

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/03/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Fernanda Paixão

Diversidade genética de *Drosophila prosaltans* e *D. austrosaltans* (Diptera, Drosophilidae) de regiões de Mata Atlântica avaliada por marcadores microssatélites

São José do Rio Preto
2020

Jéssica Fernanda Paixão

Diversidade genética de *Drosophila prosaltans* e *D. austrosaltans* (Diptera, Drosophilidae) de regiões de Mata Atlântica avaliada por marcadores microssatélites

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao 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.

Financiadoras:
FAPESP – Proc. 2014/14059-0 e
2016/11994-5
CAPES

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

São José do Rio Preto
2020

P149d	<p>Paixão, Jéssica Fernanda</p> <p>Diversidade genética de <i>Drosophila prosaltans</i> e <i>D. austrosaltans</i> (Diptera, Drosophilidae) de regiões de Mata Atlântica avaliada por marcadores microssatélites / Jéssica Fernanda Paixão. -- São José do Rio Preto, 2020</p> <p>88 f. : il., tabs., mapas</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Lilian Madi-Ravazzi</p> <p>1. Genética de populações. 2. Evolução. 3. <i>Drosophila</i>. 4. Microssatélites. 5. Mata Atlântica. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica Fernanda Paixão

**Diversidade genética de *Drosophila prosaltans* e *D. austrosaltans*
(Diptera, Drosophilidae) de regiões de Mata Atlântica avaliada por
marcadores microssatélites**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao 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.

Financiadoras:
FAPESP – Proc. 2014/14059-0 e 2016/11994-5
CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Lilian Madi-Ravazzi
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Adriana Coletto Morales
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Prof^a. Dr^a. Luciana Paes de Barros Machado
UNICENTRO – Câmpus de Guarapuava

São José do Rio Preto
02 de março de 2020

Àqueles que com amor acreditaram em meu potencial
e me incentivaram a percorrer esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua fidelidade, graça, amor e misericórdia que me sustentaram durante as dificuldades, permitindo que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus pais por todo apoio, instrução e afeto sinceros e incondicionais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi, pela oportunidade, confiança em meu potencial, suporte e orientação desde minha Iniciação Científica.

Aos companheiros e ex-companheiros do Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de *Drosophila*, Gabriel, Bruna Trava, Bruna Emília, Samara, Segala, Larissa e Natália pela convivência amigável e pelos ensinamentos. Em especial, agradeço à Bruna Trava e à Samara pelo treinamento no Laboratório de Biologia Molecular e pelo auxílio na etapa de desenho dos oligonucleotídeos de microssatélites. À Bruna Emília pelo desenvolvimento da biblioteca genômica que possibilitou este trabalho.

Ao Tião, à Larissa e à Natália, pelo preparo do meio de cultura para manutenção dos estoques e por todo o auxílio com o repique das linhagens.

Ao Ricardo Quitério, meu sincero agradecimento, por ter me auxiliado com a genotipagem dos géis, organização das matrizes, análises e pelas palavras amigas em tempos difíceis.

Ao Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus e à Profa. Dra. Luciana Paes de Barros Machado pelas válidas orientações durante a análise dos dados e discussão dos resultados.

Às bibliotecárias, Luciane e Gislaíne, pela correção das referências.

Ao Ibilce/Unesp, ao Programa de Pós-graduação em Biociências e ao Departamento de Biologia, meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa, sob os processos nº 2014/14059-0 e 2016/11994-5.

A todos que fizeram parte da minha formação acadêmica e que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Drosophila prosaltans e *Drosophila austrosaltans*, do grupo *saltans* de *Drosophila*, são espécies neotropicais com distribuição em áreas florestais da América Central e do Sul e que podem ser encontradas em simpatria. A literatura sobre o grupo *saltans* de *Drosophila* é escassa e muitos trabalhos não são tão recentes. Assim, poucas são as informações disponíveis sobre os aspectos biológicos de ambas as espécies. Para *D. prosaltans*, existem trabalhos de isolamento reprodutivo, estrutura e polimorfismo cromossômico que apontam uma diferenciação de suas populações, entretanto, as informações em relação à diferenciação populacional de *D. austrosaltans* são praticamente inexistentes. Tal fato nos motivou a investigar os padrões de diversidade genética populacional dessas espécies provenientes de diferentes fitofisionomias de Mata Atlântica utilizando os microssatélites como marcador molecular. Foram desenvolvidos oligonucleotídeos de microssatélites específicos para *D. prosaltans*, cuja transferibilidade testada para *D. austrosaltans* mostrou resultados positivos. Identificamos na análise de 12 locos para *D. prosaltans*, uma alta heterozigosidade média ($H_o = 0.45 \pm 0.03$) e uma diferenciação genética populacional moderada ($F_{st} = 0.17 \pm 0.02$). Foi observada a formação de dois agrupamentos genéticos distintos nas populações de *D. prosaltans*, que não se correlacionam com a distribuição regional ou de fitofisionomia das populações, podendo esse padrão ser decorrente de características ecológicas, polimorfismo ancestral compartilhado, mutação recorrente e deriva genética (efeito do fundador). O êxito na amplificação heteróloga de mais de 50% desses locos para *D. austrosaltans*, possibilitou uma análise comparativa de ambas as espécies, a qual revelou níveis similares de diversidade genética para as mesmas, que podem estar associados às características ecológicas (que carecem de investigações mais detalhadas) ou à ação de fatores evolutivos de intensidade semelhante nas regiões de sobreposição da distribuição geográfica das espécies. O elevado grau de polimorfismo desses marcadores e sua eficiência na amplificação cruzada sugerem sua potencialidade para estudos populacionais de diversidade genética não somente das espécies aqui estudadas, mas também para as demais espécies do subgrupo e do grupo *saltans* de *Drosophila*.

Palavras-chave: Estrutura populacional. SSR. Grupo *saltans* de *Drosophila*. Marcadores genéticos.

ABSTRACT

Drosophila prosaltans and *Drosophila austrosaltans*, from the *Drosophila saltans* group, are neotropical species with distribution in forest areas of Central and South America and that can be sympatric. The literature on the *Drosophila saltans* group is scarce and many works are not so recent. Thus, little information is available on the biological aspects of both species. For *D. prosaltans*, there are works of reproductive isolation, structure and chromosomal polymorphism that point to a differentiation of its populations, however, the information regarding the population differentiation of *D. austrosaltans* is practically nonexistent. This fact motivated us to investigate the patterns of population genetic diversity of these species from different Atlantic Forest phytogeographic regions using microsatellites as a molecular marker. Microsatellite oligonucleotides specific for *D. prosaltans* were developed, whose transferability tested for *D. austrosaltans* showed positive results. In the analysis of 12 loci for *D. prosaltans*, we identified a high mean heterozygosity ($H_o = 0.45 \pm 0.03$) and a moderate population genetic differentiation ($F_{st} = 0.17 \pm 0.02$). The formation of two distinct genetic groups was observed in *D. prosaltans* populations, which do not correlate with the regional or phytogeographic distribution of the populations, and this pattern may be due to ecological characteristics, shared ancestral polymorphism, recurrent mutation and genetic drift (founder effect). The success in heterologous amplification of more than 50% of these loci for *D. austrosaltans*, enabled a comparative analysis of both species, which revealed similar levels of genetic diversity for them, which may be associated with ecological characteristics (who need more detailed investigations) or to the action of evolutionary factors of similar intensity in the overlapping regions of the geographic distribution of species. The high degree of polymorphism of these markers and their efficiency in cross amplification suggest their potential for population studies of genetic diversity not only for the species studied here, but also for the other species of the subgroup and the *Drosophila saltans* group.

Keywords: Population structure. SSR. *Drosophila saltans* group. Genetic markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo I

- Figura 1. Mapa com as populações de *D. prosaltans* cujas amostras foram coletadas e analisadas. 28
- Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com as oito populações de *D. prosaltans* gerada a partir das distâncias genéticas pelo programa GenAlEx. 39
- Figura 3. Estrutura genética das oito populações de *D. prosaltans* gerada pela análise do STRUCTURE. N = Região Norte; SE = Região Sudeste; S = Região Sul. As siglas das populações podem ser consultadas na Tabela 1. 42
- Figura 4. Árvore *Neighbor-joining* obtida para as oito populações de *D. prosaltans* usando a Distância Genética de Nei (1978). Os ramos em laranja e azul representam o padrão de agrupamento concordante com o resultado do STRUCTURE. As cores das siglas das populações representam as fitofisionomias de Mata Atlântica conforme as informações da Figura 3. 43
- Figura 5. Análise de Correspondência Canônica para as populações de *D. prosaltans*. 44

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1. Informações sobre as populações de Mata Atlântica de <i>D. prosaltans</i> estudadas no presente trabalho.	27
Tabela 2. Oligonucleotídeos de microssatélites desenvolvidos para <i>D. prosaltans</i> .	30
Tabela 3. Condições de PCR para <i>D. prosaltans</i> após a padronização dos oligonucleotídeos.	32
Tabela 4. Conteúdo de Informação Polimórfica (<i>PIC</i>), frequência de alelos nulos (<i>An</i>) e riqueza alélica por loco (<i>Ar</i>).	35
Tabela 5. Nível de diversidade genética (\pm erro padrão) das oito populações de <i>D. prosaltans</i> de Mata Atlântica analisadas. <i>Na</i> – Número médio de alelos; <i>Ne</i> – Número médio efetivo de alelos; <i>Ho</i> – Heterozigosidade média observada; <i>He</i> – Heterozigosidade média esperada; <i>F</i> – Índice de Fixação; <i>H-W</i> – Lista de locos com desvio das expectativas de Hardy-Weinberg; <i>Np</i> – Número de alelos exclusivos; <i>Ap</i> – Frequência média dos alelos exclusivos.	37
Tabela 6. Estatística <i>F</i> de Wright (<i>Fis</i> , <i>Fit</i> e <i>Fst</i>) e número de migrantes (<i>Nm</i>) de todas as populações pelo GenAIEx e <i>Fst</i> com correção para alelos nulos pelo FreeNA.	38
Tabela 7. Distância genética de Nei (1978) entre as populações calculada pelo programa GenAIEx.	40
Tabela 8. Valores de <i>Fst</i> par a par calculados pelo programa GenAIEx.	40
Tabela 9. Valores de <i>Gst</i> par a par calculados pelo programa GenAIEx.	40
Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) sem hierarquia e com hierarquia segundo resultados do STRUCTURE (Agrupamento 1= CUR, MAT, SDC e VIT; Agrupamento 2= ADB, NGR, PIC e ELD). <i>DF</i> = <i>degrees of freedom</i> (graus de liberdade); <i>SS</i> = <i>sum of squares</i> (soma dos quadrados); <i>MS</i> = <i>mean square</i> (média quadrática); <i>VC</i> = <i>variance component</i> (componente de variância); %PV = porcentagem de variação total.	43

LISTA DE TABELAS

Artigo II

Table 1. Microsatellite primers developed for <i>D. prosaltans</i> .	57
Table 2. Information on Atlantic Forest populations of <i>D. austrosaltans</i> .	58
Table 3. Data on the transferability of species-specific microsatellites primers from <i>D. prosaltans</i> to <i>D. austrosaltans</i> .	58

Artigo III

Table 1. Descriptive analyzes of the genetic diversity of microsatellites of the species.	64
Table 2. Data on genetic diversity of <i>D. prosaltans</i> and <i>D. austrosaltans</i> (mean \pm standard error).	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADB	População de Adahil Barreto
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i>
Ap	Frequência alélica dos alelos exclusivos
Ar	Riqueza alélica
CCA	Análise de Correspondência Canônica
COI	Citocromo Oxidase Subunidade 1
CUR	População de Curió
D	Distância genética de Nei (1978)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ELD	População de Eldorado do Sul
F	Índice de fixação
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fis	Desvio do EHW dentro das subpopulações
Fit	Desvio do EHW na população total
Fst	Desvio do EHW entre as subpopulações
F1	Primeiros descendentes da geração parental
ha	Hectares
He	Heterozigosidade média esperada
Ho	Heterozigosidade média observada
H₂O UP	Água Ultrapura
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
K	Número de agrupamentos
mM	Milimolar
MAT	População de Matão
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
µl	Microlitros
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mg/ml	Miligrama por mililitro
N	Região Nordeste do Brasil

Na	Número médio de alelos
Ne	Número efetivo de alelos
NGR	População de Nova Granada
Nm	Número de migrantes
Np	Número de alelos exclusivos
N°	Número
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCoA	<i>Principal Coordinates Analysis</i>
PIC	População de Serra do Mar – Núcleo Picinguaba
PIC	<i>Allelic Polymorphic Information Content</i>
rpm	Rotações por minuto
S	Região Sul do Brasil
SE	Região Sudeste do Brasil
SDC	População de Serra da Cantareira
SMM	<i>Stepwise Mutation Model</i>
SP	Estado de São Paulo
SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
Ta	Temperatura de anelamento
Tm	Temperatura de fusão
TPM	<i>Two Phase Model</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VIT	População de Vitória
° C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Estrutura populacional	14
1.2	Microssatélites	16
1.3	Mata Atlântica: o bioma das populações estudadas	18
1.4	As espécies em estudo: <i>Drosophila prosaltans</i> e <i>D. austrosaltans</i>	20
1.5	Objetivos	23
1.5.1	Objetivo Geral	23
1.5.2	Objetivos Específicos	23
2	Artigo I - Diversidade genética de <i>Drosophila prosaltans</i> (Diptera, Drosophilidae, subgrupo <i>saltans</i>) de regiões de Mata Atlântica avaliada por microssatélites espécie-específicos	24
	Resumo	24
	Introdução	24
	Materiais e Métodos	26
	Resultados	35
	Discussão	45
	Conclusão	51
	Referências	51
3	Artigo II - Transferability of species-specific microsatellite primers from <i>D. prosaltans</i> to <i>D. austrosaltans</i>	56
	Abstract	56
	Introduction	56
	Materials and Methods	57
	Results and Discussion	59
	References	60
4	Artigo III - Genetic variability assessed by microsatellites in sympatric species <i>D. prosaltans</i> and <i>D. austrosaltans</i> (Diptera, Drosophilidae, <i>saltans</i> group)	61
5	CONCLUSÃO GERAL	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A – Genotipagem dos géis	79

APÊNDICE B – Frequências alélicas por loco e por população para a espécie <i>D. prosaltans</i>	81
APÊNDICE C – Análise de Variância Molecular (AMOVA) hierarquizada quanto à distribuição de regiões geográficas e fitofisionomias de Mata Atlântica para as populações de <i>D. prosaltans</i>	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura populacional

Elucidar os processos relacionados à origem e manutenção da variabilidade genética nas populações naturais é uma das tarefas realizadas pelos biólogos que trabalham com genética de populações e evolução. A caracterização da variabilidade genética de uma espécie pode fornecer informações para o entendimento de sua história evolutiva e demográfica, bem como de seu padrão de estrutura populacional. Por estrutura populacional entende-se a variabilidade genética observada dentro e entre populações de uma determinada espécie, sua distribuição no espaço e no tempo, e a forma como a atuação de forças evolutivas, como a seleção natural, deriva genética, mutação e fluxo gênico influencia a dinâmica dessas populações (LEE; MITCHELL-OLDS, 2011; RODERICK et al., 2012). Atualmente, existe interesse em avaliar a contribuição de fatores ambientais e geográficos na formação da estrutura das populações e a maneira como eles estão correlacionados com a variabilidade genética encontrada nas mesmas (MANEL et al., 2010; WU et al., 2016; POURNOSRAT et al., 2018).

A variabilidade genética pode ser entendida como a variedade de alelos e genótipos presentes em um grupo sob estudo, seja ele um grupo de populações, espécies ou até mesmo grupos de espécies. Pode ser medida usando-se estimativas genéticas como polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica. Dois aspectos importantes relacionam-se com o estudo da variabilidade genética das populações quando esta está sendo moldada pela seleção natural. O primeiro é a relação da variabilidade genética e a evolução das populações adaptadas às mudanças ambientais, um processo que ocorre de maneira contínua. O segundo é a relação entre a perda da variabilidade genética associada com a endogamia e, conseqüentemente, com a redução geral do valor adaptativo, mensurado a partir das taxas de reprodução e sobrevivência. Embora esses processos sejam fundamentais, eles não são únicos, já que a deriva genética pode ser uma força evolutiva atuante nas populações, que pode levar à fixação casual de alguns alelos e à conseqüentes mudanças nos níveis de variabilidade genética (FRANKHAM et al., 2008).

Mutação, migração, fluxo gênico, seleção natural e deriva genética são os fatores fundamentais da evolução das populações, que podem atuar nas mesmas

aumentando ou diminuindo os níveis de diversidade genética. A ação dos mesmos e sua correlação com eventos históricos e contemporâneos, demográficos e ambientais, determina a forma como essa diversidade genética é distribuída entre as populações, isto é, quão estruturada ela se encontra. Uma vez detectado esse padrão de estruturação populacional, inferências podem ser feitas a respeito da história evolutiva e/ou demográfica das populações, correlacionando a diversidade genética aos fatores evolutivos e o ambiente onde essas populações se inserem. As populações naturais geralmente apresentam elevados níveis de variabilidade genética, todavia, as quantidades relativas de variações dentro e entre populações mudam de espécie para espécie, dependendo da história evolutiva e características ecológicas da espécie e do ambiente (FRANKHAM et al., 2008).

O avanço em novas técnicas moleculares e a possibilidade do sequenciamento do DNA proporcionaram o desenvolvimento de diversos marcadores genéticos e sua aplicação em estudos populacionais e evolutivos a respeito da diversidade genética (CHARLESWORTH et al., 2003) tanto em organismos modelo de estudo biológico como, por exemplo, em *Drosophila* (DAS et al., 2004; MUIR; PRICE, 2008; BRAND et al., 2015), quanto em outros organismos (PISA et al., 2015; WU et al., 2016; POURNOSRAT et al., 2018). Dentre esses marcadores, os microssatélites têm sido utilizados com relativo sucesso em estudos populacionais.

O uso de um marcador molecular seletivamente neutro como os microssatélites conduz a análise da diferenciação genética entre as populações sob o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética. Há isolamento por distância quando o fluxo gênico é reduzido conforme a distância geográfica aumenta, ou seja, populações próximas são geneticamente mais semelhantes. Em contraste, quando a diferenciação está relacionada à associação histórica das populações, isto é, quando elas são descendentes de uma população ancestral comum no passado e desde então divergiram sem fluxo gênico, então as populações não estão mais em equilíbrio e provavelmente não há nenhuma relação entre as estimativas de estrutura populacional e a distância geográfica (MORAES; SENE, 2007). Efeitos indiretos de seleção natural podem ser considerados quando pensamos nas relações entre locos gênicos neutros e os sob ação seletiva, que estão susceptíveis à ocorrência de efeito carona, pleiotropia, desequilíbrio de ligação e controle da expressão gênica de forma relacionada (CAVASINI, 2015).

1.2. Microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como *Short Tandem Repeats* (STR), *Simple Sequence Repeats* (SSR) ou *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP), são repetições em *tandem* de motivos de 1 a 6 nucleotídeos que podem ser classificados de acordo com seu tamanho e o tipo de unidade de repetição (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; EDWARDS et al., 1991). Essas repetições são comuns nos genomas nucleares e das organelas tanto em procariotos quanto em eucariotos e podem ser resultantes do deslizamento da DNA polimerase durante a replicação, um processo conhecido como *replication slippage*, no qual um alelo é alterado pela adição ou deleção de uma ou mais repetições, ou devido a outros eventos de mutação como, por exemplo, a recombinação desigual (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992; ZANE et al., 2002). Como consequência, esses locos têm altas taxas de mutação, variando de 1×10^{-6} a 1×10^{-2} mutações por loco por geração em eucariotos em geral (ARTHOFER et al., 2018).

Os marcadores microssatélites têm características que os tornam adequados e vantajosos para diversos tipos de análises genéticas. São seletivamente neutros ou quase-neutros, principalmente por se localizarem preferencialmente em regiões intergênicas, apresentam herança mendeliana do tipo codominante, alta frequência no genoma, são altamente polimórficos, além de serem de fácil genotipagem (ELLEGREN, 2000, 2004). Normalmente, as sequências de DNA que flanqueiam os motivos de microssatélites são conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para essas sequências adjacentes ao microssatélite. Assim, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é possível amplificar um determinado loco e identificar os polimorfismos individuais relacionados ao número de repetições do microssatélite para um determinado indivíduo. Portanto, cada loco tem grande conteúdo informativo, pois é multialélico e permite a diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos (ZANELLA et al., 2017).

Outra vantagem da aplicação desse tipo de marcador é a sua transferibilidade, isto é, os pares de oligonucleotídeos desenhados para uma espécie podem ser testados para outras espécies relacionadas ou não. Essa vantagem ocorre para grupos de espécies de *Drosophila* (MACHADO et al., 2003; LABORDA et al., 2009a, b; TRACTZ et al., 2012; TRAVA et al., 2016) bem como para outros organismos como

plantas, por exemplo (BRAVO et al., 2006; SOARES et al., 2013). Suas regiões flaqueadoras conservadas através dos táxons permitem uma amplificação cruzada (PEAKALL et al., 1998). Assim, observa-se a eficiência desses marcadores em estudos que visam caracterizar a estrutura micro e macrogeográfica de populações naturais, detectar processos demográficos e inferir o papel das forças evolutivas (AGIS; SCHLÖTTERER, 2001; SCHÖFL; SCHLÖTTERER, 2006; BARKER et al., 2009, 2011).

O uso de microssatélites tem sido comum em estudos com as espécies do gênero *Drosophila* (NOVICIC et al., 2011, 2013; CAVASINI, 2015; ZORZATO, 2015). Barker e colaboradores (2009, 2011) avaliaram populações de *D. buzzatii* da Argentina, seu local de origem, bem como da Europa e Austrália, e identificaram por meio da análise da variabilidade de microssatélites eventos de gargalo, desequilíbrio de ligação intracromossômico, evidência de seleção para alguns locos e variações nas frequências alélicas relacionadas a um gradiente altitudinal.

Machado e colaboradores (2003, 2010) realizando estudos populacionais usando microssatélites em populações de *D. antonietae* verificaram, como um de seus principais resultados para a espécie, que homoplasias de tamanho e alelos nulos não representavam problemas significativos nas análises populacionais, pois eram compensados pela alta variabilidade genética dos marcadores microssatélites.

Um estudo dos padrões filogeográficos de populações de *D. montana* demonstrou clara diferenciação genética entre populações norte-americanas e escandinavas, a formação de quatro grupos geneticamente distintos entre as populações analisadas e sinais de uma possível expansão demográfica das mesmas (MIROL et al., 2007).

Populações de *D. sturtevantii* (grupo *saltans*, subgrupo *sturtevantii*) de fragmentos de Mata Atlântica foram avaliadas utilizando microssatélites espécie-específicos e foi identificada uma diferenciação genética populacional moderada, não correlacionada com distâncias geográficas, regiões ou até mesmo fitofisionomias de Mata Atlântica (TRAÇA, 2018; TRAÇA et al., 2020).

Esses são alguns dos exemplos da literatura que demonstram o uso desse marcador molecular em análises populacionais com moscas do gênero *Drosophila*.

1.3. Mata Atlântica: o bioma das populações estudadas

A Mata Atlântica está entre os biomas mais biodiversos do mundo (MYERS et al., 2000). Ela se estende por toda porção leste do território brasileiro, incluindo ainda Misiones na Argentina e o leste do Paraguai. Por não fazer fronteira com outros biomas florestados da América do Sul e por estar circundada pela diagonal seca da América do Sul que é formada pelos biomas Caatinga, Cerrado e Chaco, a Mata Atlântica forma uma ilha florestada na porção leste do continente sul americano (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2011). Devido ao seu elevado nível de biodiversidade, entre 1 a 8% da biodiversidade de todo planeta, a Mata Atlântica é considerada um dos 25 *hotspots* mundiais (MYERS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009).

A latitude, que se estende por mais de 27 graus, a altitude, que varia do nível do mar a 2.700m e a longitude, sendo as florestas do interior significativamente diferentes das do litoral, são eixos de variação que certamente contribuíram para o processo de diversificação do bioma. A diversidade de espécies e alto grau de endemismo da Mata Atlântica manifestam-se em sua diversidade ambiental, que compreende vários tipos de florestas, incluindo ombrófila densa, aberta e mista, estacional decidual e semidecidual e outras, variáveis em sua composição (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005; TONHASCA JR., 2005).

A despeito dessa biodiversidade, entretanto, a Mata Atlântica é um dos biomas mais degradados e ameaçados do mundo. Com estimativas de perda de sua extensão entre 11,4 e 16%, sua área original que possuía mais 1,3 milhões de km² encontra-se reduzida a fragmentos dispersos ao longo da costa brasileira, no interior da região Sul e Sudeste, no sul dos estados de Goiás e de Mato Grosso do Sul, no interior dos estados do Nordeste e em Misiones na Argentina (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005; TONHASCA JR., 2005). Esses fragmentos representam 22% da cobertura vegetal da Mata Atlântica e, desses, apenas 7% são fragmentos com mais de 100 hectares e em bom estado de conservação (RIBEIRO et al., 2009; COLOMBO; JOLY, 2010; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019).

Trabalhos da literatura que buscaram avaliar a evolução e biogeografia desse importante bioma mostraram que os ciclos glaciais do Pleistoceno, bem como as atividades tectônicas que ocorreram no fim do Terciário e no Quaternário, teriam exercido papel fundamental na diversificação da biota que reside em suas florestas. Contudo, é preciso lembrar que é provável que a origem da biodiversidade seja devida

a uma história evolutiva complexa, que inclui outros processos além dos que acima foram citados (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2014).

Os períodos de máximo glacial durante o Pleistoceno (tendo o último máximo glacial ocorrido há aproximadamente 21 mil anos) teriam influenciado de forma crucial a história evolutiva da Mata Atlântica ao possibilitarem a expansão de áreas abertas (*grasslands*) pelo sudeste brasileiro (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2014). A consequente formação de zonas de estabilidade e instabilidade florestal (refúgios) decorrente desse evento parece ter importância reconhecida entre estudos filogeográficos. Alguns deles, em diferentes grupos de organismos, apontam para a existência de descontinuidades filogeográficas recorrentes congruentes no espaço, mas não totalmente no tempo. Além dos refúgios, tectonismo e eventos anteriores ao Quaternário são considerados como possíveis fatores vicariantes determinantes na riqueza de padrões e processos de diversificação da Mata Atlântica (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2011, 2014).

Lima e colaboradores (2015) realizaram uma revisão de 70 anos de informações provenientes de pesquisas quantitativas sobre a Mata Atlântica e concluíram que o conhecimento sobre a estrutura desse bioma é baseado em apenas 0,01% dos 18,5 milhões de hectares de floresta remanescentes. Para estados específicos e tipos florestais da Mata Atlântica, o conhecimento é ainda menor. Segundo os autores, as implicações de um conhecimento tão escasso sobre a conservação da biodiversidade de um bioma tão vasto como a Mata Atlântica são de grande preocupação. As taxas de desmatamento da Mata Atlântica são de quatro ordens de magnitude maiores que as taxas de amostragem, implicando no fato de que a maior parte do bioma desaparecerá antes da estrutura e diversidade de suas florestas e das populações de organismos que nelas residem sejam adequadamente descritas.

Análises da variabilidade e estrutura genética das populações naturais são importantes porque auxiliam a explicar como essas populações permanecem adaptadas em ambientes em mudança, como os fragmentos da Mata Atlântica com altas taxas de devastação. A avaliação dos impactos e as relações das alterações ambientais na variabilidade genética das populações por meio de estimativas diretas e indiretas pode direcionar a análise do quanto a fragmentação, bem como outros fatores e mecanismos atuantes, influenciam a estruturação da composição genotípica das populações (EWERS; DIDHAM, 2006).

1.4. As espécies em estudo: *Drosophila prosaltans* e *D. austrosaltans*

A família Drosophilidae (Insecta, Diptera) contém cerca de 4.500 espécies distribuídas mundialmente (O'GRADY; DESALLE, 2018). Essa família se originou em regiões tropicais há aproximadamente 50-60 milhões de anos (THROCKMORTON, 1975). As espécies, algumas cosmopolitas e outras endêmicas de regiões geográficas mais restritas, estão dispostas em 77 gêneros pertencentes a duas subfamílias: Steganinae e Drosophilinae, com 29 e 48 gêneros, respectivamente (O'GRADY; DESALLE, 2018). A origem do gênero *Drosophila* ocorreu durante o Eoceno (Cenozoico, Terciário), há aproximadamente 60 milhões de anos, a partir de várias radiações dentro da família Drosophilidae (THROCKMORTON, 1975). Esse gênero, que comporta elevado número de espécies, dá margem a divisões em subgêneros, grupos, subgrupos, complexos e subespécies. Atualmente, *Drosophila* é dividido em 14 subgêneros e 67 grupos declarados (O'GRADY; DESALLE, 2018). Os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* são os mais diversos. O grupo *saltans* de *Drosophila* é um dos quatro grandes grupos pertencentes ao subgênero *Sophophora* (STURTEVANTI, 1942) e é constituído por 21 espécies divididas em cinco subgrupos: *cordata*, *elliptica*, *parasaltans*, *saltans* e *sturtevanti*. Dois desses subgrupos (*cordata* e *parasaltans*) são encontrados na região Neotropical e os demais (*elliptica*, *saltans* e *sturtevanti*) na região Neártica e Neotropical (MAGALHÃES, 1962; SOUZA et al., 2014).

As espécies *D. prosaltans* (DUDA, 1927) e *D. austrosaltans* (SPASSKY, 1957), pertencentes ao subgrupo *saltans*, têm distribuição em regiões neotropicais da América Central e do Sul (MAGALHÃES, 1962). Segundo dados gerais de Magalhães (1962), um dos primeiros trabalhos com o grupo *saltans*, *D. prosaltans* é encontrada na Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil (principalmente na Mata Atlântica, mas também no Cerrado) e no Paraguai. *D. austrosaltans* é encontrada mais ao Norte e Sudeste e Sul do Brasil, de modo que existem localidades que as espécies são encontradas em simpatria. Alguns aspectos biológicos de *D. prosaltans* já foram estudados e a seguir são apresentadas algumas conclusões dos principais trabalhos. As informações na literatura sobre *D. austrosaltans* são escassas, mas também são apresentadas as principais informações sobre a biologia da espécie com base nos trabalhos com o grupo e subgrupo *saltans*.

O isolamento reprodutivo entre as espécies do subgrupo *saltans* foi avaliado por diferentes pesquisadores. Foram observados por Dobzhansky e Streisinger (1944)

acasalamentos preferenciais (homogâmicos), isto é, entre machos e fêmeas da mesma localidade geográfica em linhagens de *D. prosaltans* do Brasil, México e Guatemala. Em outro estudo com linhagens dessa espécie do México, Trinidad e São Paulo, Hoenigsberg e Satibanez (1960) também verificaram a preferência de acasalamentos.

Bicudo (1973a, 1978a) também realizou estudos sobre isolamento reprodutivo com o subgrupo *saltans* e a espécie *D. prosaltans*. Foi observado isolamento reprodutivo entre *D. prosaltans* x *D. austrosaltans* (não produziram híbridos nem inseminação). Barreiras de isolamento pós-zigótico foram detectadas nas combinações entre *D. prosaltans* x *D. saltans*, *D. prosaltans* x *D. septentriosaltans* e *D. prosaltans* x *D. lusaltans*, sendo que todas essas combinações de cruzamento produziram híbridos. As espécies *D. prosaltans* e *D. austrosaltans* apresentam isolamento reprodutivo pré-zigótico completo entre si, embora produzam híbridos férteis em cruzamentos com outras espécies do subgrupo *saltans*. *D. prosaltans* apresenta maior fertilidade do que *D. austrosaltans* (92,15% versus 64%), que é relacionada à capacidade de postura dos ovos, bem como à produtividade (número de progênie) (BICUDO, 1973a, 1978a).

Estudos de estrutura e polimorfismo cromossômico no grupo *saltans* e em especial no subgrupo *saltans* demonstraram que o grau qualitativo do polimorfismo é maior em espécies que possuem uma ampla área de distribuição geográfica e, nesse aspecto, *D. prosaltans* apresentou maior variabilidade cromossômica do que as demais espécies do subgrupo *saltans*. Para *D. prosaltans*, 14 inversões relacionadas à sequência padrão foram reconhecidas e a maioria das linhagens analisadas foram monomórficas ou polimórficas com uma ou duas inversões. Como *D. prosaltans* é a espécie mais rica em polimorfismo cromossômico intraespecífico dentro do subgrupo, é também a espécie que pode dar mais informação sobre o assunto. Nesses trabalhos foi verificado que as relações evolutivas de *D. prosaltans* com as outras seis espécies do mesmo subgrupo sugerem que essa espécie seja ancestral na evolução do subgrupo *saltans* (BICUDO, 1973b).

As relações filogenéticas dentro do grupo *saltans* são complexas e muitas vezes incongruentes quando são analisados diferentes marcadores. Souza e colaboradores (2014) utilizando como marcador a morfologia do edeago dos machos de 10 espécies do grupo *saltans* por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) verificaram que a árvore mais parcimoniosa indicou que o subgrupo *cordata* é

a linhagem que divergiu primeiro e o subgrupo *saltans* é a linhagem mais derivada dentro do grupo. Além disso, em contraste com outros marcadores, os caracteres morfológicos não indicaram diferenciação entre as duas linhagens de *D. prosaltans* analisadas no trabalho. Em relação ao subgrupo *saltans*, o relacionamento entre as espécies é marcado por politomias. Segundo análises moleculares e morfológicas, as espécies do subgrupo *saltans* divergiram por último em comparação às demais do grupo, há cerca de 4,5 milhões de anos e, portanto, a reconstrução filogenética se torna difícil em decorrência da divergência recente (ROMAN, 2018).

Pelos trabalhos acima citados sobre o isolamento reprodutivo, estrutura e polimorfismo cromossômico, verifica-se que a espécie *D. prosaltans* com ampla distribuição nos biomas neotropicais, apresenta uma diferenciação entre suas populações detectada por diferentes marcadores, o que torna essa espécie um bom modelo para estudos populacionais. Nesse contexto, o presente trabalho propõe um estudo utilizando marcadores microssatélites espécie-específicos para a avaliação da estrutura genética das populações de *D. prosaltans*. Ainda, pelo fato de *D. austrosaltans* ocorrer em simpatria com *D. prosaltans*, provavelmente compartilhando os mesmos nichos e recursos, torna-se interessante comparar as duas espécies quanto aos parâmetros estudados no presente trabalho. Essa análise é viável por meio do teste de transferibilidade de microssatélites, relatado com êxito na literatura não apenas entre espécies do gênero *Drosophila* (KULEUNG et al., 2004; LABORDA et al., 2009b; OLIVEIRA et al., 2013; ZORZATO, 2015; TRAVA et al., 2016).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade genética de *D. prosaltans* e *D. austrosaltans* por meio do polimorfismo de microssatélites e avaliar quais são os prováveis mecanismos responsáveis pelos padrões observados.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Desenhar e padronizar oligonucleotídeos de microssatélites desenvolvidos para *D. prosaltans*;
- Analisar por meio dos microssatélites espécie-específicos os padrões de diversidade genética e estruturação de oito populações de Mata Atlântica de *D. prosaltans* e sua relação com forças evolutivas, fatores ecológicos e/ou eventos históricos e demográficos;
- Testar a transferibilidade dos oligonucleotídeos de microssatélites específicos de *D. prosaltans* para *D. austrosaltans*;
- Analisar por meio da amplificação heteróloga dos microssatélites os padrões de variabilidade genética de *D. austrosaltans*, possibilitando posteriormente a comparação dos níveis de diversidade genética entre as duas espécies, e se há alguma similaridade na distribuição da variabilidade genética das espécies por estas serem do mesmo subgrupo e ocorrerem em simpatria.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *D. prosaltans* foram informativos no estudo da diversidade genética das populações, as quais mostraram estruturação genética moderada e foram altamente polimórficas para os locos avaliados. Pelas análises efetuadas, não foi observada correlação da diferenciação populacional com as distâncias e regiões geográficas ou fitofisionomias de Mata Atlântica. A eficácia de mais de 50% na transferibilidade dos locos de microssatélites de *D. prosaltans* para *D. austrosaltans* possibilitou a comparação dos níveis de diversidade genética, os quais foram semelhantes. Esses resultados corroboram a eficiência desse marcador molecular em estudos populacionais que poderá ser estendido para as demais espécies do subgrupo e até mesmo do grupo *saltans* de *Drosophila*.

REFERÊNCIAS

- AGIS, M.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite variation in natural *Drosophila melanogaster* populations from New South Wales (Australia) and Tasmania. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 1197-1205, 2001.
- ARTHOFER, W.; HEUSSLER, C.; KRAPP, P.; SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M. Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: a case study in fly culturing. **Fly**, New York, v. 12, n. 1, p. 13-22, 2018.
- AYALA, F. J.; MOURÃO, C. A.; PÉREZ-SALAS, S.; RICHMOND, R.; DOBZHANSKY, T. Enzyme Variability in the *Drosophila willistoni* Group, I. Genetic Differentiation Among Sibling Species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 67, p. 225-232, 1970.
- BARKER, J. S. F.; FRYDENBERG, J.; GONZÁLEZ, J.; DAVIES, H. I.; RUIZ, A.; SORENSEN, J. G.; LOESCHCKE, V. Bottlenecks, population differentiation and apparent selection at microsatellite loci in australian *Drosophila buzzatii*. **Heredity**, London, v. 102, p. 389-401, 2009.
- BARKER, J. S. F.; FRYDENBERG, J.; SARUP, P.; LOESCHCKE, V. Altitudinal and seasonal variation in microsatellite allele frequencies of *Drosophila buzzatii*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 24, p. 430-439, 2011.
- BATALHA-FILHO, H.; MIYAKY, C. Y. Filogeografia da Mata Atlântica. **Revista da Biologia**, São Paulo, p. 31-34, 2011. Volume especial.
- BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y. Processos evolutivos na Amazônia e na Mata Atlântica. **Fronteiras**: journal of social, technological and environmental science, Anápolis, v. 3, n. 2, p. 34-44, 2014.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*: I: the *saltans* subgroup. **Genetica**, Dordrecht, v. 44, p. 520-552, 1973a.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*: II: further study on *D. prosaltans*. **Genetica**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 5-15, 1978a.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in *Drosophila prosaltans*. **Genetica**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 11-27, 1978b.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I: the *saltans* subgroup. **Genetica**, Dordrecht, v. 44, p. 313-329, 1973b.
- BRAND, C. L.; LARRACUENTE, A. M.; PRESGRAVES, D. C. Origin, evolution and population genetics of the selfish segregation distorter gene duplication in european and african populations of *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, Lancaster, v. 69, p. 1271-1283, 2015.
- BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germoplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 516-524, 2006.
- CAVASINI, R. **Análise da estrutura genética de populações naturais de *Drosophila mediopunctata* com marcadores microssatélites**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 621-631, 2007.

- CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; BARTON, N. H. The effects of genetic and geographic structure on neutral variation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 99-125, 2003.
- CHAVES, N. B.; TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, p. 340-348, 2008.
- CHEN, H.; WANG, H.; SIEGFRIED, B. D. Genetic Differentiation of Western Corn Rootworm Populations (Coleoptera: Chrysomelidae) Relative to Insecticide Resistance. **Faculty Publications**, 527, 2012.
- COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest *lato sensu*: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 3, p. 697-708, 2010.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Austin, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, London, v. 93, p. 504-509, 2004.
- DAS, A.; MOHANTY, S.; STEPHAN, W. Inferring the population structure and demography of *Drosophila ananassae* from multilocus data. **Genetics**, Austin, v. 168, p. 1975-1985, 2004.
- DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)**, v. 39, p. 1-38, 1977.
- DHARMARAJAN, G.; BEATTY, W. S.; RHODES, O. E. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund Effect: dispelling unfounded expectations. **The Journal of Wildlife Management**, Montgomery, v. 77, p. 226-234, 2013.
- DOBZHANSKY, T.; STREISINGER, G. Experiments on sexual isolation in *Drosophila*: II: geographic strains of *Drosophila prosaltans*. **Genetics**, Austin, v. 30, p. 340-345, 1944.
- DUDA, O. Die sudamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter berucksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen arten. **Archiv fur Naturgeschichte**, Leipzig, v. 91, p.1-228, 1927.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 4, p. 359-361, 2012.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 49, p. 746-756, 1991.
- ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 16, p. 551-558, 2000.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 435-445, 2004.
- ELLSTRAND, N. C. Is the gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, Philadelphia, v. 101, n. 5, p. 737-753, 2014.
- EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 832-839, 1996.

- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611–20, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, p. 564–567, 2010.
- EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 81, p. 117-142, 2006.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.
- FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo de *Drosophila*. **Cultus**, São Paulo, v. 1, n. 5, p. 1-71, 1949.
- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (ed.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica - Belo Horizonte: Conservação Internacional. 2005. p. 3-12.
- GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation Indices, version 2.9.3. Armonk: IBM, 2001. Disponível em: <https://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; SANTOS, M. H.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from atlantic forest of southern Brazil. **Zoological Science**, Tokyo, v. 32, n. 2, p. 141-150, 2015.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, [S. l.], v. 4, p. 1-9, 2001. Disponível em: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>. Acesso em: 31 jan. 2020.
- HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (eds.). **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1983. p. 335-348.
- HARTL, D. A.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4.ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- HEDRICK, P. **Genetics of populations**. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2011.
- HOENIGSBERG, H. F.; SANTIBANEZ, S. K. Observations on the sexual behavior of *Drosophila equinoxialis* and *Drosophila prosaltans*. **The American Naturalist**, Chicago, v. 94, n. 878, p. 382-384, 1960.
- HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, Stockholm, v. 6, p. 65–70, 1979.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.
- KOPELMAN, N. M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A.; MAYROSE, I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.

KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 1147–1150, 2004.

LABORDA, P. R.; MORI, G. M.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 297, 2009a.

LABORDA, P. R.; KLACZKO, L. B.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 281-296, 2009b.

LEE, C.-R.; MITCHELL-OLDS, T. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 4631–4642, 2011.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data: version 1.0 (d16c). Storrs: University of Connecticut, 2001. Disponível em: <https://phylogeny.uconn.edu/software/>. Acesso em: 8 jan. 2020.

LIMA, R. A. F.; MORI, D. P.; PITTA, G. MELITO, M. O.; BELLO, C.; MAGNAGO, L. F.; ZWIENER, V. P.; SARAIVA, D. D.; MARQUES, M. C. M.; DE OLIVEIRA, A. A.; PRADO, P. I. How much do we know about the endangered atlantic forest?: reviewing nearly 70 years of information on tree community surveys. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 24, p. 2135–2148, 2015.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.

MACHADO, C. A.; HEY, J. The causes of phylogenetic conflict in a classic species group. **Proceeding of the Royal Society of London: Series B: Biological Sciences**, London, v. 270, p. 1193-2002, 2003.

MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Microsatellite allele sequencing in population analyses of the south american cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 100, p. 573-584, 2010.

MAGALHÃES, L. E. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. **The University of Texas Publications**, Austin, v. 6205, p. 135-154, 1962.

MANEL, S.; PONCET, B. N.; LEGENDRE, P.; GUGERLI, F.; HOLDEREGGER, R. Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabidopsis alpina*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 3824–3835, 2010.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v. 27, p. 209-220, 1967.

MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 5-18, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica> Acesso em: 18 abr. 2019.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses**: TFGPA – 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Northern Arizona University: Flagstaff, 1997.

MIROL, P. M.; SCHÄFER, M. A.; ORSINI, L.; ROUTTU, J.; SCHLÖTTERER, C.; HOIKKALA, A.; BUTLIN, R. K. Phylogeographic patterns in *Drosophila montana*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1085-1097, 2007.

- MORAES, E. M.; SENE, F. M. Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research = Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionforschung**, Berlin, v. 45, p. 336-344, 2007.
- MORAND, M. E.; BRACHET, S.; ROSSIGNOL, P.; DUFOUR, J.; FRASCARIA-LACOSTE, N. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 377-385, 2002.
- MOURÃO, C. A.; BICUDO, H. E. M. C. Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo *saltans* (Drosophilidae, Diptera). **Papeis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 20, p. 123-134, 1967.
- MUIR, C.; PRICE, D. K. Population structure and genetic diversity in two species of hawaiian picture-winged *Drosophila*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 47, p. 1173-1180, 2008.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, London, v. 41, p. 225-233, 1977.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NOVICIC, Z. K.; JELIC, M.; JOVANOVIĆ, M.; DIMITRIJEVIĆ, D.; VESELINOVIĆ, M. S.; STAMENKOVIĆ-RADAK, M.; ANDJELKOVIĆ, M. Microsatellite variability of *Drosophila subobscura* populations from the central Balkans. **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, v. 13, p. 479-494, 2011.
- NOVICIC, Z. K.; JELIC, M.; SAVIC, T.; VESELINOVIĆ, M. S.; DIMITRIJEVIĆ, D.; JOVANOVIĆ, M.; KENIG, B.; STAMENKOVIĆ-RADAK, M.; ANDJELKOVIĆ, M. Effective population size in *Drosophila subobscura*: ecological and molecular approaches. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 19, p. 65-74, 2013.
- OLIVEIRA, G. A. F.; PÁDUA, J. G.; COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; CARVALHO, F. M.; OLIVEIRA, E. J. Cross-species Amplification of Microsatellite Loci Developed for *Passiflora edulis Sims*. in Related *Passiflora* Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, p. 785-792, 2013.
- O'GRADY, P. M.; CLARK, J. B.; KIDWEL, M. G. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 15, p. 656-664, 1998.
- O'GRADY, P. M.; DESALLE, R. Phylogeny of genus *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 209, n. 1, p. 1-25, 2018.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research: an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 2537-2539, 2012. Disponível em: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288-295, 2006.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, n. 10, p. 1275-1287, 1998.
- PENARIOL, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MADI-RAVAZZI, L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2008.

- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 90, p. 502-503, 1999.
- PISA, G.; ORIOLI, V.; SPILOTROS, G.; FABBRI, E.; RANDI, E.; BANI, L. Detecting a hierarchical genetic population structure: the case study of the fire salamander (*Salamanca salamandra*) in northern Italy. **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 5, p. 743-758, 2015.
- POURNOSRAT, R.; KAYA, S.; SHAAF, S.; KILIAN, B.; OZKAN, H. Geographical and environmental determinants of the genetic structure of wild barley in southeastern Anatolia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 2, e0192386, 2018.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 945-959, 2000.
- PROUT, T.; BARKER, J. S. F. F statistics in *Drosophila buzzatii*: selection, population size and inbreeding. **Genetics**, Austin, v. 134, p. 369-375, 1993.
- RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. G.; HIROTA, M. M. The brazilian atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed?: implications for conservation. **Biological Conservation**, Essex, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RODERICK, G. K.; CROUCHER, P. J. P.; VANDERGAST, A. G.; GILLESPIE, R. G. Species differentiation on a dynamic landscape: shifts in metapopulation genetic structure using the chronology of the hawaiian archipelago. **Evolutionary Biology**, New York, v. 39, p. 192-206, 2012.
- ROMAN, B.E. **Reconstrução filogenética do grupo saltans de *Drosophila* utilizando marcadores morfológicos e moleculares**. 2018. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2019.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 103-106, 2008.
- SANGUINETTI, C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 209, 1994.
- SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, p. 211-215, 1992.
- SCHÖFL, G.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite variation and differentiation in african and non-african populations of *Drosophila simulans*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3895-3905, 2006.
- SILVA, D. C.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Migration rate and genetic diversity of two *Drosophila maculifrons* (Duda, 1927) populations from highland araucaria forest fragments in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 1, p. 254-255, 2015.
- SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L. A. (ed.). **Ecological genetics**. Princeton: Princeton University Press, 1994. p. 3-17.
- SOARES, T. N.; SANT'ANA, L. L.; DE OLIVEIRA, L. K.; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G. Transferability and characterization of microsatellite loci in *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3146-3149, 2013.
- SOSA, P.; BATISTA, F.; GONZÁLEZ, M. A.; BOUZA, N. Conservación genética de especies vegetales amenazadas. In: BAÑARES-BAUDET, A. (ed.). **Biología de la conservación de plantas amenazadas**. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales, 2002. p. 133-160.

- SOUZA, T. A. J.; NOLL, F. B.; BICUDO, H. E. M. 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**, San Francisco, v. 9, n. 6, e97156, 2014.
- SPASSKY, B. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. **The University of Texas Publication**, Austin, v. 5721, p. 48-61, 1957.
- STURTEVANTI, A. H. The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. **The University of Texas Publications**, Austin, v. 421, p. 5-51, 1942.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 15, p. 199-203, 2000.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, p. 6463-6471, 1989.
- THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: KING, R. C. **Handbook of genetics**. New York: Plenum, 1975. v. 3, p. 421-469.
- TONHASCA JR, A. Definição, características e limites da mata atlântica. In: TONHASCA JR, A. (org.). **Ecologia e história natural da mata atlântica**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. p. 9- 16.
- TORRES, F. R.; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp. (Diptera) in two woodlands in the State of São Paulo, Brazil. **Iheringia**, Série Zoologia, Porto Alegre, v. 96, n. 4, p. 437-444, 2006.
- TRACTZ, C. C.; SALOMON, G. R.; ZORZATO, S. V.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Allele diversity of cross-species microsatellite amplification on populations of *Drosophila guarani* species group from araucaria forest in Brazil. **Drosophila Information Service**, Lawrence, v. 95, p. 76-79, 2012.
- TRAVA, B. M. **Estrutura populacional de *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica**. 2018. 124 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2019.
- TRAVA, B. M.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; MADI-RAVAZZI, L. Transferability of SSR primers developed for *Drosophila mediopunctata* to species *D. sturtevantii*. **Drosophila Information Service**, Lawrence, v. 99, p. 16-18, 2016.
- TRAVA, B. M.; MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. DE B.; MADI-RAVAZZI, L. Moderate population structure in *Drosophila sturtevantii* from Atlantic Forest biome. **Scientific Reports**, 2020. In press.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. Á. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 4-71, 2007.
- VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomics studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, [S. l], v. 63, p. 1-332, 1990.
- WHITLOCK, M. C. Gst and D do not replace Fst. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 1083-1091, 2011.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population: variability within and among natural populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. v. 4.

WU, Z.; YU, D.; LI, X.; XU, X. Influence of geography and environment on patterns of genetic differentiation in a widespread submerged macrophyte: eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L., Haloragaceae). **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 460–468, 2016.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; ARTANELLO, T. P. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZANELLA, C. M.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; SPERB-LUDWIG, F. Microsatélites: metodologias de identificação e análise. *In*: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 94-117

ZORZATO, S. V. **Análise da estrutura populacional de *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) coletadas na região sul do Brasil**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2019.

ZORZATO, S. V. **Filogeografia de *Drosophila sturtevantii* (Diptera: Drosophilidae) em biomas Neotropicais**. 2019. 99f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2019.