqueza das espécies que estas áreas abrigam uma riqueza significativa de espécies de drosofilídeos da nossa fauna, tendo maior quantidade de riqueza e abundancia de espécies bioindicadoras de áreas mais preservadas.

REFERÊNCIAS

- ACHMANN, R.; CURIK, I.; DOVC, P.; KAVAR, T.; BODO, I.; HABE, F.; MARTI, E.; SÖLKNER, J.; BREM, G. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. **Animal Genetics**, v. 35, p. 285-292, 2004.
- ACURIO, A., RAFAEL, V., CESPEDES, D.; RUIZ, A. Description of a new spotted-thorax *Drosophila*: Drosophilidae species and its evolutionary relationships inferred by a cladistic analysis of morphological traits. **Annals of the Entomological Society**, v. 106(6), p. 695–705, 2013.
- ACURIO, A.; RAFAEL, V.; DANGLES, O. Biological invasions in the Amazonian Tropical Rain Forest: The case of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in Ecuador, South America. **Biotropical**, v. 42(6), p. 717-723, 2010.
- AVONDET, J. L.; BLAIR, R. B.; BERG, D. J.; EBBERT, M. A. *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. **Environmental Entomology**, v. 32, n.2, p. 347-358, 2003.
- BÄCHLI, G. TAXODROS: The database on taxonomy of Drosophilidae. Eletronic Database accessible at <http://www.taxodros.uzh.ch/>. 2015.
- BAJAY, M.M.; ZUCCHI, M.I.; KIIHL, T.A.M.; BATISTA, C.E.A.; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J.B. Development of a novel set of microsatellite markers for castor bean, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v.98, p. 87-89, 2011.
- BALANYA, J.; OLLER, J. M.; HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; SERRA, L. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. **Science**, v. 313, p. 1773-1775, 2006.
- BIZZO, L.; GOTTSCHALK, M. S.; TONI, D. C.; HOFMANN, P.R.P. Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potencial as bioindicator in open environments. **Iheringia, Série. Zoologia**, Porto Alegre. v. 100, n.3, p.185-191, 2010.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, p.1187–1201, 2008.
- CASWELL, H. Matrix Population Models: Construction, Analysis and Interpretation. Sunderland: **Sinauer Associates**, 2001.
- CHAMBERS, G. K., MACAVOY, E. S. Microsatellites: Consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 455-476, 2000.
- DIERINGER, D., NOLTE, V., SCHLÖTTERER, C. Population structure in African *Drosophila melanogaster* revealed by microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 563-573, 2005.

EALLES, J.; THORPE, R.S.; MALHOTRA, A. Weak founder effect signal in a recent introduction of Caribbean Anoli. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1416-1426, 2008.

FERREIRA, L.B.; TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Conservation Biology**, v. 14, p. 1809–1821, 2005.

FOOTE, D.; CARSON, H. L. *Drosophila* as monitor of change in hawaiian ecosystems. Our Living Resources. National Biological Service, Disponível em: <http://biology.usgs.gov/s+t/noframe/t233.htm>. p. 1-9, 2004.

FRAIMOUT, A.; LOISEAU, A.; PRICE, D.K.; XUÉREB, A.; JEAN-FRANÇOIS, M.; VITALIS, R.; FELLOUS, S.; DEBAT, V.; ESTOUP, A. New set of microsatellite markers for the spotted-wing *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A promising molecular tool for inferring the invasion history of this major insect pest. **European Journal of Entomology**, v.112(4), p. 1-5, 2015.

FRANCK, P.; CAMERON, E.; GOOD, G.; RASPLUS, J. Y.; OLDROYD, B. P. Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2317-2331, 2004.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE. Atlas dos remanescentes florestais de Mata Atlântica. Período 2000-2005. São Paulo. 2016.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Fundação SOS Mata **Atlântica. Conservação Internacional**. Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade. p. 1-22, 2005.

GEE, J. M. Gene flow across a climatic barrier between hybridizing avian species, California and Gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*). **Evolution**, v. 58, p. 1108-1121, 2004.

GEISLER, F. C. S., SANTOS, J., HOLDEFER, D.R., GARCIA, F. R. M. Primeiro registro de *Drosophila suzukii* (MATSUMURA, 1931) (diptera: drosophilidae) para o estado do paraná, brasil e de novos hospedeiros. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 9, p. 125-129, 2015.

GOTTSCHALK, M.S., MARTINS, M.B., PRAXEDES, C.L.B. ; MEDEIROS, H.F. A new Amazonian species from the *Drosophila annulimana* species group (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira Entomológica**, v. 56(4): p.431–435, 2012.

GUILLÍN, E.R.; RAFAEL, V. Three new species of *Drosophila tripunctata* group (Diptera: Drosophilidae) in the eastern Andes o Ecuador. **Revista Peruana de Biología**, v.22(3), p.289–296, 2015.

HOCHMÜLLER, C.J.C.; LOPES-DA-SILVA, M.; VALENTE, V.L.S.; SCHMITZ, H.J. The drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa

and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.50(19), p. 285-295, 2010.

HUTCHISON, D.; TEMPLETON, A. R. Correlation of pair-wise genetic and geographic distance measures inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution**, v. 53, p. 1898-1914, 1999.

JUNGES, J., GOTTSCHALK, M.S., LORETO, E.L.S.; ROBE, L.J. Two new species of *Mycodrosophila* (diptera: Drosophilidae) proposed by molecular and morphological approaches, with a key to American species. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p.30–39, 2016.

KIMBERLY, A.; SELKOE, R.; TOONEN, J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006

LEGRAND, D., VAUTRIN, D.; LACHAISE, D.; CARIOU, M.L. Microsatellite variation suggests a recent fine-scale population structure of *Drosophila sechellia*, a species endemic of the Seychelles archipelago. **Genetic**, v. 139 (7), p. 909-19, 2011.

LITT, M., LUTY, J. A. A. Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 398-401, 1989.

MARQUES, J. S. Epífitas vasculares em diferentes estágios sucessionais de um fragmento urbano de Floresta Estacional Semidecidual. **Dissertação da Pós Graduação em Ecologia**. Universidade Federal de Juiz de Fora. p. 1-80, 2016.

MATA, R. A.; MCGEOCH, M.; TIDON R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biodiversity Conservation**, 2008.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Population genetic study of allozyme variation in natural populations of *Drosophila antonietae* (Insecta, Diptera). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45(2), p.136–143, 2007.

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

MEDEIROS, H. F. Relações entre características bionômicas e fisiológicas de espécies de *Drosophila* e a distribuição de suas abundâncias na natureza. **Tese (Doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOREAUX, J.; FONSECA, G.A.B. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. **Cemex**, 2004.

MOGES, A.D.; ADMASSU, B.; BELEW, D.; YESUF, M.; NJUGUNA, J.; KYALO, M.; GHIMIRE, S.R. Development of Microsatellite Markers and Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. **Plos one**, v. 11(3), p. 1-18, 2016.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A, MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p.853-858, 2000.

OLIVEIRA, F. A.; CIDADE, F. W.; FÁVERO, A. P.. VIGNA, B. B. Z.; SOUZA, A. P. First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the Plicatula group. **BMC Res Notes**, v.9, p.511, 2016.

PARSON, P. A. Biodiversity conservation under global climatic change: the insect *Drosophila* as a biological indicator? *Global Ecology and Biogeog.* **Letters**, v.1, p. 1195-1198, 1991.

PATTEN, M. A., ROTENBERRY, J. T., ZUK, M. Habitat selection, acoustic adaptation, and the evolution of reproductive isolation. **Evolution**, v. 58, p. 2144-2155, 2004.

PENARIOL, L. V.; MADI-RAVAZZI, L. Drosophilid assemblages as indicators for conservation monitoring. **SpringerPlus**, v.2, p. 114, 2013.

PENARIOL, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MADI-RAVAZZI, L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropical**. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v8n2/pt/abstract?article+bn00408022008>. v. 8, n.2, 2008.

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 description of new *Rhinoleucophenga* species. **Zootaxa**, v. 3779(2), p.215–2145, 2014.

POULAKAKIS, N., ANTONIOU, A., MANTZIOU, G., PARMAKELIS, A.; SKARTSI, A.; VASILAKIS, D.; ELORRIAGA, J., DE LA PUENTE, J.; GAVASHELISHVILI, A.; GHASABYAN, M. T. Population structure, diversity, and phylogeography in the near-threatened Eurasian black vultures *Aegypius monachus* (Falconiformes; Accipitridae) in Europe: insights from microsatellite and mitochondrial DNA variation. **Biological Journal of the Linnean Society**, p. 1-14, 2008

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

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Londrina, Ed. Planta, 327p., 2001.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest

distributed: implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1144-1156, 2009.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, v.10, p.201-210, 2004.

SANCHEZ, G, E., SILVA-CABALLERO, A., DEL REAL-MONROY, M., LANCE, S.L., VALENZUELA-GALVAN, D. AND ORTEGA, J. Development of 24 Microsatellite Markers for the White Nosed Coati (*Nasua narica*) Using 454 Sequencing. **Conservation Genetics Resources**, v.4, p.661-663, 2012.

SANTA-BRÍGIDA, R., SCHMITZ, H.J., MARTINS, M.B. *Drosophilidae* (Insecta, Diptera) in the state of Pará (Brazil). **Biota Neotropical**, v. 17(1), p. 1-9, 2017.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615–629, 2006.

SILVA, J.C.; KIDWELL, M.G. Evolution of P Elements in Natural Populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. **Genetics Society of America**, v. 168, p. 1323-1335, 2004.

SILVA, J.M.C., CASTELETI, C.H.M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C. & CÂMARA, I.G. (Eds.). *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. Belo Horizonte: **Fundação SOS Mata Atlântica Conservação Internacional**, p. 43-59, 2005.

SILVA-CABALLERO, A.; LEÓN-ÁVILA, G.; VALENZUELA-GALVÁN, D.; MALDONADO, J. E. Patterns of genetic diversity of the white-nosed coati reveals phylogeographically structured subpopulations in Mexico. **Natural Resources**, v. 8, p. 31-53, 2017.

STREIFF, R.; VEYRIER, R.; AUDIOT, P.; MEUSNIER, S.; BROUAT, C. Introgression in natural populations of bioindicators: a case study of *Carabus splendens* and *Carabus punctatoauratus*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3775-3786, 2005.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v.1, 2005.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TEMPLETON, A. R. Genética de populações e Teoria Microevolutiva. **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 1-705, 2011.

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

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

TIDON, R., GOTTSCHALK, S.M., MARTINS, M.B. & SCHIMTZ, H.J. CTFB: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. 2015. Eletronic Database accessible at <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC>. do. (last access in 19 september 2017).

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F.M. *Drosophila*. In: C.R.F. Brandão; E.M. Canello (eds.). *Invertebrados terrestres. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX*, **FAPESP**, São Paulo, p. 247-261, 1999.

TORRES, F. R.; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp (Diptera) in two woodlond in the state of São Paulo, Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 96, n. 4, p. 437-444, 2006.

VAL, F.C.; MARQUES, M.D.; VILELA, C.R. Drosophilidae of Neotropical region. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. **Academic Press**, Orlando, p. 123–168, 1981.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WHEELER, M.R. The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. **Academic Press**, Orlando, p.1–97, 1982.

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