

UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA

Campus de São José do Rio Preto

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS

EXATAS

Programa de Pós-Graduação em Genética

MARCOS DE LUCCA JÚNIOR

ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO INTERGÊNICA
ITS-1 DO rDNA EM ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* DO
CLUSTER BUZZATHI (COMPLEXO *BUZZATHI*, SUBGRUPO
MULLERI, GRUPO *REPLETA*)

Tese apresentada
para obtenção do
Título de Doutor
em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

São José do Rio Preto – SP
2006

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética-Bioquímica do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências , Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho somente foi possível graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que, de diferentes formas, estiveram nele envolvidos.

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, que desde a graduação me incentivou e deu exemplos de profissionalismo. Além de professor e orientador tornou-se, ao longo dos anos de convivência, grande amigo e companheiro.

Aos Prof. Dr. Fábio de Melo Sene e Profa. Dra. Maura Helena Manfrin e todo o pessoal do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela atenção e por terem cedido o material genético utilizado no presente estudo.

A Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, Natalia de Setta e todo o pessoal do laboratório de Evolução Molecular pela amizade, atenção e grande auxílio na etapa de transformação bacteriana.

A Profa. Dra. Paula Rahal, Ana Carolina Gomes Jardim, Érika Babeto e Luis Gustavo Bordinassi pelo auxílio fundamental nos seqüenciamentos.

Aos colegas Liliane, Vitor e Rafael, amigos e companheiros de laboratório que sempre me auxiliaram e proporcionaram momentos de alegria durante nossa convivência.

À secretaria do Departamento Rita Beatriz Seixas por sempre atender prontamente em todas as vezes que precisei da sua ajuda.

À técnica do laboratório Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira pela amizade e pelo auxílio nas atividades e preparação de reagentes.

À Direção do IBILCE pelas condições materiais que proporcionaram a realização deste trabalho.

Aos demais professores que, através de seu precioso e árduo trabalho, me deram a formação necessária para poder realizar, hoje, o que sempre sonhei em minha vida.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Marcos e Elizabeth. Todo o investimento em carinho, dedicação e sacrifício que depositaram na criação dos filhos resultaram em pessoas felizes, realizadas e plenas. A realização do meu sonho só foi possível por tudo aquilo que vocês fizeram por mim. Todas as palavras seriam insuficientes para demonstrar toda a gratidão. Que Deus me dê saúde e sabedoria para que possa fazer por meus filhos o que vocês fizeram por mim.

Aos meus irmãos Marcelo, Carla, Mauro e Juliana por sempre me incentivarem, apoiarem e demonstrarem por mim grande amor e amizade. Sem minha família nada disso teria sentido.

Aos meus sobrinhos Murilo, Clara, Flávia e Fernanda pela alegria que completa a minha vida.

À minha querida avó Ercília, que sempre foi e será para mim um exemplo de dedicação, lealdade, caráter, bondade e generosidade.

Aos meus avós Donato Bulchi, José Antonio de Lucca e Carlota Bertani de Lucca (*in memoriam*), que, em vida, sempre foram exemplos de honestidade,

trabalho, amor e carinho. Se estivessem aqui estariam sorrindo e orgulhosos dessa minha conquista. Tenho certeza que continuam olhando e zelando por mim.

À minha esposa Néia pela compreensão da minha ausência, por seu amor, dedicação e pelo seu incondicional apoio em tudo que faço.

Ao meu filho Pedro. Quando vejo cada gesto e sorriso seus sinto que tudo vale a pena.

A Deus pela saúde, luz e sorte. Obrigado por tudo.

Num meio-dia de fim de Primavera
Tive um sonho como uma fotografia.
Vi Jesus Cristo descer à terra.
Veio pela encosta de um monte
Tornado outra vez menino,
A correr e a rolar-se pela erva
E a arrancar flores para as deitar fora
E a rir de modo a ouvir-se de longe.
Tinha fugido do céu.
Era nosso demais para fingir
De segunda pessoa da Trindade.
No céu era tudo falso, tudo em desacordo
Com flores e árvores e pedras.
No céu tinha que estar sempre sério
E de vez em quando de se tornar outra vez homem
E subir para a cruz, e estar sempre a morrer
Com uma coroa toda à roda de espinhos
E os pés espetados por um prego com cabeça,
E até com um trapo a roda da cintura
Como os pretos nas ilustrações.
Nem sequer o deixavam ter pai e mãe
Como as outras crianças.
O seu pai era duas pessoas -
Um velho chamado José, que era carpinteiro,
E que não era pai dele;
E o outro pai era uma pomba estúpida,
A única pomba feia do mundo
Porque não era do mundo nem era pomba.
E a sua mãe não tinha amado antes de o ter.
Não era mulher: era uma mala
Em que ele tinha vindo do céu.
E queriam que ele, que só nascera da mãe,
E nunca tivera pai para amar com respeito,
Pregasse a bondade e a justiça!

Um dia que Deus estava a dormir
E o Espírito Santo andava a voar,
Ele foi à caixa dos milagres e roubou três.
Com o primeiro fez que ninguém soubesse que ele
tinha fugido.
Com o segundo criou-se eternamente humano e
menino.
Com o terceiro criou um Cristo eternamente na cruz
E deixou-o pregado na cruz que há no céu
E serve de modelo às outras.
Depois fugiu para o Sol
E desceu pelo primeiro raio que apanhou.
Hoje vive na minha aldeia comigo.
É uma criança bonita de riso e natural.
Limpa o nariz ao braço direito,
Chapinha nas poças de água,
Colhe as flores e gosta delas e esquece-as.
Atira pedras aos burros,
Rouba a fruta dos pomares
E foge a chorar e a gritar dos cães.
E, porque sabe que elas não gostam

E que toda a gente acha graça,
Corre atrás das raparigas
Que vão em ranchos pelas estradas
Com as bilhas às cabeças
E levanta-lhes as saias.
A mim ensinou-me tudo.
Ensinou-me a olhar para as coisas.
Aponta-me todas as coisas que há nas flores.
Mostra-me como as pedras são engraçadas
Quando a gente as tem na mão
E olha devagar para elas.
Diz-me muito mal de Deus.
Diz que ele é um velho estúpido e doente,
Sempre a escarrar no chão
E a dizer indecências.
A Virgem Maria leva as tardes da eternidade a fazer meia.
E o Espírito Santo coça-se com o bico
E empoleira-se nas cadeiras e suja-as.
Tudo no céu é estúpido como a Igreja Católica.
Diz-me que Deus não percebe nada
Das coisas que criou -
"Se é que ele as criou, do que duvido." -
"Ele diz, por exemplo, que os seres cantam a sua glória,
Mas os seres não cantam nada.
Se cantassem seriam cantores.
Os seres existem e mais nada,
E por isso se chamam seres."
E depois, cansado de dizer mal de Deus,
O Menino Jesus adormece nos meus braços
E eu levo-o ao colo para casa.

Ele mora comigo na minha casa a meio do outeiro.
Ele é a Eterna Criança, o deus que faltava.
Ele é o humano que é natural,
Ele é o divino que sorri e que brinca.
E por isso é que eu sei com toda a certeza
Que ele é o Menino Jesus verdadeiro.
E a criança tão humana que é divina
É esta minha quotidiana vida de poeta,
E é porque ele anda sempre comigo que eu sou poeta
sempre.
E que o meu mínimo olhar
Me enche de sensação,
E o mais pequeno som, seja do que for,
Parece falar comigo.
A Criança Nova que habita onde vivo
Dá-me uma mão a mim
E a outra a tudo que existe
E assim vamos os três pelo caminho que houver,
Saltando e cantando e rindo
E gozando o nosso segredo comum
Que é o de saber por toda a parte ...

O Guardador de Rebanhos

Alberto Caieiro heterônimo de Fernando Pessoa (1888 - 1935)

Sumário

I. Introdução	8
II. Objetivos	32
III. Material e Métodos	
III.1. Linhagens	33
III.2. Extração do DNA	35
III.3. Amplificação da região ITS-1	36
III.4. Seqüenciamento	38
III.5. Análises das seqüências	40
IV. Resultados	
IV.1. Caracterização da região ITS-1	41
IV.2. Análise das seqüências	43
IV.3. Análises filogenéticas	48
V. Discussão	54
VI. Conclusões	60
VII. Referências Bibliográficas	62
VIII. Resumo	81
IXI. Abstract	83

I. INTRODUÇÃO

A diversidade bioquímica, comportamental e morfológica, observada dentro de uma população, pode ser interpretada como consequência de modificações na composição genética das populações. Essas alterações resultam da incidência de fatores que, ora geram alelos ou genótipos novos, tais como mutação e recombinação gênica, ora promovem a modulação das frequências alélicas como seleção natural ou deriva genética, ou seja, alelos recém surgidos em uma população podem aumentar sua frequência ou mesmo serem eliminados de uma população por causas determinísticas ou por efeitos estocásticos. Assim sendo, na medida em que as gerações se sucedem, a composição genética de uma população pode ser alterada drasticamente quando comparada a outras populações intraespecíficas.

Estudos envolvendo microevolução procuram analisar as causas e efeitos das alterações intrapopulacionais. Quando a diversidade é elevada ao nível interpopulacional podem ocorrer, como resultados desse processo, eventos de especiação, pelos quais novas espécies derivam a partir de populações pertencentes a espécies ancestrais. Uma vez que há o surgimento de novas espécies, outras possibilidades de exploração de novos nichos surgem também e, assim, as diversas formas de vida podem deixar de competir pelos mesmos recursos.

I.1 O conceito biológico de espécie

Para o entendimento do processo de evolução das espécies, é necessário preliminarmente discutirmos o que se entende por espécie. Dentre os diversos modos de se conceituar uma espécie, o conceito biológico é o de maior relevância, pois trata as espécies como comunidades reprodutivas. Dobzhansky (1937) definiu espécie como "o estágio de progresso evolucionário no qual um antigo conjunto de formas verdadeiramente e potencialmente inter cruzáveis torna-se segregado em dois ou mais conjuntos separados, que são fisiologicamente incapazes de inter cruzar". Posteriormente, Mayr (1942) definiu espécie como "grupos de populações naturais verdadeiramente ou potencialmente inter cruzantes mas que possuem isolamento reprodutivo de outros grupos".

Embora o conceito biológico de espécie seja amplamente aceito, algumas críticas têm sido levantadas com relação a casos de inaplicabilidade do mesmo. Por exemplo, em organismos de reprodução assexuada o pressuposto de isolamento reprodutivo entre as espécies é falho, uma vez que nesse caso não há fluxo gênico nem mesmo entre populações que pertençam à mesma espécie. Outra crítica relaciona-se à impossibilidade de se comparar grupos que ocorreram em tempos distintos. Não é possível afirmar através de comparação de fósseis se havia, ou não,

isolamento reprodutivo entre indivíduos que morfologicamente são classificados como espécies distintas. E também, o fato de frequentemente serem observadas espécies que se inter cruzam e produzem híbridos férteis, especialmente através de cruzamentos realizados experimentalmente.

Outro conceito de espécie, estabelecido mais recentemente é aquele que leva em consideração a história evolutiva compartilhada pelas populações, chamado de conceito filogenético de espécie. Define-se espécie então como “o menor agrupamento diagnosticável de organismos individuais, dentro dos quais há um padrão de ancestralidade e descendência”. Assim a premissa implícita no conceito filogenético é que a classificação deve refletir a relação ramificada entre as espécies, a qual é indicada por um cladograma (Cracraft, 1983).

I.2 O Processo de Especiação

Os mecanismos de isolamento reprodutivo atuam quando há o impedimento do fluxo gênico entre as populações. Quando uma determinada população se torna reprodutivamente isolada de outras, dentro da mesma espécie, os conjuntos gênicos desses dois grupos passam a divergir devido à atuação particularizada de fatores evolutivos em cada grupo. À medida que são passadas as gerações, diferenças substanciais são

acumuladas principalmente com relação a características ligadas a reprodução, de modo que as semelhanças que antes permitiam o fluxo gênico entre os indivíduos dos grupos separados, tenderão a diminuir. A partir do momento em que cessa o fluxo gênico entre os grupos separados, considera-se que ocorreu um evento de especiação.

Há basicamente dois tipos de barreiras que atuam sobre as populações e que podem conduzir ao isolamento reprodutivo, e podem ser classificadas em pré- e pós-zigóticas. As barreiras pré-zigóticas são assim denominadas por não permitirem a formação do zigoto em qualquer instância, ou seja, impedem que cruzamentos ocorram entre indivíduos pertencentes a espécies distintas através de mecanismos que bloqueiam o acasalamento. Adicionalmente, em casos de “rompimento” desses mecanismos, outras barreiras que impossibilitam a formação do zigoto por incompatibilidade gamética atuam nessas condições. As barreiras pós-zigóticas, resultam em inviabilidade ainda no estágio de zigoto ou infertilidade da prole híbrida e até degeneração do híbrido. A questão é como a incompatibilidade pré- e/ou pós-zigótica pode surgir, se estabelecer e persistir em diferentes modos de especiação. Tais modos são diferenciados de acordo com o grau de contato, potencialmente reprodutivo, entre as populações. Podem ser caracterizados como alopátricos ou simpátricos, caso haja isolamento geográfico (e reprodutivo) ou não, respectivamente. Um modo intermediário, o parapátrico, no qual

populações que vivem alopatricamente trocam genes, por meio de populações intermediárias contínuas, foi postulado por Smith (1965).

Há poucos genes identificados que são explicitamente responsáveis pelo isolamento reprodutivo. A maior dificuldade em se determinar os chamados “genes de especiação” está relacionada com o fato desses genes não evoluírem especificamente para esse fim e participarem de outras funções biológicas. Entretanto, muitos estudos vêm sendo realizados no sentido de se estudar o papel da seleção natural e deriva genética na divergência de tais genes nas populações (Coyne *et al.*, 1994; Barbash *et al.*, 2003; Presgraves *et al.*, 2003; Orr, 2005).

I.2.1 Isolamento Pré-zigótico

Dobzhansky (1951) classificou os mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos em ecológicos, temporais ou sazonais, etológicos e mecânicos.

Em espécies simpátricas de *Drosophila* os mecanismos de isolamento pré-zigóticos têm evoluído mais rapidamente do que aqueles de isolamento pós-zigótico, enquanto que nas espécies alopátricas esses mecanismos têm evoluído em taxas semelhantes (Coyne e Orr, 1997).

Essas observações reforçam a teoria de que a seleção sobre fatores genéticos relacionados ao estabelecimento de barreiras ao fluxo gênico é mais acentuada quando espécies relacionadas compartilham a mesma área de ocorrência. Nesse contexto, podem ser citadas como exemplo as espécies *D. silvestris* e *D. heteroneura*, que são simpátricas no arquipélago do Havaí, e que exibem forte isolamento quanto aos padrões de corte, além de grandes diferenças com relação ao comportamento agressivo dos machos (Carson *et al.*, 1989).

A preferência de acasalamento é outro fator importante a ser considerado para a manutenção do isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas. Indivíduos de um dos sexos (geralmente as fêmeas) escolhem seus parceiros conforme características quantificáveis, tais como feromônios de contato, constituídos basicamente de hidrocarbonetos não-voláteis cuticulares (Higgie *et al.*, 2000; Blows, 2002 e Rundle *et al.*, 2005).

Outros exemplos da atuação de mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos relacionam-se aos diferentes padrões de sons de corte. Williams *et al.* (2001) analisaram a base genética da diferença dos sons de corte para acasalamento entre *D. pseudoobscura* e *D. persimilis*. Em outro estudo, Yamada *et al.* (2002) estudaram o controle genético dos diferentes sons de corte associadas ao isolamento reprodutivo entre *D. ananassae* e *D. pallidosa*, ambas pertencentes ao complexo de espécies de

D. ananassae. Análises de híbridos obtidos de cruzamentos entre *D. virilis* e *D. flavomontana* mostraram a interação entre genes ligados ao cromossomo X e genes autossômicos na diferenciação de canções de corte entre essas espécies (Päällysaho *et al.*, 2003).

Apesar da grande importância do isolamento reprodutivo pré-zigótico como uma barreira primária durante o processo de especiação, pouco se sabe sobre a base genética da discriminação de acasalamentos interespecíficos (Coyne e Orr, 2004). Muitas das questões sobre a genética do isolamento reprodutivo permanecem ainda sem respostas, tais como: os mecanismos de isolamento são baseados em muitos ou poucos genes? Genes para diferenciação na reprodução tendem a ocorrer em regiões similares de cromossomos entre espécies do mesmo grupo? Os mesmos genes contribuem para o estabelecimento do isolamento reprodutivo tanto nos machos quanto nas fêmeas? Qual a função normal dos genes envolvidos no isolamento reprodutivo? Estudos sobre a base genética do isolamento entre espécies, dentre os quais podem ser destacados aqueles que utilizam *Drosophila* como um modelo, podem trazer importante contribuição na elucidação destas questões. Estudos como o realizado por Moehring *et al.* (2006), nos quais foram realizados o mapeamento de QTLs que contribuem para o isolamento reprodutivo pré-zigótico nas espécies crípticas *D. santomea* e *D. yakuba*, apontam para um novo tipo de análise da base genética do isolamento reprodutivo em *Drosophila*.

I.2.2 Isolamento Pós-zigótico

Desde o início do último século tem-se tentado determinar a base genética dos mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigóticos. Inicialmente Dobzhansky (1951) classificou esses mecanismos em três classes distintas: inviabilidade dos híbridos de primeira geração (F_1), esterilidade dos híbridos e inviabilidade dos híbridos de segunda geração (F_2).

A inviabilidade dos híbridos de primeira geração (F_1) pode ser causada por interações epistáticas deletérias entre genes que funcionam perfeitamente nas espécies parentais. Já em 1922, Haldane observara que “quando na prole F_1 de duas raças animais diferentes um dos sexos está ausente, é raro ou é estéril; o mesmo é sempre o heterogamético”. Uma das explicações para a chamada “regra de Haldane”, acima descrita, seria a incompatibilidade que envolve os cromossomos sexuais entre si, ou deles com cromossomos autossômicos.

Os mecanismos genéticos da inviabilidade dos híbridos F_1 vêm sendo investigados através do estudo de mutações que resgatam a viabilidade dos híbridos. Em *Drosophila*, as mutações *Hmr* (do inglês, *hybrid male rescue*) ligada ao cromossomo X de *D. melanogaster*, e *Lhr* (do inglês, *lethal hybrid rescue*) presente no segundo cromossomo de *D.*

simulans permitem a análise da base genética da inviabilidade dos híbridos obtidos entre as espécies citadas (Watanabe, 1979; Hutter and Ashburner, 1987; Hutter *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1996; Orr and Irving, 2000).

Estudos sobre a base genética envolvida no isolamento pós-zigótico em *Drosophila* sugerem que os mecanismos relacionados à inviabilidade da prole híbrida são menos complexos do que aqueles responsáveis pela própria esterilidade dos híbridos e podem estar associados com alterações no ciclo celular (Hutter, 1997). Foi identificado um grupo de genes relacionados ao controle do ciclo celular no cromossomo X de *D. melanogaster* que se interagem em determinados genótipos híbridos e conduzem à inviabilidade do desenvolvimento dos mesmos (Hutter, 2002).

Em relação à esterilidade dos híbridos obtidos entre espécies de *Drosophila*, a atrofia observada em ovários e testículos se deve à incompatibilidade genética reconhecível precocemente no embrião. Essa incompatibilidade produz defeitos que afetam a proliferação das células da linhagem germinativa (Hollocher *et al.*, 2000). A esterilidade dos machos híbridos é a forma mais comum de mecanismo de isolamento pós-zigótico em *Drosophila* (Coyne, 1992). A base genética desse tipo de isolamento foi estudada em híbridos obtidos de cruzamentos entre *D. subobscura* e *D. madeirensis*, com a utilização de vinte marcadores genéticos em machos retrocruzados. Observou-se um efeito maior nos cromossomos sexuais: machos com cromossomos X e Y derivados de espécies parentais distintas

tinham testículos pequenos e vazios; enquanto que quando eram obtidos machos com cromossomos X e Y compatíveis os testículos eram normais em relação ao tamanho, mas machos estéreis ainda eram observados. Foi sugerido, então, que seis fatores autossômicos estavam relacionados com a esterilidade dos machos (Khadem and Krimbas, 1991). Noor *et al.* (2001) estudaram a esterilidade nos híbridos entre *D. pseudoobscura* e *D. persimilis*, duas espécies que ocasionalmente se hibridizam na natureza. Esses autores encontraram algumas regiões nos genomas dessas espécies que podem estar relacionadas com o fenômeno da esterilidade dos híbridos. Além disso, nessas espécies, essas regiões estavam associadas a diferentes inversões, reforçando a idéia que as inversões possam contribuir com o processo de especiação.

A inviabilidade dos híbridos de segunda geração (F2) pode ser definida como o mecanismo de isolamento reprodutivo que atua quando híbridos são capazes de produzir prole, porém de fertilidade reduzida ou inviável. Inicialmente, os genes envolvidos na determinação da inviabilidade dos híbridos (F2) foram mapeados através da introgressão do cromossomo quatro de *D. simulans* no *background* genético de *D. melanogaster* (Muller e Pontecorvo, 1940). Posteriormente foi observado que os genes relacionados com a esterilidade dos machos híbridos F2, presentes nos cromossomos de *D. melanogaster* se comportavam como recessivos após a introgressão, e assim faziam com que os genes

correspondentes de *D. simulans* para a mesma região fossem hemizigotos (Orr, 1992). Uma análise de aproximadamente 70% do genoma autossômico de *D. simulans* revelou 20 regiões que levam à letalidade e outras 20 regiões semi-letais nos híbridos. Adicionalmente foi estimado que há aproximadamente 191 regiões genômicas que estão ligadas à incompatibilidade dos híbridos entre *D. melanogaster* e *D. simulans*, que agem de modo epistático nesses indivíduos (Presgraves, 2003).

I.3) O cluster *buzzatii*

As espécies incluídas no grupo *repleta* são, na sua maioria, cactofílicas, ou seja, utilizam os cladódios em decomposição de vários tipos de cactos neotropicais para realizar a oviposição e se alimentar de leveduras presentes nesses vegetais (Heed, 1982; Wasserman, 1992; Etges *et al.*, 2001; Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Esta adaptação permitiu que um número considerável de espécies do grupo *repleta* pudesse ocupar os desertos e as zonas áridas do Novo Mundo (Ruiz & Fontdevila, 1981). O grupo *repleta* está subdividido em 6 subgrupos: *mulleri*, *fasciola*, *hydei*, *mercatorum*, *repleta* e *inca* (Vilela, 1983, Rafael e Arcos, 1989). O

subgrupo *mulleri*, por sua vez, está subdividido em 5 complexos de espécies: *mulleri*, *meridiana*, *anceps*, *eremophila* e *buzzatii*. No complexo *buzzatii* foram incluídas 13 espécies, organizadas em 3 *clusters*, com base em padrões de bandamento cromossômico e morfologia do aparelho reprodutor (Ruiz e Wasserman, 1993): *cluster stalker* (incluindo *D. richardsoni* e *D. stalker*), está restrito às ilhas do Caribe e Flórida; *cluster martensis* (*D. martensis*, *D. uniseta*, *D. vénézoelana* e *D. starmeri*), encontrado nos desertos da Colômbia e Venezuela; e finalmente o *cluster buzzatii*, formado atualmente por 7 espécies (*D. buzzatii*, *D. serido*, *D. borborema*, *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. gouveai* e *D. antonietae*), que são encontradas em vários países da América do Sul, desde as regiões abaixo da Amazônia brasileira até Argentina. *D. buzzatii*, a espécie que dá nome ao *cluster*, é considerada atualmente uma espécie sub-cosmopolita (Ruiz *et al.*, 1982; Wasserman & Richardson, 1987; Fontdevila *et al.*, 1988; Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Estudos de Ruiz *et al.* (2000) agruparam 6 das 7 espécies do *cluster buzzatii* (*D. serido*, *D. borborema*, *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. gouveai* e *D. antonietae*) no *sibling set serido*, baseando-se na comparação da morfologia do edeago.

As espécies do *cluster buzzatii* são encontradas em áreas de ocorrência de seus cactos hospedeiros. As moscas ovipositam sobre cladódios em decomposição, onde as larvas se desenvolvem alimentando-se de leveduras específicas envolvidas neste processo (Pereira *et al.*, 1983).

A distribuição das cactáceas na América do Sul é descontínua provavelmente em decorrência de mudanças paleoclimáticas e paleogeomorfológicas a partir do final do período terciário (Ab'Saber, 1977a, 1977b; Vanzolini, 1981), fato que contribuiu para o isolamento geográfico atualmente observado para as populações deste *cluster*. O processo de especiação alopátrica, que é muitas vezes a regra dentro do gênero *Drosophila*, pode ocorrer de duas formas distintas: ou o isolamento geográfico seguido de diversificação genética lenta e, conseqüentemente, o isolamento reprodutivo das populações; ou por divergência genética rápida, através do isolamento de fundadores em novos ambientes, com “erros de amostragem” do *background* genético original. Este processo é conhecido como Efeito do Fundador, e constitui a maneira mais provável de especiação das espécies cactofílicas de *Drosophila* (Wasserman, 1992). Silva e Sene (1991) consideraram a hipótese de que uma variação geográfica observada para a morfologia do edeago poderia representar o início da diferenciação interpopulacional, que eventualmente resultaria em especiação.

O mapeamento da distribuição geográfica das espécies do *cluster buzzatii* tem sido empreendido utilizando-se vários marcadores, como a morfologia da terminália masculina e da asa (Vilela e Sene, 1977; Silva, 1981; Sene *et al*, 1982, 1988; Silva e Sene, 1991; Tidon-Sklorz e Sene, 1995a, 1995b; Monteiro e Sene, 1995; Monteiro, 1997; Moraes e Sene,

2004), inversões em cromossomos politênicos (Wasserman, 1962; Tosi, 1982; Tosi e Sene, 1989; Figueiredo e Sene, 1992; Ruiz, *et al.*, 2000), padrão de isoenzimas (Sanchez, 1986; Barker *et al.*, 1985; Barker, 1994; Lapenta *et al.*, 1995, 1998; Morales, 2001, Mateus e Sene, 2003), análise de compatibilidade reprodutiva (Madi-Ravazzi *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2002 e Machado *et al.*, 2006), análise de DNA satélite (Kuhn *et al.*, 1999 e Kuhn e Sene, 2004) e de haplótipos de DNA mitocondrial (Manfrin *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002a). Até o presente, a comparação da morfologia do edeago é considerada como a principal característica para a diferenciação das espécies (Vilela, 1983; Silva e Sene, 1991; Tidon-Sklorz e Sene, 1995a). Além disso, as análises das inversões cromossômicas sugerem uma origem monofilética para este *cluster* (Tosi, 1982; Ruiz e Wasserman, 1993).

Drosophila gouveai ocorre em morros rochosos nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. Devido à associação com cactáceas presentes nessas localizações. Esta espécie apresenta uma distribuição geográfica fragmentada com numerosas populações isoladas, principalmente na região nordeste do Brasil (Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Monteiro e Sene (1995) observaram que as populações de *D. gouveai* podiam ser discriminadas com relação à morfologia do edeago provavelmente devido ao fato dessas populações serem encontradas principalmente em morros, formando verdadeiros isolados. Além disso, foi demonstrado recentemente que

parâmetros morfométricos para as asas podem ser utilizados como marcadores para diferenciação morfológica entre as populações dessa espécie (Moraes e Sene, 2004). Manfrin *et al.*(2001), observaram que *D. gouveai* de Analândia, SP, podia ser agrupada filogeneticamente com populações de *D. antonietae*, quando analisaram seqüências de DNA mitocondrial. Com base nessas observações, foi sugerido um provável contato secundário entre as duas espécies, no qual poderia ter ocorrido hibridação introgressiva. Além disso, essas observações indicam também que a diferenciação destas populações não se deu exclusivamente durante o último ciclo do quaternário, conforme anteriormente sugerido por Sene *et al.* (1988). O padrão atual, segundo os autores, indica uma história evolutiva mais longa para as espécies do *sibling set serido*, isto é, eventos anteriores àqueles sugeridos por Sene *et al.* (1988) isolaram estas espécies, e outros paleoeventos, como aqueles provocados pelos ciclos do quaternário, em um passado mais recente, propiciaram o contato secundário entre elas.

A distribuição geográfica de *Drosophila antonietae* compreende as regiões sul e sudeste do Brasil e norte da fronteira leste do chaco argentino. As populações estão sempre associadas com *Cereus hildmaniannus* presente em ilhas de vegetação xerofítica de matas de galeria e florestas mesofíticas (Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Essa espécie já foi caracterizada em diversos aspectos: possui morfologia do edeago do tipo D (Silva e Sene,

1991), inversão cromossômica $2x^7$ e cariótipo metafásico tipo V (Ruiz, *et al.*, 2000). Análises de haplótipos do DNA mitocondrial permitiram a separação da espécie em dois grupos: um na porção superior e outro na porção inferior da bacia dos rios Paraná-Uruguai (Manfrin *et al.*, 2001). Mateus e Sene (2003), encontraram deficiência de heterozigotos para vários *loci* aloenzimáticos nas populações de *D. antonietae*, porém foi descartada a hipótese de endogamia como explicação para esse fato. Em decorrência das populações de *D. antonietae* distribuírem-se ao longo dos cursos de rios apresentam homogeneidade genética, o que sugere a ocorrência de fluxo gênico entre as mesmas (Monteiro e Sene, 1995).

Drosophila seriema tem área de ocorrência restrita a campos rochosos da Cadeia do Espinhaço, nos estados de Bahia e Minas Gerais, em altitudes acima dos 1000 m em relação ao nível do mar, com distribuição populacional esparsa e descontínua dada a paisagem montanhosa entremeada por vales extensos e profundos, que a localidade apresenta (Tidon-Sklorz e Sene, 1995a). As populações de *D. seriema* apresentam forte isolamento pré copulatório em relação às outras espécies, um padrão característico de esterases (Lapenta *et al.*, 1995), monomorfismo para inversões cromossômicas paracêntricas, porém exibem polimorfismo quando comparadas ao nível de cariótipos metafásicos (Kuhn *et al.* 1996). Manfrin *et al.*(2001), em análises que envolviam parte da seqüência do gene mitocondrial Citocromo oxidase – I (COI), observaram que os valores

de divergência genética interpopulacional eram muito similares àqueles obtidos em análises interespecíficas com as outras espécies do *cluster buzzatii*, o que poderia indicar eventos prévios de hibridização introgressiva. A introgressão de DNA mitocondrial também já foi sugerido para outras espécies do *cluster buzzatii* (de Brito *et al.* 2002a). Contudo Kuhn e Sene (2004), com base na análise de marcadores de DNA satélite encontraram homogeneidade de seqüências para as populações de *D. seriema* analisadas.

Vilela e Sene (1977) descreveram a espécie *D. serido* a partir de exemplares coletados em Milagres (BA). A distribuição geográfica da espécie compreende toda a área sub-amazônica da América do Sul até à região do chaco argentino. A espécie é constituída por um complexo de populações que exibem elevado polimorfismo em várias características: quanto à morfologia do edeago (Tosi e Sene, 1989; Silva e Sene, 1991); quanto aos tipos de cariótipos metafásicos (Baimai *et al.*, 1983); quanto à variação na seqüência do gene *COI* do DNA mitocondrial (Manfrin *et al.*, 2001); assim como outros tipos de divergência genética (Ruiz *et al.*, 2000). Segundo as análises realizadas por de Brito *et al.* (2002a), foi estimada que a distribuição das populações de *D. serido* pelo território brasileiro poderia ter ocorrido durante o Pleistoceno médio, e que os ciclos climáticos anteriores e que se sucederam pelo período Quaternário provavelmente tiveram um papel preponderante na heterogeneidade encontrada nas

populações brasileiras de *D. serido*. Existe uma região de simpatria entre *D. serido* e *D. gouveai* na Cadeia do Espinhaço (BA e MG). Entretanto, não foram observados híbridos naturais entre as mesmas (Silva e Sene, 1991).

Drosophila buzzatii é a espécie pertencente ao *cluster buzzatii* que apresenta maior distribuição geográfica, pois pode ser encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai, Brasil e também, após invasão recente, na Europa e na Austrália (Fontdevilla *et al.*, 1981; Barker *et al.*, 1985 e Figueiredo e Sene, 1992). Como sítio de oviposição pode utilizar cactos dos gêneros *Opuntia* (Pereira *et al.* 1983), *Cereus* e *Trichocereus* (Hasson *et al.*, 1992). O modo pelo qual ocorreu a distribuição populacional de *D. buzzatii* pelo território brasileiro ainda é motivo de debate (de Brito *et al.*, 2002a). A dispersão das populações brasileiras de *D. buzzatii* pode ter acontecido de dois modos: ou dispersão passiva, na qual os colonizadores ocuparam o restante do território seguindo o cacto hospedeiro *Opuntia*, como foi observado na Austrália com a introdução desse vegetal por criadores de gado (Barker *et al.*, 1985); ou dispersão ativa, sem o envolvimento humano, na qual *D. buzzatii* teria inicialmente colonizado a região sudeste e posteriormente ocupado outras áreas (Figueiredo e Sene, 1992).

A distribuição geográfica das populações de *D. koepferae* compreende a região do nordeste da Argentina e Bolívia, a leste da

Cordilheira dos Andes. *D. koepferae* realiza seu ciclo de vida em tecidos de cactáceas em decomposição, principalmente dos gêneros *Cereus* e *Trichocereus* (Fanara *et al.*, 1998), de forma semelhante à sua espécie críptica *D. buzzatii*. Pelo fato de co-explorarem sítios semelhantes para a reprodução, já foi demonstrada a ocorrência de híbridos interespecíficos entre essas espécies (Carvajal *et al.*, 1996; Marin e Fontdevila, 1996). Contudo, em outros estudos foram observadas algumas diferenças entre *D. koepferae* e *D. buzzatii* quanto à preferência para sítios de oviposição (Fanara e Hasson, 2001), sistemas genéticos relacionados à inviabilidade dos híbridos (Carvajal *et al.*, 1996) e estudos moleculares comparativos do locus *Xdh* (Piccinali *et al.*, 2004).

Drosophila borborema, outra espécie pertencente ao *cluster buzzatii*, consiste de uma espécie críptica de *D. serido*. Suas populações ocupam o nordeste brasileiro, especificamente a região da Serra da Borborema. Possui similaridade de inversões cromossômicas com *D. gouveai*, entretanto híbridos naturais ainda não foram relatados.

Espécies cactofílicas de *Drosophila* são ideais para estudos intra e interpopulacionais devido sua associação com os cactos hospedeiros, e estes estarem com sua distribuição vinculada às flutuações paleoclimáticas e paleogeomorfológicas. Por essas razões, o *cluster buzzatii*, e, especificamente o *sibling set serido*, têm sido alvo de vários estudos em genética evolutiva. As análises entre as espécies do *cluster* mostram uma

estrutura populacional com fluxo gênico restrito pela distância, contato secundário entre as espécies resultando em simpatria e introgressão, populações politípicas e acasalamentos interespecíficos obtidos experimentalmente (Manfrin e Sene, 2006). Portanto, o estudo das relações filogenéticas entre os membros deste grupo ainda abre espaço para novas hipóteses, uma vez que com o conjunto de dados obtidos até o momento ainda não foi possível se estabelecer de forma definitiva os eventos de especiação que originaram o grupo.

Nesse contexto, o DNA ribossômico tem se constituído numa importante ferramenta para análise da variabilidade genética entre espécies crípticas ou mesmo em estudos interpopulacionais, baseados principalmente na diversidade das suas regiões não codificadoras IGS, ITS-1 e ITS-2.

I.4 O DNA ribossômico

O DNA ribossômico (rDNA) dos eucariotos é constituído por uma família multigênica, responsável pela síntese dos RNAs ribossomais e está organizado em unidades repetitivas (RU) *em tandem* nas regiões organizadoras nucleolares (NORs). Cada RU consiste de seqüências altamente conservadas codificadoras dos rRNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas com regiões não codificadoras menos conservadas. Na maioria dos animais existem de 100 a 500 cópias das unidades repetitivas do rDNA no genoma nuclear (Hoy, 1994). Cada (RU) é composta por uma região promotora ETS (do inglês, *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do rRNA 18S, uma região interna não codificadora ITS-1 (do inglês, *Internal non coding Transcribed Spacer*), uma região codificadora do rRNA 5,8S, uma segunda região não codificadora ITS-2, uma região codificadora do rRNA 28S e, finalmente, por uma região não codificadora intergênica IGS (do inglês, *Intergenic non Transcribed Spacer*). O esquema abaixo sumariza a organização do rDNA em eucariotos (Hillis & Dixon, 1991; Polanco *et al.*, 1998).



Herwerden, *et al.* (1999) utilizaram dados do sequenciamento da região ITS-1 para analisar as relações filogenéticas e a variação intra e interespecífica em espécies do gênero *Paragonimus* (Trematoda: Digenea). Em carrapatos do gênero *Cecidophyopsis* diferenças na sequência da região ITS-1 foram utilizadas para identificar espécies (Kumar *et al.*, 1999). Variações da sequência da região ITS-1 foram encontradas para dois grupos de peixes ciclídeos indicando uma origem monofilética para os mesmos (Booton, *et al.*, 1999).

Em insetos, análises das regiões intergênicas do rDNA e do DNA mitocondrial foram utilizadas para identificar as espécies crípticas em populações do mosquito *Anopheles freeborni* e *A. hermsi* (Porter e Collins, 1991). Essas análises ressaltaram as diferenças espécie-específicas que não tinham sido constatadas anteriormente pela análise do DNA mitocondrial em 5 colônias de *A. freeborni* e em 3 colônias de *A. hermsi*. Tartarotti e Ceron (2005) constatarem a diferenciação entre Triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*.

Em *Drosophila*, sequências nucleotídicas da região ITS-1 foram determinadas e utilizadas, juntamente com outras sequências nucleares e mitocondriais no estabelecimento de uma filogenia para as espécies do grupo *saltans*. Entretanto, esses dados ainda não resolveram completamente as relações filogenéticas dentro do grupo (O'Grady *et al.*, 1998).

Trabalhos referentes à região ITS-1 em espécies de *Drosophila* do grupo *repleta* são escassos. Estudos em espécies deste grupo demonstraram um polimorfismo de tamanho para a região ITS-1 envolvendo *D. mulleri* e *D. arizonae*, ambas pertencentes ao complexo *mulleri*. Para *D. mulleri* o comprimento do fragmento amplificado da região ITS-1 corresponde a 600pb, enquanto que para *D. arizonae* é de 500pb. Além disso, análises dos híbridos interespecíficos entre *D. mulleri* e *D. arizonae* demonstrou que as unidades repetitivas do rDNA nessas espécies estão localizadas no cromossomo X e nos microcromossomos (Baffi & Ceron, 2002).

Estudos mais recentes envolvendo a dinâmica evolutiva de elementos transponíveis nos *loci* do DNA ribossômico foram realizados por Averbeck e Eickbush (2005). Essas análises são concernentes à porcentagem de inserção dos retroelementos *R1* e *R2* nas unidades do DNA ribossômico presentes no cromossomo X de *Drosophila melanogaster* após várias gerações, e dessa forma, foi possível se estudar o tipo e a distribuição dos eventos de recombinação que deram origem à evolução em concerto desses *loci*.

Embora as relações filogenéticas entre as espécies do *cluster buzzatii* já tenham sido amplamente investigadas utilizando-se outros marcadores, análises de seqüências nucleares ainda não foram realizadas. O espaçador intergênico ITS-1 é adequado a esse tipo de análise porque corresponde a uma região não codificadora que apresenta uma alta variabilidade

interespecífica, e pelo fato de que as espécies do *cluster buzzattii* compreendem um grupo evolutivo em processo de especiação recente.

II. OBJETIVOS

No presente estudo propomos uma análise da sequência da região intergênica ITS-1 nas espécies do *cluster buzzatii*, com os seguintes objetivos:

- 1) Identificar eventuais polimorfismos de tamanho da região ITS-1 em várias linhagens das espécies do *cluster buzzatii*. Essa análise permitirá a observação dos possíveis polimorfismos intra e interespecíficos;
- 2) Seqüenciar a região ITS-1 em todas as linhagens, e estabelecer uma árvore filogenética para as espécies do *cluster buzzatii* baseada na comparação dessas seqüências;
- 3) Comparar as relações filogenéticas encontradas com aquelas já descritas para o *cluster buzzatii* com a utilização de outros marcadores.

III. MATERIAL & MÉTODOS

III.1. Linhagens

As linhagens e procedência das espécies de *Drosophila* do *cluster buzzatii*, estão apresentadas na tabela 1. Todas as linhagens nos foram cedidas pelo Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e pela Dra. Maura Manfrin, do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, ambas pertencentes à Universidade de São Paulo. Também foi analisada uma linhagem de *D. richardsoni* (*cluster stalker*), do complexo *buzzatii*, obtida pelo Prof. Fábio do Centro de Estoques Bowling Green, Estados Unidos, registrada sob o código 1421, no referido Centro.

Tanto amostras do DNA previamente extraídas e estocadas à -20°C, como amostras de DNA obtidas de espécimens vivos ou congelados à -20°C ou fixados em etanol a 70% foram utilizadas nesse trabalho.

Tabela 1. Linhagens e procedência das espécies de *Drosophila* do *cluster buzzatii* analisadas.

Espécie	Código da Linhagem	Procedência	
<i>D. serido</i>	H49F1M	Guaratuba/PR	Brasil
	1431.3	Milagres/BA	Brasil
<i>D. seriema</i>	D54M	Grão Mongol/BA	Brasil
	D40F1M	Serra do Cipó/MG	Brasil
<i>D. koepferae</i>	B26D2	Famatina	Argentina
<i>D. borborema</i>	1281.2	Milagres/BA	Brasil
<i>D. richardsoni</i> ^a	1421		

^a: espécie pertencente ao *cluster stalker* do complexo *buzzatii*

III.2. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de moscas coletadas dos estoques, de moscas preservadas à -20°C ou material fixado em etanol. A extração do DNA foi realizada com o auxílio do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification PROMEGA, seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram armazenadas à -20°C. Todas as amostras de DNA foram obtidas a partir de um único indivíduo.

III.3 Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação das regiões intergênicas ITS-1

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 μ L contendo 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, tampão de PCR, solução de dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 3mM e 4 μ L de uma solução contendo 33 ng/ μ L de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 5'CCTAACAAGGTTTCCGTAGG (*forward*) e 5'CCTAACAAGGTTTCCGTAGG (*reverse*) que se hibridizam à extremidade 3' do rDNA 18S e ao início da região 5' do rDNA 5,8S, respectivamente. Esse conjunto de oligonucleotídeos permite a amplificação da região intergênica ITS-1 por inteiro, tendo sido inicialmente utilizados para a análise do polimorfismo da região ITS-1 em *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* (Dr. Jonathan B. Clark, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade do Arizona em Tucson, comunicação pessoal). Esse conjunto também já foi utilizado para a amplificação da região intergênica ITS-1 em *Zaprionus indianus* (Baffi *et al.*, 2000).

As condições para as reações de amplificação foram as seguintes: 3 minutos a 95°C para a desnaturação prévia do DNA, 35 ciclos de reação consistindo cada ciclo de 1 minuto a 95°C para desnaturação da cadeia de

DNA, 1 minuto a 50°C para a ligação dos oligonucleotídeos iniciadores e 1 minuto a 72°C para a polimerização da cadeia, e em seguida uma extensão final por 2 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram então separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados em solução contendo 0,01% de brometo de etídeo e visualizados sob transiluminação ultravioleta.

III.4 Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

O seqüenciamento da região espaçadora ITS-1 foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos do Departamento de Biologia deste Instituto, com a colaboração da Profa. Dra. Paula Rahal Liberatore. As análises foram realizadas utilizando-se de seqüenciador automático ABI Prism 377 da Applied Biosystems Inc.

Para as reações de seqüenciamento direto de fragmentos ITS-1 amplificados por PCR, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS-1 *forward* (F) e *reverse* (R) na concentração 10 pmols/ μ l, em conjuntos de reações em separado, com 2 μ l da solução de DNA obtida a partir da extração de um único indivíduo e subsequente marcação fluorescente com o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* da *Perkin Elmer*.

Após a marcação, os produtos amplificados foram precipitados em 100 μ l de etanol absoluto gelado, 5 μ l de acetato de amônio 3M e 30 μ l de água. Em seguida, foram centrifugados por 30 minutos a 3200 rpm a 4°C. Ao precipitado foi adicionado 200 μ l de etanol 70% para lavagem, seguido de centrifugação por 5 minutos em 3200rpm à 4°C. Esse procedimento foi

repetido uma vez e o precipitado foi colocado em estufa à 37°C por uma hora para secagem.

Para o seqüenciamento, as amostras receberam 1,5µl de *loading buffer* (formamida e *blue dextran*) e foram homogeneizadas 25 vezes por inversão. Foram, então, desnaturadas por 2 minutos a 95°C e mantidas no gelo até o momento de aplicação no gel de poliacrilamida à 5% do seqüenciador.

III.5 Análises das Seqüências

O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para a determinação das relações filogenéticas entre as seqüências ITS-1 das espécies de *Drosophila* do *cluster buzzatii* foi utilizado o software MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) em plataforma *Windows*. Análises filogenéticas das seqüências ITS-1 foram obtidas pelo método *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) e pelo método da máxima parcimônia utilizando-se o algoritmo *branch-and-bound* presente no programa MEGA 3.1. Para a determinação dos limites de confiança nos “nós”, os dados foram submetidos ao test de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) para 1000 repetições.

IV. RESULTADOS

IV.1. Amplificação e caracterização inicial da região ITS-1

Inicialmente a região intergênica ITS-1 foi amplificada por PCR nas espécies do *cluster buzzatii* e *D. richardsoni* (*cluster stalker*), seguindo-se a metodologia descrita em materiais e métodos. Pode ser observado na figura 1 que os fragmentos amplificados, correspondentes à região ITS-1, apresentam tamanhos na faixa de 500 a 600 pb. Amostras dos fragmentos amplificados foram submetidas à digestão com as endonucleases de restrição *Eco* RI, *Alu* I, *Hind* III, *Sal* I e *Hae* III. Nenhum sítio de restrição foi encontrado nas seqüências correspondentes à região ITS-1 nessas espécies.

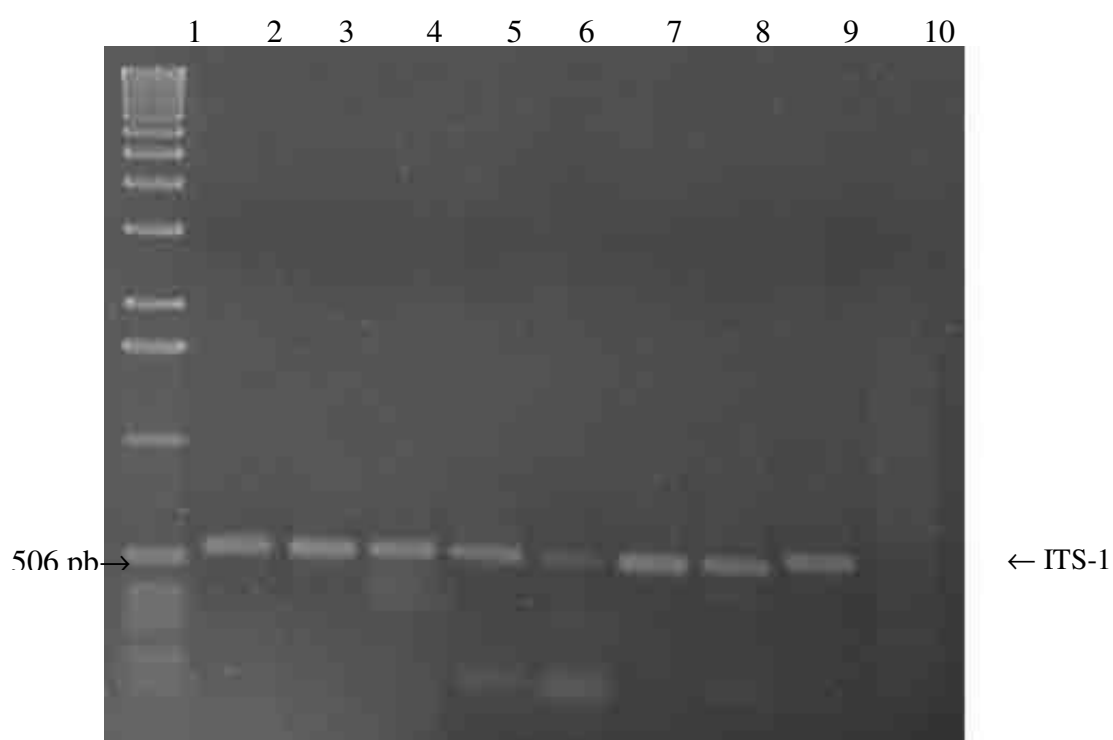


Figura 1. Gel de agarose a 1,5% mostrando o resultado da amplificação por PCR da região intragênica ITS-1 em linhagens do complexo *buzzatii*. Colunas: 1- Leader 1kb; 2- *D. richardsoni* 1421.0; 3- *D. serido* 1431.3; 4- *D. borborema* 1281.2; 5- *D. serido* H49F1M; 6- *D. seriema* D54M; 7- *D. seriema* D40F1; 8- *D. koepferae* B26D2; 9- *D. buzzatii* Ellen 3; 10- controle negativo com água.

IV.2. Análise das seqüências

Os produtos amplificados por PCR foram utilizados diretamente para o seqüenciamento. Todas as seqüências foram determinadas pelo método de seqüenciamento de DNA por terminação de cadeia desenvolvido por Sanger, utilizando-se didesóxinucleotídeos fluorescentes além dos desoxinucleotídeos comuns.

Os resultados obtidos permitiram o alinhamento das seqüências para a região ITS-1 como mostrado na figura 2. Embora haja divergências das seqüências ITS-1 entre as espécies analisadas, é possível, por outro lado, observar-se algumas regiões conservadas.

Para que o alinhamento múltiplo entre as seqüências ITS-1 fosse corretamente estabelecido, foram desconsideradas as extremidades cujos nucleotídeos não eram totalmente alinhados, ou seja, todas as posições nas extremidades que continham intervalos em qualquer uma das seqüências. Este tipo de procedimento não conduz a uma subestimativa na divergência, uma vez que quaisquer alterações nucleotídicas que eventualmente tenham ocorrido nestas regiões seriam desconsideradas no alinhamento múltiplo das seqüências.

Assim, dentre as 690 posições analisadas, foram encontrados 152 sítios conservados e 173 sítios informativos para parcimônia considerando-

se todas as seqüências. A composição nucleotídica dessas seqüências pode ser observada na tabela 2. O número médio total de nucleotídeos obtido para alinhamento foi de 493.4, sendo encontrada uma porcentagem superior no conteúdo de A-T, cerca de 71,5%, em relação ao conteúdo de G-C, cerca de 28,5%, em todas as seqüências.

```

#D._richardsoni      -----
#D._koepferae        -----TTCCG AGGA?GCGCC ACGGCTAAGA AGGTTGCCGT
#D._borborema        -----CCTGC GGAAGGATCA TTAT?G?A?A ATGTT?TTAT
#D._serido_1431.3    -----CCTG- GGAAGGATCA TTATTGA--A ATGTTTTT--
#D._serido_H49F1M    -----CCTGC GGAAGGATCA TTATTGTATA ATGTTCTTAT
#D._seriema_D40F1M   -----? GAGA?A?GCT ???G?GAACA AGGTTCCC?T
#D._seriema_D54M     -----TT?CG ?GGACGCGC- ACG????AGG ----TTCCGT

#D._richardsoni      -TTT??TC?G G-GA?CTCT? TGGAAATTTCG AGGTTAT?G? GGA?GAGAAG
#D._koepferae        AGG.CGATGA A-..A.G.-G CACCGTAA.A G...T.C.? ATGTCGAT?A
#D._borborema        CCG.TAATAA A--.AA-AAA ATTTT..ATT .TA.ATGAAA TTTT.AC GT
#D._serido_1431.3    CCG.TAAAAA A--.AA---A ATTTT..ATT .AA.ATAAAA TTTT.ATGT
#D._serido_H49F1M    CCG.TAATAA A--.AAGAAA ATTTT..ATT .AA.ATAAAA TTTT.ATGT
#D._seriema_D40F1M   AGG?CGATGA AA..A.G.AA CA?CG.?A.T .....T?A?A ?TGT?.ATG.
#D._seriema_D54M     ??G.CGATGA A-..A.G.AG CATCG?A??A ?...?TC?.? A.?T??ATG?

#D._richardsoni      CAAGG???TT TGTTTTAGGT ATAAGTC?TT TA?G?CAACG AAA?G?AATA
#D._koepferae        A?.A----C ?AAC?GCA.C ?.C.C.TAG. .GAAGA.CAA ...ACA..AC
#D._borborema        ..----- .AA??-AA. G.TTA.TCAC .GTTTGGT. ..GAAC..A.
#D._serido_1431.3    ..----- .AAA.-AA. G.TTA.TC-C .GTTTGGT. ..GAAC..A.
#D._serido_H49F1M    ..----- .AAA..TAA. G.TTA.TCAC CGTTTGGT. ...AAC..A.
#D._seriema_D40F1M   A?.T----- ??A..?.?.C ?.T.T..A-C .GTTTGGT. ..GAAC..A.
#D._seriema_D54M     .?.A??- .?AACG?T.? ..C?T.TGG. .CT.G?G?..? .TGAA?..?G

#D._richardsoni      TAAAC?GCG? GTATA?GGGA CCATAGTATA CATGCGTTGC ACAG-ACGTA
#D._koepferae        A...AATT.C .?G?.TAT.G AA.C.T.... ..... -.....
#D._borborema        A.TTGC.T.T A...--... ..... -.....
#D._serido_1431.3    A.TTG-.T.T A...--... ..-C..... ..... -.....
#D._serido_H49F1M    A.TTGC.T.T A...--... ..C..... ..... -.....
#D._seriema_D40F1M   A.TTGC.T.T A...--... ..... ..... -.....
#D._seriema_D54M     C.GCAT?T.- -----.. ..G.TT.T?. .G..?....A .?.AC....C

#D._richardsoni      TTGTTTCATCA CAAAAA?AT TGTATTTATT GTTATGTGAG CATACGTTAT
#D._koepferae        ...G....TT A.C.C.---- -----... ..C.AA.G. ....
#D._borborema        ...G....T. AC.....-- -----... ..G.A.... ....
#D._serido_1431.3    ...CC...T. AC....C--- -----... ..G.A..G. ....
#D._serido_H49F1M    ...CC...T. AC.....-- -----... ..G.A.... ....
#D._seriema_D40F1M   ...G....T. AC.....-- -----... ..G.A.... ....
#D._seriema_D54M     A?.G....T. ?C..???- -----... ..G.A.... ....

#D._richardsoni      AT?A?CGCAA CA--CCTAAA TATATA-TGT TGTACCTGAT TTCAGGTTAA
#D._koepferae        ..A.A.?..G ..A-..... ..A...-... .....
#D._borborema        ..A.A..... ..AA..... ..-..... .....
#D._serido_1431.3    ..A.A..... ..AA..... ..-..... .....
#D._serido_H49F1M    ..A.A..... ..AA..... ..-..... .....
#D._seriema_D40F1M   ..A.A..... ..AA..... ..-..... .....
#D._seriema_D54M     ..A.A..... ..AA..... ..-..... .....

#D._richardsoni      TGCTTTGCAT AATATCTATA AAAATATATA TAGTATTTTG TGTA-----T
#D._koepferae        ..... ..-..... .G..... .TA.-..G.A .A.-----.
#D._borborema        ..... ..-..... .G..... .TA.-..G.. .A..ATTTA.
#D._serido_1431.3    ..... ..-..... .G..... .TA.-..G-. .A..ATTTA.
#D._serido_H49F1M    ..... ..-..... .G..... .TA.-..G.. .A..ATTTA.
#D._seriema_D40F1M   ..... ..-..... .G..... .TA.-..G.. ?A..ATTTA.
#D._seriema_D54M     ..... ..-..... .G..... .TA.-..G.. .A..ATTTA.

```

```

#D._richardsoni   ATAAAAGAT- TTTGTCATAT ACC?TATTTT TATAGATT?T GTAAAACTAA
#D._koepferae     ..T...TC.A ..... .T.A..... .....A. ....
#D._borborema     T.T...CC.A .....G. .T.A..... .....A. ....
#D._serido_1431.3 ..T...CC.A .....G. .T.G..... .....A. ....
#D._serido_H49F1M ..T...CC.A .....G. .T.A..... .....?G? .....
#D._seriema_D40F1M ..T...CC.A .....G. .T.A..... .....A. ....
#D._seriema_D54M  ..T...CC.A .....G. .T.A..... .....A. ....

#D._richardsoni   G?CATTTTCGC AACATTGTTT AGGTATAAAA AA?TTTTTTT TATTGAAGG?
#D._koepferae     .A..... .....G... ..AA..... --.....A
#D._borborema     .A..... ..... ?A.....? A-...?..A
#D._serido_1431.3 .A..... .....T TT-..... A-.....A
#D._serido_H49F1M .A..... ?..... ..?....TT ---..... A-??...A
#D._seriema_D40F1M .A.....?. .....GG.. ..AA..... .....A
#D._seriema_D54M  .A.....?. ..... ..A..... A-.....A

#D._richardsoni   ?TTGATATAT GCCAGTA-AA ATGGTG-GTT TTT--AATT- C?-?TCAATA
#D._koepferae     A.....?... .....-.. ....G.?A.. ...--....T .T-T.A..A.
#D._borborema     A..... A.....?-.. CC.?..TA.. CA--AGG..T .??TA.GG.?
#D._serido_1431.3 A..... .....-.. .....TA.. ...--....T --T.....
#D._serido_H49F1M A..... A...?.?C. ?C.?C.TA.. C..TGGT..T .T?T???T.?
#D._seriema_D40F1M A.....?. .....?-.. ....?..TA.. ...--....T .T-T.....
#D._seriema_D54M  A..... .....-.. .....?A.. ...--....T .T-T.....

#D._richardsoni   AA?ATGTTTG TGACGTAATG A?ATAAAAAC CAAA-TAATT ATATCACTCT
#D._koepferae     ..A..T...A ..... .A.....T T...A...A. ....A.GG..
#D._borborema     G.TGAAGAAT C?CA.?TCC. TA.C..GGTT T?CGTAGC.. GGAAG.?..G
#D._serido_1431.3 ..T....AAT ..TGAGT.GA .T.AT...TT T.GGCAGTC- -----
#D._serido_H49F1M ?.TGAAGAAT C.CA.GTCC. TA.CT.GGTT T?C?TAG?.. ?GGAAG.??
#D._seriema_D40F1M ..T-..... ?....?.... ?A..G?..TT T...AA..AA ....?.....
#D._seriema_D54M  ..T..... ..... .A..?..TT T...A...? ?.....

#D._richardsoni   AAGCGGTGGA TCACTCGGCT CATGGGTCGA TGAAAAAAAAA
#D._koepferae     .....?... ..... ..G..... .....CGC
#D._borborema     CC..T.A.AT C.?G.TCCTG -----
#D._serido_1431.3 -----
#D._serido_H49F1M CC..T.A.AT CA??..CTG- -----
#D._seriema_D40F1M ....?..... ..T..... .....C?..? ....G..C?C
#D._seriema_D54M  ..... ..... .....G..CGC

```

Figura 2. Alinhamento múltiplo das seqüências ITS-1 nas espécies analisadas de *Drosophila* do complexo *buzzatii*. Posições que compartilham nucleotídeos idênticos são marcadas como pontos; as deleções são indicadas como traços e nucleotídeos indeterminados são representados por (?).

Tabela 2. Composição nucleotídica das seqüências ITS-1 obtidas das linhagens do complexo *buzzatii*. Todas as frequências são dadas em porcentagem.

	Total*	T	C	A	G
D. richardsoni	489	35.2	11.9	34.8	18.2
<i>D. koepferae</i>	529	30.6	13.8	37.4	18.1
<i>D. borborema</i>	505	36.2	13.1	34.5	16.2
<i>D. serido 1431.3</i>	479	39.0	10.4	35.7	14.8
<i>D. serido H49F1M</i>	501	37.5	13.6	33.7	15.2
<i>D. seriema D40F1M</i>	509	34.0	12.6	36.0	17.5
<i>D. seriema D54M</i>	494	34.8	13.6	33.0	18.6
Média	493.4	35.6	12.5	35.9	16.0

(*): corresponde ao número total de nucleotídeos analisados em cada seqüência.

IV.3. Análises filogenéticas

O software MEGA 3.1 foi utilizado para a análise filogenética no conjunto de dados. Os métodos da máxima parcimônia e de distância foram utilizados para o estabelecimento das relações filogenéticas entre as seqüências analisadas e demonstraram topologias semelhantes. Dos 690 sítios alinhados, foram encontrados 152 sítios conservados e 173 sítios informativos para parcimônia.

Os valores das distâncias estimadas, com base na comparação das seqüências ITS-1, pelo método de Kimura dois-parâmetros (Kimura, 1980) são apresentados na tabela 3, para as espécies do *cluster buzzatii* e *D. richardsoni* (*cluster stalkerii*). Foram incluídas nas análises filogenéticas os dados das seqüências ITS-1 de *D. virilis* e *D. melanogaster*, obtidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), com os códigos de acesso Z28414 (Schloetterer *et al.*, 1994) e J011703 (Semionov & Makova, 1997), respectivamente. A tabela 4 mostra as distâncias obtidas somente para as espécies do *cluster buzzatii*. A distância estimada média obtida em relação a todas as linhagens analisadas foi de 0.373; e, considerando-se somente as espécies do *cluster buzzatii*, o valor médio de distância foi de 0.168.

Com relação às árvores obtidas pela análise das distâncias entre as seqüências ITS-1 analisadas, empregou-se o algoritmo *neighbor-joining*

(Saitou & Nei, 1987), que consiste de um algoritmo heurístico para construção de topologias em que o conceito de evolução mínima está implícito e, portanto, realiza a procura pela árvore com menor soma total dos ramos. Nesta análise também utilizou-se o suporte estatístico de *bootstrap*, com 1000 replicações. Os resultados podem ser observados nas figuras 3.A e 4.A, considerando-se todas as espécies analisadas ou apenas àquelas pertencentes aos *cluster buzzatii*, respectivamente.

Para a análise de máxima parcimônia utilizou-se o algoritmo *branch-and-bound* (Hendy & Penny, 1982), o qual trata-se de um algoritmo exato que reduz o tempo computacional para um conjunto grande de dados e elimina possíveis árvores obtidas com maior número de passos. Para o suporte estatístico da topologia obtida foi empregado a análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 replicações. Esses dados são apresentados nas figuras 3.B e 4.B e mostram relações filogenéticas similares àquelas obtidas pelo método de distância.

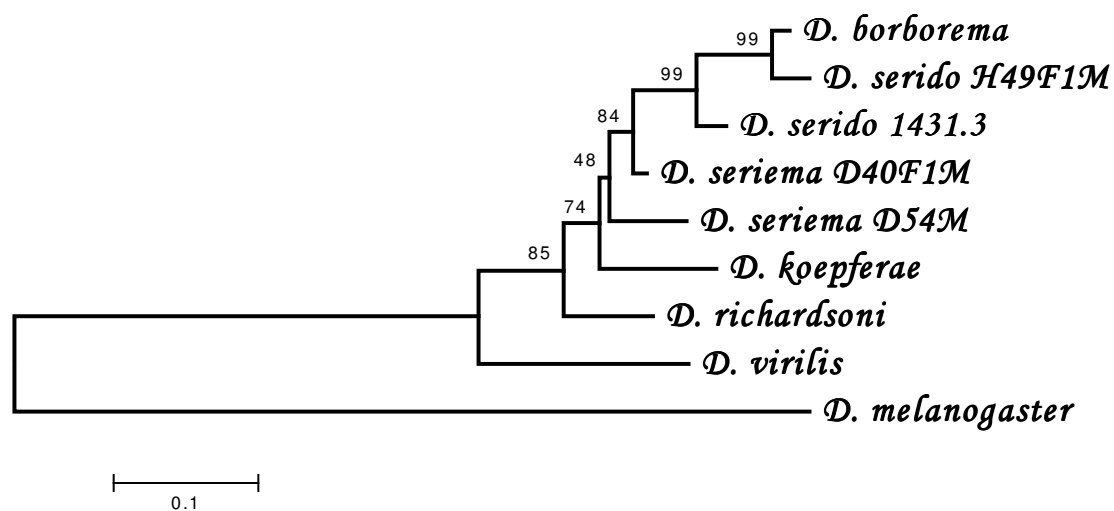
Tabela 3. Distâncias estimadas pelo método de Kimura dois-parâmetros entre as seqüências ITS-1 das linhagens analisadas do *cluster buzzatii*, *D. richardsoni* (*cluster stalker*), *D. virilis* e *D. melanogaster*.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
(1) <i>D. melanogaster</i>									
(2) <i>D. virilis</i>	1.035								
(3) <i>D. richardsoni</i>	1.066	0.286							
(4) <i>D. koepferae</i> B26D2	1.031	0.312	0.180						
(5) <i>D. borborema</i> 1282.2	1.054	0.324	0.213	0.217					
(6) <i>D. seriema</i> D40F1M	0.967	0.252	0.127	0.119	0.111				
(7) <i>D. seriema</i> D54M	1.019	0.307	0.144	0.144	0.162	0.082			
(8) <i>D. serido</i> 1431.3	1.017	0.282	0.185	0.166	0.103	0.086	0.136		
(9) <i>D. serido</i> H49F1M	1.063	0.341	0.237	0.221	0.040	0.132	0.184	0.083	

Tabela 4. Distâncias estimadas pelo método de Kimura dois-parâmetros entre as seqüências ITS-1 das linhagens analisadas do *cluster buzzatii*

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(1) <i>D. koepferae</i> B26D2						
(2) <i>D. borborema</i> 1282.2	0.275					
(3) <i>D. serido</i> 1431.3	0.239	0.098				
(4) <i>D. serido</i> H49F1M	0.274	0.043	0.082			
(5) <i>D. seriema</i> D40F1M	0.133	0.154	0.140	0.175		
(6) <i>D. seriema</i> D54M	0.146	0.217	0.202	0.240	0.097	

A.



B.

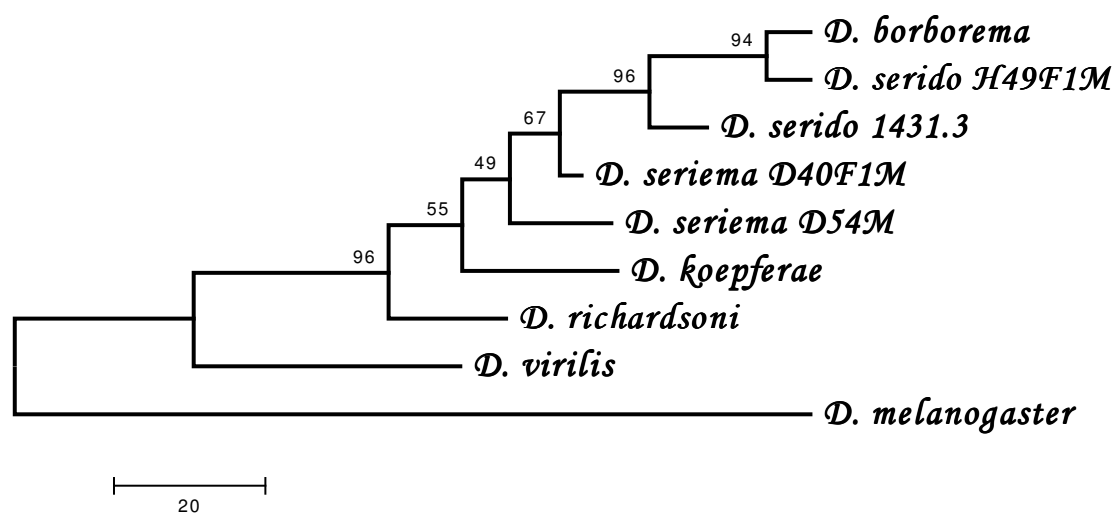
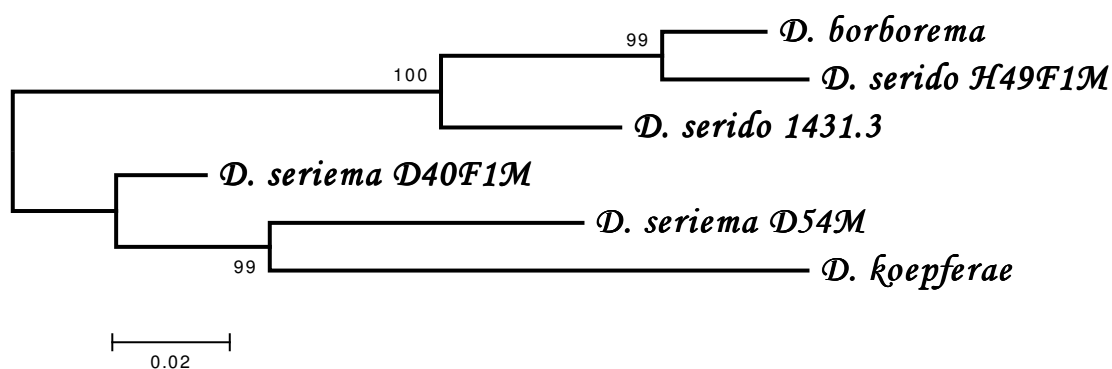


Figura 3(A e B). A) Árvore obtida com o algoritmo *neighbor-joining* para as seqüências ITS-1 das linhagens de *Drosophila* pertencentes ao *cluster buzzatii*. B) Árvore obtida pelo método da máxima parcimônia. As espécies *D. richardsoni*, *D. virilis* e *D. melanogaster*, foram utilizadas como grupos externos. Os valores de *bootstrap* (1000 replicações) mostrados abaixo dos “nós”

A.



B.

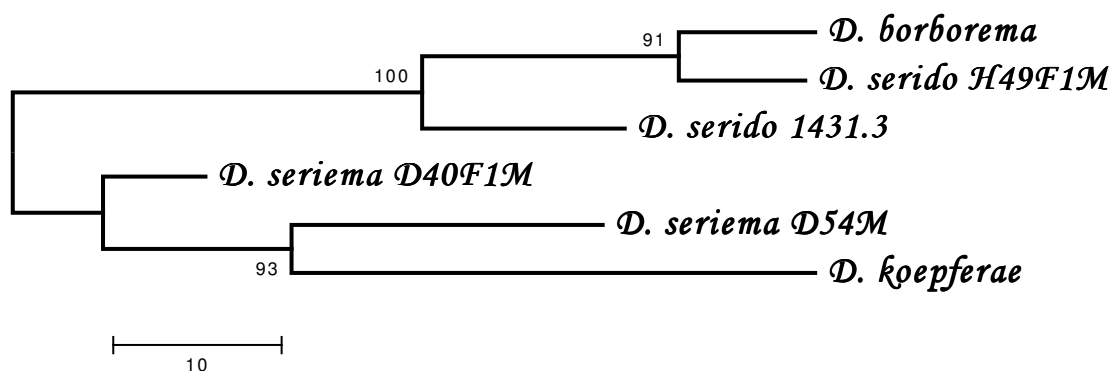


Figura 4 (A e B). A) Árvore obtida com o algoritmo *neighbor-joining* para as seqüências ITS-1 das linhagens de *Drosophila* pertencentes somente ao *cluster buzzatii*. B) Árvore obtida com o método da parcimônia para as seqüências ITS-1 das linhagens de *Drosophila* pertencentes somente ao *cluster buzzatii*. Os valores de *bootstrap* (1000 replicações) mostrados abaixo dos “nós”.

V. DISCUSSÃO

O DNA ribossômico é constituído por uma família multigênica na qual se repetem *em tandem* uma série de cístrons ribossômicos que contém as seqüências codificadoras dos RNA ribossômicos 18S, 5,8S e 28S, que por sua vez estão separadas por seqüências intergênicas transcritas, não codificadoras, denominadas ITS-1 e ITS-2. O modo como tais genes evoluíram pode ser explicado pelo fenômeno da evolução em concerto, uma vez que as múltiplas cópias dos genes ribossômicos são muito semelhantes num mesmo indivíduo, mas diferem entre as espécies, principalmente com relação às regiões espaçadoras não-codificantes (Matioli, 2001).

As regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2 vêm sendo utilizadas em diversos estudos que visam a análise das relações evolutivas entre classes taxonômicas mais próximas, inclusive em insetos. Em dípteros, do gênero *Anopheles*, foi realizada a identificação de espécies crípticas utilizando-se dados do seqüenciamento da região ITS-2 (Beebe *et al.*, 1999). Em outro estudo, diversas espécies crípticas de *Culex* foram diferenciadas através de produtos amplificados correspondentes à região intergênica ITS-1 (Toma *et al.*, 2000).

Nossos resultados, com base na composição nucleotídica das seqüências da região ITS-1, mostram maior conteúdo de A-T (~70%) em relação ao conteúdo G-C (~30%) para essa região em todas as espécies analisadas. Esses resultados estão em concordância com aqueles obtidos para seqüências ITS-1 no grupo de *Drosophila melanogaster*, no qual observou-se alta freqüência de conteúdo A-T, com média maior que 70% (Schlöterer *et al.*, 1994). Para espécies do *cluster buzzatii*, Kuhn e Sene (2005) encontraram conteúdo A-T variável entre 62% em *D. antonietae* à 71,9% em *D. buzzatii*, em seqüências de DNA satélite, também presentes em regiões heterocromáticas. Além disso, pudemos também constatar que esta alta quantidade de conteúdo A-T excede a média encontrada para esta característica para outras regiões de DNA não codificantes em *Drosophila*, cujo valor médio é de ~60% (Moriyama e Hartl, 1993). Uma possível explicação para este alto nível de conteúdo A-T na região espaçadora ITS-1 em relação às outras regiões de DNA não codificantes pode estar relacionado com o fato de que os grupamentos de DNA ribossômico encontram-se em grande maioria na heterocromatina. Altos índices de conteúdo A-T também foram observados para seqüências de DNA satélite, que também se posicionam nesta região do genoma (Strachan *et al.*, 1985).

O alinhamento múltiplo das seqüências ITS-1 nos possibilitou verificar a ocorrência de algumas regiões conservadas e outras que exibem grau elevado de divergência, quando analisamos as seqüências ITS-1.

Análises comparativas anteriores baseadas em regiões ITS-1 do DNA ribossômico de *Drosophila* também indicaram regiões que exibiam um padrão diferenciado de convergência/divergência. A presença de seqüências conservadas nas regiões espaçadoras ITS entre as espécies analisadas sugere que as mesmas possam desempenhar algum papel funcional importante na estrutura secundária dos transcritos ribossômicos (Schlöterer *et al.*, 1994).

As relações filogenéticas determinadas em nossas análises estão em concordância com aquelas mostradas previamente por Ruiz *et al.* (2000) e Manfrin *et al.* (2001), que estudaram a sistemática evolutiva das espécies pertencentes ao *cluster* de *D. buzzatii* com base na análise de inversões cromossômicas e na comparação de seqüências do gene mitocondrial COI. Nossos resultados mostram que as espécies do *cluster buzzatii* analisadas constituem um grupo monofilético, e que *D. richardsoni* (*cluster stalker*) apresenta-se como uma espécie irmã colocada em uma posição basal em relação às espécies do *cluster buzzatii*. Resultados semelhantes a estes foram também demonstrados por Ruiz e Wasserman (1993), quando investigaram as relações evolutivas entre os três *clusters* de espécies (*stalker*, *martensis* e *buzzatii*) que compõem o complexo *buzzatii*. A posição basal de *D. richardsoni* em relação aos outros *clusters* do complexo *buzzatii* também foi demonstrada através de análises de seqüências do gene da xantina desidrogenase (*Xdh*), provenientes de várias

espécies componentes deste complexo de espécies (Rodriguez-Trelles *et al*, 2000).

Em relação aos resultados apresentados nas figuras 3 e 4 podemos observar que *D. borborema* posiciona-se mais proximamente a *D. serido* e *D. seriema* do que em relação à *D. koepferae*. Nossas observações estão alinhadas com aquelas obtidas para essas espécies citadas através de análises de inversões cromossômicas (Ruiz *et al.*, 2000), de genes mitocondriais (Manfrin *et al.*, 2001) e também de seqüências de DNA satélite (Kunh e Sene, 2005). A divergência entre as linhagens de *D. serido* exibida nos resultados apresentados reforça a grande variação populacional intraespecífica, já demonstrada para essa espécie através de diversas características, tais como polimorfismos de cariótipos (Tosi e Sene, 1989), diferenças na constituição da terminália (Silva e Sene, 1991), genes mitocondriais (Manfrin *et al.*, 2001) e análises de cladística “aninhada” (de Brito *et al.*, 2002b).

De acordo com os cladogramas apresentados nas figuras 3 e 4, pode-se observar que a linhagem H49F1M de *D. serido* se posicionou mais proximamente a *D. borborema* do que em relação à outra linhagem de *D. serido* (1431.3). Este resultado reforça observações prévias nas quais já havia sido estudada a ampla variabilidade genética exibida pelas populações de *D. serido* (Ruiz *et al.*, 2000). Além disso, estudos anteriores já demonstraram o grau elevado de proximidade genética entre *D.*

borborema e *D. serido*, inclusive considerando as espécies citadas como sendo espécies irmãs (Manfrin *et al.*, 2001).

Com base na análise de cruzamentos interespecíficos e respectivas proles híbridas, Madi-Ravazzi *et al.* (1997), Machado *et al.* (2002) e Machado *et al.* (2006) observaram um certo grau de divergência entre *D. koepferae* em relação às outras espécies do *sibling set serido*. Em alguns cruzamentos envolvendo *D. koepferae* e *D. seriema*; ou *D. koepferae* e *D. gouveai*, não foram observados quaisquer descendentes devido à presença de espermatozóides imóveis nos híbridos. As relações filogenéticas obtidas no presente estudo estão em concordância com os dados mencionados acima, uma vez que a espécie *D. koepferae* está posicionada em um ramo basal nos cladogramas obtidos.

Nas topologias apresentadas nas figuras 3.A e 3.B, pode ser observado que *D. melanogaster* permaneceu como um grupo externo tanto nas análises de distância quanto na árvore de parcimônia, indicando desse modo o elevado grau de divergência entre essa espécie, pertencente ao subgênero *Sophophora*, em relação às outras espécies analisadas, as quais estão incluídas no subgênero *Drosophila*. Ainda com relação às figuras 3.A e 3.B pode-se observar que *D. virilis* posicionou-se na base da sub-árvore na qual estão colocadas as espécies do complexo *buzzatii*. Robe *et al.* (2005) também constataram a divergência das espécies do grupo *virilis* em relação às espécies do grupo *repleta*, ambos pertencentes ao subgênero

Drosophila, através da análise combinada de seqüências do gene α -metildopa, o qual constitui um marcador nuclear; e do gene da citocromo oxidase II, um marcador mitocondrial. Comparações entre análises evolutivas da região ITS com filogenias baseadas em dados de outros marcadores de evolução mais lenta também apresentaram concordância em outros grupos de espécies de *Drosophila* (Schlötterer *et al.*, 1994; O'Grady *et al.*, 1998; Mukha, *et al.*, 2002).

Um aspecto importante a ser ressaltado em relação às relações filogenéticas obtidas através da análise das seqüências do espaçador ITS-1 para as espécies do *cluster buzzatii* (figuras 4.A e 4.B) é o fato de que foram estabelecidas topologias resolvidas, ou seja, não apresentaram quaisquer politomias entre os ramos, mesmo quando eram comparadas seqüências originadas de espécies nas quais foram obtidos reduzidos valores de distância. Esse é um resultado importante, uma vez que em análises com outros marcadores, as relações filogenéticas obtidas para as espécies do *cluster buzzatii* freqüentemente apresentam politomias, dado seu grau elevado de proximidade filogenética.

VI. Conclusões

Todas as espécies de *Drosophila* pertencentes ao *cluster buzzatii* (complexo *buzzatii*, grupo *repleta*) analisadas neste trabalho, respectivamente, *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. serido* e *D. borborema*, além de *D. richardsoni* (*cluster stalkerii*, complexo *buzzatii*, grupo *repleta*), utilizada como grupo externo, apresentaram um fragmento amplificado por PCR, correspondente à região intergênica ITS-1 do rDNA, com comprimentos de aproximadamente 550pb.

A análise de restrição com as endonucleases *Eco* RI, *Alu* I, *Hind* III, *Sal* I e *Hae* III, não evidenciou a existência de nenhum sítio de restrição no fragmento amplificado correspondente à região ITS-1 nas espécies acima citadas.

As seqüências correspondentes à região ITS-1, em todas as espécies analisadas mostraram alto conteúdo A-T, de acordo com dados já mostrados na literatura para regiões não-codificantes do genoma de *Drosophila*.

As relações filogenéticas obtidas a partir dos dados de seqüência da região ITS-1 indicam que as espécies do *cluster buzzatii* constituem um grupo monofilético.

O marcador nuclear baseado na sequência ITS-1 forneceu relações filogenéticas resolvidas, ou seja, sem politomias, e assim, foi adequadamente utilizado para a análise do *cluster buzzatii* o qual é constituído por espécies pouco divergentes.

VII. Referências Bibliográficas

- AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas*, v.3, p.1-19, 1977a.
- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia*., v.52, p.1-23, 1977b.
- AVERBECK, K. T. AND EICKBUSH, T. H. Monitoring the mode and tempo of concerted evolution in the *Drosophila melanogaster* rDNA locus. *Genetics*, v. 171, p. 1837-1846, 2005.
- BAFFI, M.A., LUIZON, M.R., MARIGUELA, V.C. AND CERON, C.R. Análise molecular da região ITS-1 do rDNA em *Zaprionus* sp. (Díptera, Drosophilidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n.3, p.142-143, 2000. (resumo).
- BAFFI, M.A. AND CERON, C.R. Molecular analysis of the rDNA ITS-1 intergenic spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae* and their hybrids. *Biochemical Genetics*, v. 40, p. 411-421, 2002.
- BAIMAI, V., SENE, F. DE M., RODRIGUES-PEREIRA, M.A.Q. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus-breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v.60, p.81-92, 1983.

- BARBASH, D.A. AND ASHBURNER, M. A novel system of fertility rescue in *Drosophila* hybrids reveals a link between hybrid lethality and female sterility. *Genetics*, v.163, p.217-226, 2003.
- BARKER, J. S. F., SENE, F. M., EAST, P. D., PEREIRA, M. A. Q. R. Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. *Genetica*, v. 67, p.161-170, 1985.
- BARKER, J. S. F. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetica (Dordrecht)*, v.92, p.165-175, 1994.
- BEEBE, N.W., ELLIS, J.T., COOPER, R.D., SAUL, A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Molecular Biology*, v.8, n.3, p.381-390, 1999.
- BLOWS, M.W. Interaction between natural and sexual selection during the evolution of mate recognition. *Proc. Royal Society London Ser B*, v. 269, p.1113–1118, 2002.
- BOOTON, G.C., KAUFMAN, L., CHANDLER, M., OGUTO-OHWAYO, R., DUAN, W. AND FUERST, P.A. Evolution of the Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer One (ITS-1) in Cichlid Fishes of the Lake Victoria Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* , v.11, p.273-282, 1999.

- BRITO, R. O. A. de, MANFRIN, M. H., SENE, F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetics and Molecular Biology*, v.25, n.2, p.161-171, 2002.(a)
- BRITO, R. O. A. de, MANFRIN, M. H., SENE, F. M. Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.22, no.1, 131-143, 2002.(b)
- CARSON, H.L., KANESHIRO, K.Y. AND VAL, F.C. Natural hybridization between the sympatric Hawaiian species *Drosophila silvestris* and *Drosophila heteroneura*. *Evolution*, v. 43, p.190-203, 1989.
- CARVAJAL, A. R., GANDARELA, M.R., NAVEIRA, H. F. A three-locus system of interspecific incompatibility underlies male inviability in hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genetica*., v.1, 1-19, 1996.
- COYNE, J.A. Genetics and speciation. *Nature* , v.55, p.511-515, 1992.
- COYNE, J.A., CRITTENDEN, A.P. AND MAH, K. Genetics of pheromonal difference contributing to reproductive isolation in *Drosophila*. *Science*, v.265, p.1461-1464, 1994.
- COYNE, J.A. AND ORR H.A. “Patterns of speciation in *Drosophila*” revisited. *Evolution*, v.51, p.295-303, 1997.
- COYNE JA, ORR HA. *Speciation*. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. 545 p, 2004.

- CRACRAFT, J. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, v.1, p.159-187, 1983.
- DAVIS, A. W.; ROOTE, J.; MORLEY, T.; SAWAMURA, K.; HERRMAN, S. and ASHBURNER, M. Rescue of hybrid sterility in crosses between *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Nature*, v.380, p. 157-159, 1996.
- DOBZHANSKY, T. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York, 1937.
- DOBZHANSKY, T. *Genetics and the Origin of Species*. 3rd edn. Columbia University Press, New York, 1951.
- ETGES, W. J., ARMELLA, M. A, O'GRADY, P. M., HEED, W. B. Two species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the *repleta* group from Mexico. *Annals Entomol. Soc. America.*, v.94, p. 16-20, 2001.
- FANARA, J. J., HASSON, E., RODRIGUEZ, C., SANTOS, M., FONTDEVILA, A. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXIII. Are *Opuntia* hosts a selective factor for the inversion polymorphism? *Heredity*, v.77, n.5, p.500-8, 1998.
- FANARA, J. J., HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution International J. Organic Evolution*, v.55, n.12, p.2615-9, 2001.

- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, n.39, 783-791, 1985.
- FIGUEIREDO, V. L. C., SENE, F. M. Chromosome variability in Brazilian populations of *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v.52, p.555-561, 1992.
- FONTDEVILA, A., RUIZ, A., ALONSO, G., OCANA, J. Evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, v.35, n.1, p.148-157, 1981.
- FONTDEVILA, A., HASSON, E., WASSERMAN, M., SANCHEZ, A., NAVEIRA, H. RUIZ, A. *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. *Annals Entomol. Soc. America*, v.81, p.380-385, 1988.
- HALDANE, J.B.S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genetics*, v.12, p.101-109, 1922.
- HASSON, E., FANARA, J.J., RODRIGUEZ, C., VILARDI, J.C., REIG, O.A., FONTDEVILA, A. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXIV. Second chromosome inversions have different average effects on thorax length. *Heredity*, v.68, n.6, p.557-563, 1992.
- HEED, W. B. The origin of *Drosophila* in the Sonoran Desert. In: Barker, J. S. F. and Starmer, W. T. (eds.), *Ecological genetics and Evolution. The cactus-yeast-Drosophila model system*, Academic Press, Australia, p.65-80, 1982.

- HENDY, M. D.; PENNY, D. Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math. Biosci.*, n.59, p.277-290, 1982.
- HERWERDEN, L., BLAIR, D., AGATSUMA, T. Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogenetics studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.12, n.1, p.67-73, 1999.
- HIGGIE, M., CHENOWETH, S. AND BLOWS, M.W. Natural selection and the reinforcement of materecognition. *Science*, v.290, p.519-521, 2000.
- HILLS, D. M.; DIXON, M. T. Ribossomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Ver. Biol.*, v.66, p.411-453, 1991.
- HOLLOCHER, H., AGOPIAN, K., WATERBURY, J., O'NEILL, R.W. AND DAVIS, A.W. Characterization of defects in adult germline development and oogenesis of sterile and rescued female hybrids in crosses between *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, v.288, p.205-218, 2000.
- HOY, M. A Insect Molecular Systematics and Evolution. In: Insect Molecular Genetics: An Introduction to principles and Applications. (Hoy, M. A eds.) *Academic Press*, p.360-363, 1994.

- HUTTER, P. AND ASHBURNER, M. Genetic rescue of inviable hybrids between *Drosophila melanogaster* and its sibling species. *Nature*, v.327, p.331-333, 1987.
- HUTTER, P., ROOTE, J. AND ASHBURNER, M. A genetic basis for the inviability of hybrids between sibling species of *Drosophila*. *Genetics*, v.124, p.909-920, 1990.
- HUTTER, P. Genetics of hybrid inviability in *Drosophila*. *Advances in Genetics*, v.36, p.157-185, 1997.
- HUTTER, P. X-linked small GTPase and OXPHOS genes are candidates for the genetic basis of hybrid inviability in *Drosophila*. *Development Genes and Evolution*, v.212, p. 504-512, 2002.
- KHADEM, M. AND KRIMBAS, C.B. Studies of the species barrier between *Drosophila subobscura* and *Drosophila madeirensis*. *Heredity*, v.67, p.157-165, 1991.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p111-120, 1980.
- KUHN, G. C. S., RUIZ, A , ALVES, M. A. R., SENE, F. M. The metaphase and polytene chromosomes of *Drosophila seriema* (repleta group; *mulleri* subgroup). *Revista Brasileira de Genética*, v.19, p.209-216, 1996.

- KUHN, G. C. S., BOLLGOENN, S., SPERLICH, D., BACHMANN, L.
Characterization of a species-specific satellite DNA of *Drosophila buzzatii*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v.37, -109-112, 1999.
- KUHN, G. C. S., SENE, F. M. Characterisation and interpopulation variability of a complex *HpaI* satellite DNA of *Drosophila seriema* (repleta group). *Genetica*, v.121, p.241–249, 2004.
- KUHN, G. C. S., SENE, F. M. Evolutionary turnover of two pBuM satellite DNA subfamilies in the *Drosophila buzzatii* species cluster (repleta group): From alpha to alpha/beta arrays. *Gene*, v.349, p.77–85, 2005.
- KUMAR, P. L., FENTON, B., JONES, A. T. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect and Molecular Biology*, v.8, n.3, p.347, 1999.
- KUMAR, S., TAMURA, K. AND NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, n.5, p.150-163, 2004.
- LAPENTA, A. S., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R., MANZATO, J.
A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, v. 84, p.13-29, 1995.

LAPENTA, A. S., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R., CORDEIRO, J.

A. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, v.96, p.95-107, 1998.

MACHADO, L.P., CASTRO, J.P., MADI-RAVAZZI, L. Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n.4A, p.601-608, 2002.

MACHADO, L.P., MADI-RAVAZZI, L., TADEI, W.J. Reproductive relationships and degree of synapsis in the polytene chromosomes of the *Drosophila buzzatii* species cluster. *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, n.1B, p.279-293, 2006.

MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H.E.M., MANZATO, J.A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. *Cytobios*, v.89, n.256, p.21-30, 1997.

MANFRIN, M. H., BRITO, R. O., SENE, F. M. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* cluster (Diptera: Drosophilidae) using mtDNA. *Annals Entomol. Soc. America.*, v.94, p.333-346, 2001.

MANFRIN, M. And SENE, F.M. Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. *Genetica*, v.126, n.1-2, p.57-75, 2006.

- MARIN I, FONTDEVILA A. Evolutionary conservation and molecular characteristics of repetitive sequences of *Drosophila koepferae*. *Heredity*, v.76, p.355-366, 1996.
- MARIN I, FONTDEVILA. Stable *Drosophila buzzatii* - *Drosophila koepferae* hybrids. *The Journal of Heredity*, v.89, n.4, p.336-339, 1998.
- MATEUS, R.P. and SENE, F.M. Temporal and spacial allozyme variation in South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae) *Biochemical Genetics*, v.41, n.7-8, p.219-233, 2003.
- MATIOLI, S.R. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Editora Holos, 202p., 2001.
- MAYR, E. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York, 1942.
- MAYR, E. *Animal Species and Evolution*. Belknap, Cambridge, USA, 1963.
- MOEHRING, A. J., LLOPART, A., ELWYN, S., COYNE, J. A. AND MACKAY, T. F. C. The Genetic Basis of Prezygotic Reproductive Isolation Between *Drosophila santomea* and *D. yakuba* Due to Mating Preference. *Genetics*, v.173, p.215-223, 2006.
- MONTEIRO, S. G. Morfometria multivariada de populações naturais de *Drosophila serido*, *Tese de Doutorado*, Depto. de Genética, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP, 1997.

- MONTEIRO, S. G., SENE, F. M. Estudo morfométrico de populações de *Drosophila serido* das regiões centrais e sul do Brasil. *Revista Brasileira de Genética*, v.18 (suplemento), p.283, 1995.
- MORAES, E. M., SENE, F. M. Relationships between necrotic cactus availability and population size in a cactophilic *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) located on a sandstone table hill in Brazil. *Rev. Biol. Trop.*, v.51,n.1, 205-12, 2003.
- MORAES, E. M., SENE, F. M. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. *Genetica*, v.121, p.119–123, 2004.
- MORALES, A. C. Dinâmica populacional em uma zona de contato entre espécies cactófilas de *Drosophila* nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, *Dissertação de Mestrado*, Depto. de Biologia, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP, 2001.
- MORIYAMA, E.N., HARTL, D.L. Codon usage bias and base composition of nuclear genes in *Drosophila*. *Genetics*, v. 134, n.3, p.847-858, 1993.
- MULLER, H.J. AND PONTECORVO, G. Recombinants between *Drosophila* species the F1 hybrids of which are sterile. *Nature*, v.146, p.199-200, 1940.
- MUKHA, D., WIEGMANN, B. M., SCHAL, C. Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat unit in

- Blattodea* (Insecta). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p.951-960, 2002.
- NAVAJAS, M., COTTON, D., KREITER, S., GUTIERREZ, J. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Experim. Appl. Acarol.*, v.15, p.211, 1992.
- NOOR, M. A. F., GRAMS, K. L., BERTUCCI, L.A., REILAND, J. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS*, v.98, n.21, p.12084-12088, 2001.
- O'GRADY, P. M., CLARK, J. B., KIDWELL, M. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v.15, n.6, pp.656-664, 1998.
- ORR, H.A. Mapping and characterization of a 'speciation gene' in *Drosophila*. *Genet. Res.*, v.59, p.73-80, 1992.
- ORR, H.A. AND IRVING, S. Genetic analysis of the *Hybrid male rescue* locus of *Drosophila*. *Genetics*, v.155, p.225-231, 2000.
- ORR, H.A. The genetic basis of reproductive isolation: insights from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS*, v.102, p.6522-6526, 2005.

- PÄÄLLYSAHO, S., ASPI, J., LIIMATAINEN, J.O. AND HOIKKALA, A. Role of X chromosomal song genes in the evolution of species-specific courtship songs in *Drosophila virilis* group species. *Behavior Genetics*, v.33, p.25-32, 2003.
- PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R., SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites on some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Ciência e Cultura*, v.35, p1313-1319, 1983.
- PICCINALI, R., AGUADE, M., HASSON, E. Comparative molecular population genetics of the *Xdh* locus in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Molecular Biology and Evolution*, v.21, n.1, p.141-152, 2004.
- POLANCO, C., GONZALES, A. I., FUENTE, A., DOVER, G. A. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer region: a possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics*, n.149, p.243, 1998.
- PORTER, C.H., COLLINS, F.H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera, Culicidae). *The American J. of Tropical. Medicine and Hygiene*, n.45, v.2, p.271-279, 1991.

- PRESGRAVES, D. C. A fine-scale genetic analysis of Hybrid incompatibilities in *Drosophila*. *Genetics*, v. 163, p.955-972, 2003.
- PRESGRAVES, D. C., BALAGOPALAN, L., ABMAYR, S. M. AND ORR, H. A. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. *Nature*, v.423, 715–719, 2003.
- RAFAEL, V., ARCOS, G. Subgrupo *inca*, um nuevo subgrupo del grupo *repleta*, com descricao de *Drosophila huancavilcae* N. sp. (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica*, v.3, p.233-243, 1989.
- ROBE, L.J., VALENTE, V.L.S., BUDNIK, M., LORETO, E.L.S. Molecular phylogeny of subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*., v.36, n.3, p.623-640, 2005.
- RODRIGUEZ-TRELLES, F., ALARCÓN, L., FONTDEVILA, A. Molecular evolution and phylogeny of the *buzzatii* complex (*Drosophila repleta* group): a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, v.17, n.7.,p.1112-1122, 2000.
- RUIZ, A., FONTDEVILA, A. Ecologia y evolucion del subgrupo *mulleri* de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta Cient. Venezoelana*,v.32, p.338-345, 1981.

- RUIZ, A., FONTDEVILA, A., WASSERMAN, M. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* .3. Cytogenetic relationships between 2 sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics*, n.101, v.3/4, p.503-512, 1982.
- RUIZ, A., WASSERMAN, M. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, v.70, p.582-596, 1993.
- RUIZ, A., CANSIAN, A. M., KUHN, G. C. S., ALVES, M. A. R., SENE, F. M. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. *Genetica*, v. 108, p.217-227, 2000.
- RUNDLE, H. D., CHENOWETH, S. F., DOUGHTY, P., BLOWS, M. W. Divergent Selection and the Evolution of Signal Traits and Mating Preferences. *PLoS Biology*, v.3, n.11, p.1988-1995, 2005.
- SAITOU, N. AND NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution*, n.4, p.406-425, 1987.
- SANCHEZ, A. Relaciones filogenéticas en los clusters *buzzatii* y *martensis* (grupo *repleta*) de *Drosophila*, *Tesis Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1986.
- SCHLÖTTERER, C., HAUSER, M. T., VON HAESLER, A., TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in

- Drosophila. Molecular Biology and Evolution*, n.11, v.3, p.513-522, 1994.
- SEMIONOV, E.P. AND MARKOVA, B. Directed alterations of the X-chromosomal ribosomal gene repeats in mutant sc8 of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v.101,n.1, p35-40, 1997.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* species in South America. In: Barker, J. S. F. and Starmer, W. T. (eds.), Ecological genetics and Evolution. The cactus-yeast-*Drosophila* model system, *Academic Press*, Australia, p.97-106, 1982.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Contrasting patterns of differentiation inferred from tradicional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Science*, v.42, p. 81-88, 1988.
- SILVA, A. F. G. Sistemática de *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Ciência e Cultura*, v.33, p.684, 1981.
- SILVA, A. F. G., SENE, F. M. morphological geografic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.35, p.455-468, 1991.
- SMITH, H.M. More evolutionary terms. *Systematic Zoology*, v.14, n.57, 1965.

- STRACHAN, T., WEBB, D. A. AND DOVER, G. A. Transition stages of molecular drive in multi-copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J.* n.4, p.1701-1708, 1985.
- TARTAROTTI, E. AND CERON, C. R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochemical Genetics*, v. 43, p.365-373, 2005.
- THOMAS, R.H., BARKER, J.S. Breeding structure of natural populations of *Drosophila buzzatii*: effects of the distribution of larval substrates. *Heredity*, v.64, n.3, p.355-365, 1990.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680, 1994.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* group) in the Northeastern South America. *Evolución Biológica*, v.8/9, p.71-85, 1995a.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. *Drosophila seriema* n. sp.: New member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. *Annals Entomol Soc. America*, v.88, p.139-142, 1995b.

- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Two new species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia Série Zoologia*, v.90, p.141-146, 2001.
- TOMA, T., MIYAGI, I., CRABTREE, M.B., MILLER, B.R. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacers. *J. Med. Entomol.*, v.37, n.4, p.554-558, 2000.
- TOSI, D. Análise das inversões cromossômicas de *D. serido*, *Dissertação de Mestrado*, Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 1982.
- TOSI, D., SENE, F. M. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Genética*, v.12, p.729-745, 1989.
- VANZOLINI, P. E. A quasi-historical approach to the natural history of the differentiation of reptiles in tropical geographic isolates. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v.34, p.189-204, 1981.
- VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.27, 114p., 1983.

- VILELA, C. R. , SENE, F. M. Two new neotropical species of the *D. repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, v.30, p.295-299, 1977.
- WASSERMAN, M. Cytological studies of the *repleta* group of the genus *Drosophila*. V. The *mulleri* group. *Univ. Texas Publ.*, v.6205, p.85-118, 1962.
- WASSERMAN, M., RICHARDSON, R. H. Evolution of brazilian *Drosophila mulleri* complex species. *The Journal Heredity*, n.78, v.5, p.282-292, 1987.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: Krimbas, C. B. and Powell, J. R. (eds.), *Drosophila inversions polymorphism*, CRC, *Boca Raton*, p.455-552, 1992.
- WATANABE, T.K. A gene that rescues the lethal hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Jpn. J. Genet.*, v.54, p.325-331, 1979.
- WILLIAMS, M.A., BLOUIN, A.G. AND NOOR, M.A. Courtship songs of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. II. Genetics of species differences. *Heredity* v.86, p.68-77, 2001.
- YAMADA, H., MATSUDA, M. AND OGUMA, Y. Genetics of sexual isolation based on courtship song between two sympatric species: *Drosophila ananassae* and *D. pallidosa*. *Genetica* v.116, p.225-237, 2002.

VIII. RESUMO

As espécies de *Drosophila* pertencentes ao *cluster buzzatii* se distribuem pelo território sul americano, na área compreendida desde a Amazônia brasileira até o chaco argentino. São espécies tipicamente cactofílicas, por utilizarem cladódios de cactos em decomposição para realizarem seu ciclo de vida. Neste trabalho investigamos as relações filogenéticas entre as seguintes espécies pertencentes ao *cluster buzzatii*: *D. richardson* (*cluster stalker*), *D. koepferae* (linhagem B26D2), *D. seriema* (linhagens D54M e D40F1M), *D. serido* (linhagens 1431.3 e H49F1M) e *D. borborema* (linhagem 1282.2). Dentre as 690 posições analisadas, foram encontrados 152 sítios conservados e 173 sítios informativos para parcimônia quando todas as seqüências foram alinhadas. O número médio total de nucleotídeos obtido para alinhamento foi de 493.4, sendo que nestes foi encontrada uma porcentagem superior no conteúdo de A-T, cerca de ~70%, em relação ao conteúdo de G-C, cerca de ~30%. Os métodos da máxima parcimônia e de distância foram utilizados para o estabelecimento das relações filogenéticas entre as seqüências analisadas e demonstraram topologias semelhantes. Nossos resultados mostram que as espécies analisadas do *cluster buzzatii* constituem um grupo monofilético, e que *D. richardsoni* (*cluster stalker*) apresenta-se como uma espécie irmã colocada

em uma posição basal em relação às outras espécies. Ainda com base em nossos resultados verificamos que a análise das seqüências do espaçador intergênico ITS-1 forneceu relações filogenéticas resolvidas, sem quaisquer politomias, embora o grupo de espécies analisadas seja constituído por espécies com baixa divergência genética.

XIX. Abstract

Drosophila species belonging to cluster *buzzatii* are cactophilic species found in South América with a distribution from Amazonian region until Argentina. In this work we investigate the phylogenetic relationship among four species of the cluster *buzzatii*: *D. koepferae* (linhagem B26D2), *D. seriema* (linhagens D54M e D40F1M), *D. serido* (linhagens 1431.3 e H49F1M) e *D. borborema* (linhagem 1282.2) as well as *D. richardsoni* (*stalker* cluster), analysed as outgroup species by comparison of intergenic ITS-1 sequences of ribosomal DNA. This spacer sequences presented a length of ~550 bp in all of analysed species. It was not found any restriction site for *Eco* RI, *Alu* I, *Hind* III, *Sal* I e *Hae* III inside ITS-1 amplified fragments, indicating a similarity among them.

Higher proportion of A-T content (~70%) was found for all analysed ITS-1 fragments, as expected for non-coding sequences. In respect to phylogenetic relation among species belonging to cluster *buzzatii* our data suggest that this cluster is monophyletic. However, was observed that *D. serido* lineages presented polymorphism higher than other species.