



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

Jéssica Fernanda Paixão

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

São José do Rio Preto
2020

Jéssica Fernanda Paixão

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

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

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

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

São José do Rio Preto
2020

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica Fernanda Paixão

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

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

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

Comissão Examinadora

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

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

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

São José do Rio Preto
02 de março de 2020

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo I

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

LISTA DE TABELAS

Artigo I

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

LISTA DE TABELAS

Artigo II

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

Artigo III

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura populacional

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

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

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

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

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

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

1.2. Microssatélites

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. Mata Atlântica: o bioma das populações estudadas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

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

1.5.2. Objetivos Específicos

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

2. Diversidade genética de *Drosophila prosaltans* (Diptera, Drosophilidae, subgrupo *saltans*) de regiões de Mata Atlântica avaliada por microssatélites espécie-específicos

Resumo

No presente trabalho utilizamos como modelo de estudo, para análise da distribuição da variabilidade genética, *Drosophila prosaltans*, uma espécie neotropical amplamente distribuída em domínios florestais na América Central e do Sul e cujas informações levantadas até o momento indicam variação intraespecífica de suas populações. Acessamos a variação de locos de microssatélites de oito populações de Mata Atlântica de *D. prosaltans* do nordeste, sudeste e sul do Brasil. A análise de 12 locos usando 108 machos da espécie mostrou alta variabilidade genética e elevado polimorfismo para o marcador estudado. Os locos não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando a ação de fatores evolutivos nas populações e a heterozigosidade média observada foi alta ($H_o = 0.45 \pm 0.03$), porém menor do que a esperada (H_e). Uma diferenciação genética populacional moderada foi observada ($F_{st} = 0.17 \pm 0.02$) e dois agrupamentos genéticos distintos foram detectados. A inclusão de populações fortemente isoladas geograficamente nesses dois agrupamentos pode ser devido a características ecológicas, polimorfismo ancestral compartilhado e/ou mutação recorrente. Não foi observada correlação geral com as distâncias geográficas ou com as distribuições regionais ou de fitofisionomia. Os locos de microssatélites espécie-específicos de *D. prosaltans* usados aqui mostraram-se hipervariáveis, sendo indicados para estudos populacionais.

Palavras-chave: Grupo *saltans* de *Drosophila*. Microssatélites. Diversidade genética.

Introdução

A diversidade genética pode ser entendida como a variedade genotípica e alélica presente nas populações de uma determinada espécie que se reflete em diferentes características biológicas da mesma como, por exemplo, características morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre os indivíduos dessas populações (FRANKHAM et al., 2008). O estudo da diversidade genética de uma espécie envolve basicamente duas ações: (i) quantificar os níveis de variabilidade dentro das populações e (ii) caracterizar o nível de estruturação genética entre elas (HAMRICK, 1983).

A distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie que é expressa por meio da distribuição das frequências alélicas e dos genótipos no espaço e no tempo, é o resultado da ação de forças evolutivas sobre as populações (HAMRICK, 1983). Eventos evolutivos como mutação e migração podem

ser responsáveis por incrementar a variabilidade genética nas populações, a qual pode ser perdida por eventos de deriva genética, efeito fundador, endocruzamento ou seleção natural (MORAND et al., 2002).

A distribuição não casual da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie é denominada de estrutura populacional e tem sua importância na área de genética de populações e evolução por possibilitar o entendimento de diferentes processos que atuam na dinâmica das populações das espécies. A ação conjunta de forças evolutivas como mutação, seleção, migração, deriva genética e sua interação com fatores ecológicos, geográficos, demográficos e históricos moldam os padrões de estrutura populacional (SOSA et al., 2002).

Esses diferentes fatores de atuação podem afetar de diversas maneiras a distribuição da variabilidade genética gerando dinâmicas evolutivas complexas, nas quais podem existir contraposição de seus efeitos. Por exemplo, o fluxo gênico pode reduzir a diferenciação populacional gerada pela seleção natural ou pela deriva genética, ao passo que a deriva genética também poderia reduzir a diversidade genética dentro das populações pela fixação aleatória de determinados alelos, enquanto a seleção balanceadora ou o fluxo gênico pode promover o aumento do polimorfismo (SLATKIN, 1994; HEDRICK, 2011; ELLSTRAND, 2014).

Uma população apresenta uma estruturação genética quando suas frequências alélicas não se distribuem ao acaso, mas seguem um padrão espacial ou temporal (SOSA et al., 2002). A existência de diferenças significativas na composição genética das populações de uma espécie pode ser descrita por índices de distância ou de fixação a partir da análise de dados genéticos de marcadores moleculares. A ação dos fatores evolutivos pode ser inferida quando partimos do princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e ao menos uma de suas premissas, população infinita com acasalamentos aleatórios e ausência de mutação, migração e seleção natural que manteriam as frequências alélicas estáveis ao longo das gerações, é quebrada pela presença dos mesmos atuando sobre as populações (FRANKHAM et al., 2008).

O uso de marcadores genéticos neutros ou quase neutros, como os microssatélites, é comum na investigação dos padrões de estrutura populacional, já que pode indicar os processos contemporâneos e históricos que afetam a manutenção e distribuição da variabilidade genética. Essas repetições, comuns nos genomas nucleares e das organelas tanto em procarionotos quanto em eucarionotos, têm alta frequência no genoma e, as sequências de DNA que as flanqueiam são conservadas

entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para avaliar os polimorfismos populacionais (ZANELLA et al., 2017).

No presente trabalho a espécie *Drosophila prosaltans* do grupo *saltans* de *Drosophila* serviu de modelo biológico para um estudo dos padrões de diversidade genética de microssatélites em populações de Mata Atlântica. *D. prosaltans* é uma espécie Neotropical que ocorre na América Central e do Sul (MAGALHÃES, 1962) e, no Brasil, é encontrada principalmente na Mata Atlântica, mas também no Cerrado (MAGALHÃES, 1962; CHAVES; TIDON, 2008). *D. prosaltans* já foi previamente estudada em relação a alguns de seus aspectos biológicos e trabalhos que avaliaram o isolamento reprodutivo e a estrutura e polimorfismo cromossômico já apontaram diferenciação de suas populações (BICUDO 1973a, b; 1978a, b). Assim, nosso objetivo foi o de investigar os padrões de estrutura populacional da espécie por meio da análise de marcadores microssatélites espécie-específicos em populações de diferentes regiões do Brasil e de diferentes fitofisionomias de Mata Atlântica, sob a hipótese de que essas populações estão estruturadas geneticamente e essa estruturação pode estar relacionada à fatores evolutivos, bem como geográficos e ecológicos.

Materiais e Métodos

- **Amostras de *D. prosaltans***

Um total de 108 indivíduos de *D. prosaltans* foi coletado de oito fragmentos de diferentes fitofisionomias de Mata Atlântica, em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1, Figura 1). As coletas foram realizadas por meio de armadilhas fechadas com isca de banana e fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) (PENARIOL et al., 2008). Os machos da espécie em estudo foram identificados pela análise da terminália com o uso de chaves de identificação específicas (FREIRE-MAIA; PAVAN 1949; MOURÃO; BICUDO 1967; VILELA; BÄCHLI 1990; SOUZA et al., 2014). As fêmeas coletadas foram colocadas individualmente em tubos contendo meio de cultura padrão (banana mais fermento biológico *Saccharomyces cerevisiae*) e sua identificação foi realizada a partir da primeira prole (F1), analisando a terminália dos machos

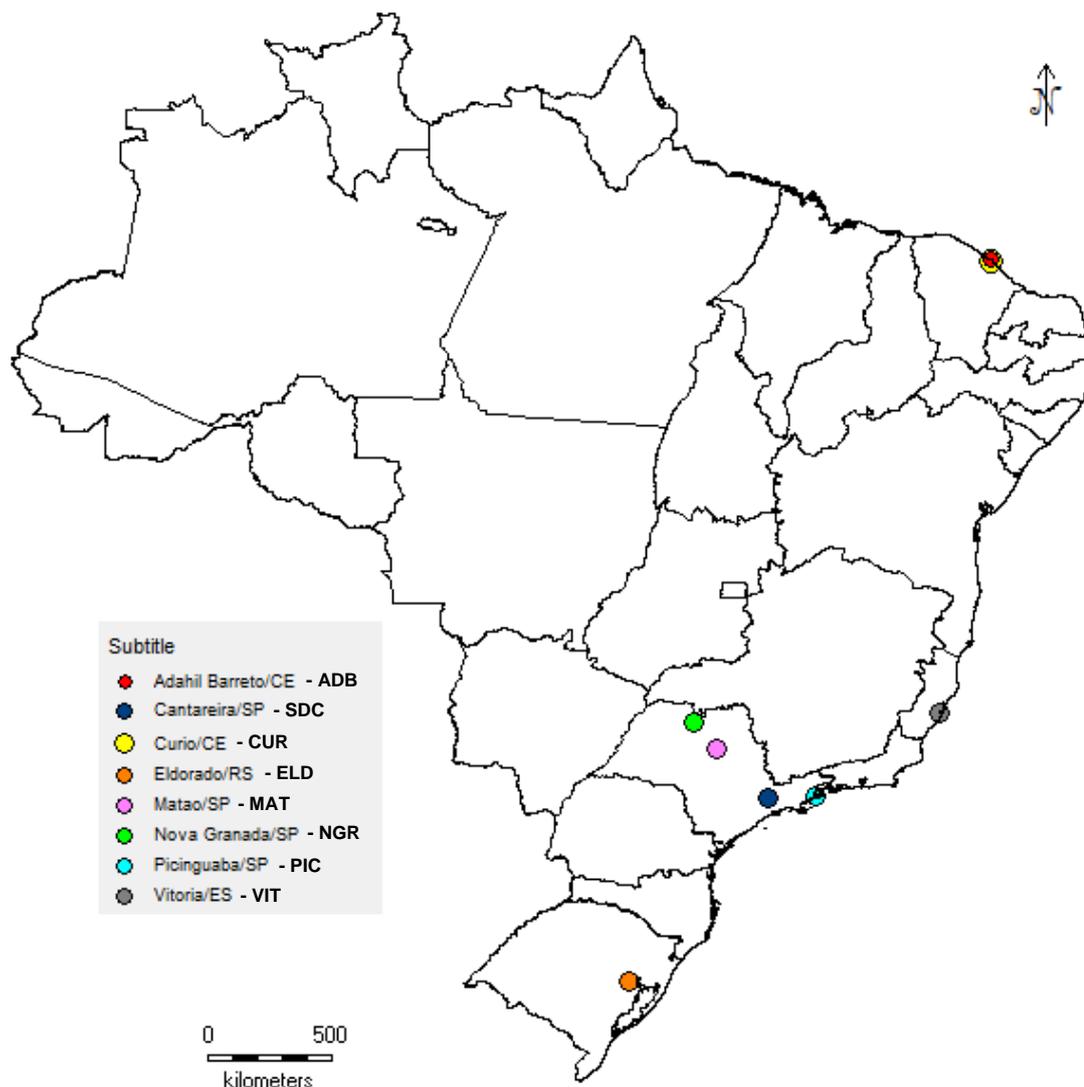
descendentes. Uma vez separados e identificados, os machos foram colocados em microtubos com álcool 70% a 4°C até a extração de DNA.

Tabela 1. Informações sobre as populações de Mata Atlântica de *D. prosaltans* estudadas no presente trabalho.

Local da Coleta	Data de coleta	Coordenadas geográficas	Fitofisionomia de Mata Atlântica	Área (ha)	Nº amostral <i>D. prosaltans</i>
Floresta do Curió, Fortaleza/CE (CUR)	05/2018	03°29'S, 38°16'O	Floresta Ombrófila Aberta (Faciações de Floresta Ombrófila Densa)	57,5	15
Parque Adahil Barreto, Fortaleza/CE (ADB)	05/2018	03°45'S, 38°30'O	Formação pioneira (Sistema Edáfico de Primeira Ocupação)	37.700	15
Fazenda Cambuhy, Matão/SP (MAT)	01/2016	21°37'S, 48°32'O	Floresta Estacional Semidecidual	2.189	15
Fazenda São João, Nova Granada/SP (NGR)	02/2016	20°32'S, 49°14'O	Floresta Estacional Semidecidual	1.359	15
Parque Estadual Serra do Mar, Núcleo Picinguaba/SP (PIC)	03/2016	23°21'S, 44°51'O	Floresta Ombrófila Densa	47.500	15
Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, Eldorado do Sul/RS (ELD)	02/2018	30°05'S, 51°40'O	Floresta Estacional Semidecidual	1.560	15
Serra da Cantareira, Parque Estadual da Cantareira/SP (SDC)	12/2016	23°26'S, 46°38'O	Floresta Ombrófila Densa	64.800	10
Parque Estadual da Fonte Grande, Ilha de Vitória/ES (VIT)	03/2018	20°10'S, 40°12'O	Floresta Ombrófila Densa	217	08

Fonte: Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, SOS Mata Atlântica – 2017/2018.

Figura 1. Mapa com as populações de *D. prosaltans* cujas amostras foram coletadas e analisadas.



Fonte: Programa Diva Gis, 2019.

- **Desenho de oligonucleotídeos de microssatélites para *D. prosaltans***

A partir de uma biblioteca genômica de *D. prosaltans*, foram desenhados os oligonucleotídeos de microssatélites espécie-específicos usados nas análises aqui apresentadas. A técnica utilizada para a obtenção da biblioteca genômica foi a mesma que Trava (2018) utilizou para *D. sturtevanti* em um estudo de estrutura populacional de populações de Mata Atlântica da espécie.

A seguinte técnica foi empregada para o desenho dos oligonucleotídeos a partir das sequências genômicas de *D. prosaltans*. Para a remoção dos

adaptadores foi utilizado o programa Chromas 2.6.5 (*Technelysium – DNA Sequencing Software*), as regiões de baixa qualidade foram removidas usando o Chromatogram Explorer Lite 5.0.2 e as sequências foram alinhadas manualmente para criar a consenso no programa BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999). Após a edição das sequências, o programa VecScreen (*Screen a Sequence for Vector Contamination*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi usado para verificar resquícios do vetor de clonagem nas mesmas. Em seguida, a busca por identidade das sequências semelhantes foi realizada por meio do banco de dados GenBank do NCBI, utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Foram obtidas 15 sequências que possuíam região com repetição de microssatélite. O programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007) foi utilizado para obtenção dos pares de oligonucleotídeos específicos dessas sequências, a partir dos seguintes critérios: iniciador com tamanho de 22 pb, temperatura de fusão (T_m) entre 50 e 60°C, comprimento do produto amplificado entre 100 a 500 pb, teor de GC entre 50 a 60%. O programa Multiple Primer Analyzer disponível no site da ThermoFisher Scientific foi usado para verificar a qualidade dos oligonucleotídeos desenhados antes da sua produção e, após a obtenção de sequências de qualidade dos oligonucleotídeos, esses foram encaminhados para serem sintetizados. Os 15 oligonucleotídeos de microssatélites obtidos para *D. prosaltans* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos de microssatélites desenvolvidos para *D. prosaltans*.

Loco	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	Motivo de repetição	Tamanho em pb
Dpro_A	Primer F: TTCTGTTGAACGTCACATGC Primer R: ACCACTTACCACCTATCCCT	(TG) ₁₀	238
Dpro_B	Primer F: CAAACTGTAGCTTGTGTGGG Primer R: TACTCATTCGCTTCCTGTCC	(TG) ₇	170
Dpro_C	Primer F: GCATCACTAACCGAATCACG Primer R: CTAATGCTTCCTGCCCTCTC	(GT) ₁₀	201
Dpro_D	Primer F: GACGGGCAAGAGAGTAGAAA Primer R: CCGCAACCAGAAAGAGAAAAG	(GT) ₇	235
Dpro_E	Primer F: AGAATTGACTGTGCGAATGC Primer R: CATTGTGAGGTCGGTTGT	(GT) ₆ ... (TG) ₅	130
Dpro_F	Primer F: TACTCATTCGCTTCCTGTCC Primer R: CAAACTGTAGCTTGTGTGGG	(CA) ₈	172
Dpro_G	Primer F: TCTCCTTGTCATGATGGTCG Primer R: CTTGCAAGCGGTTGAGTAAA	(GT) ₇	223
Dpro_H	Primer F: TGTGGGTGGCTCATTGTAAT Primer R: CGTGTTTGTCAATCTCGGTC	(TATG) ₇	144
Dpro_I	Primer F: CACAAACATTGCAAACGGTG Primer R: TTTTGCGCATTGTGAGGT	(TG) ₅	159
Dpro_J	Primer F: TGCCTGGTTGACTGACTAAC Primer R: CCGTAATGATGCTGCACAAA	(ACTG) ₅	215
Dpro_K	Primer F: GCTTGGCCATTTATCTTGG Primer R: CCAGTATCTATACGGGGCAC	(CGG) ₅	167
Dpro_L	Primer F: AGCATTTTAAGCAACGCCAA Primer R: ATCATTATTACGCGTTTCGC	(TG) ₈	292
Dpro_M	Primer F: GCTTCTTAGTCCTGACTGGG Primer R: TTTGTGAGTTTGCAGCACTC	(GT) ₆	124
Dpro_N	Primer F: ACAAGCTTATGGAATGGGAA Primer R: CTGACTTCTTGCTGTTGGTG	(GT) ₉	269
Dpro_O	Primer F: CAGGCACGTTAGCAACATTT Primer R: TGTCACTTTTTGCAGGCAAA	(CA) ₉	173

- **Extração do DNA, padronização dos oligonucleotídeos e amplificação dos fragmentos de interesse para as populações de *D. prosaltans***

A extração do DNA das amostras foi realizada pela maceração das moscas em microtubos individuais com o kit da Promega. Outros detalhes dessa etapa podem ser consultados no protocolo descrito por Trava (2018). Dos 15 microsatélites descritos para *D. prosaltans*, 12 foram amplificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com as concentrações de reagentes e temperaturas que constam na Tabela 3 para um volume total por amostra de 25 µl. Essas concentrações e temperaturas são resultado de uma etapa de padronização, que envolveu testes em *Touchdown*, com temperaturas de anelamento específicas e variações na concentração de reagentes, a fim de obter qualidade na amplificação, gerando géis sem a presença de bandas inespecíficas, rastros, bandas fracas e excesso de reagentes. Os ciclos em *Touchdown* e com temperaturas de anelamento específicas são os mesmos descritos por Laborda et al. (2009a, b) com a ressalva das modificações da Tabela 3. Os produtos de amplificação da PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 15% (SANGUINETTI et al., 1994, com modificações). Os géis foram fotografados utilizando sistema com câmera acoplada UVP BioDoc-It® 210 Imaging System e genotipados manualmente (Apêndice A).

Tabela 3. Condições de PCR para *D. prosaltans* após padronização dos oligonucleotídeos.

	Tampão	MgCl ₂	dNTP	Primers	Taq	H ₂ O UP	DNA	Ta	X
Dpro_A	5,0 µl	1,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,6 µl	1,0 µl	tc	30x
Dpro_B	5,0 µl	3,2 µl	1,3 µl	1,3 µl	0,2 µl	11,7 µl	1,0 µl	56°C	30x
Dpro_C	5,0 µl	1,2 µl	0,6 µl	0,6 µl	0,2 µl	15,8 µl	1,0 µl	62°C	30x
Dpro_D	5,0 µl	1,2 µl	0,6 µl	0,6 µl	0,2 µl	15,8 µl	1,0 µl	64°C	30x
Dpro_E	5,0 µl	1,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,6 µl	1,0 µl	tc	30x
Dpro_F	5,0 µl	3,2 µl	1,5 µl	1,5 µl	0,2 µl	11,1 µl	1,0 µl	58°C	40x
Dpro_G	5,0 µl	1,2 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,2 µl	16,1 µl	1,0 µl	62°C	30x
Dpro_H	5,0 µl	---	---	---	0,2 µl	---	1,0 µl	---	---
Dpro_I	5,0 µl	---	---	---	0,2 µl	---	1,0 µl	---	---
Dpro_J	5,0 µl	1,5 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,9 µl	1,0 µl	64°C	30x
Dpro_K	5,0 µl	1,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,6 µl	1,0 µl	64°C	30x
Dpro_L	5,0 µl	1,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,6 µl	1,0 µl	62°C	30x
Dpro_M	5,0 µl	1,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,6 µl	1,0 µl	62°C	30x
Dpro_N	5,0 µl	1,1 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,2 µl	16,4 µl	1,0 µl	54°C	30x
Dpro_O	5,0 µl	2,0 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,2 µl	14,4 µl	1,0 µl	62°C	30x

Primers = oligonucleotídeos *reverse* e *forward*; **Ta** = temperatura de anelamento; **tc** = ciclo de PCR em *Touchdown*; **X** = segunda etapa da reação de PCR com 30 ou 40 ciclos.

• Análise de dados

A partir dos dados moleculares, foram construídas as matrizes de genótipos baseadas no tamanho aproximado dos fragmentos obtidos para cada microssatélite em cada população analisada. Análises de diversidade genética e estruturação das populações da espécie de interesse foram realizadas. O número médio (N_a) e efetivo (N_e) de alelos, as heterozigosidades média esperada (H_e) e observada (H_o), o número (N_p) e a frequência (A_p) de alelos exclusivos, o índice de fixação (F) e o número de migrantes (N_m) foram calculados por meio do programa GenAIEx (*Genetic Analysis in Excel*) v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012). O Conteúdo de Informação Polimórfica (*PIC - Allelic Polymorphic Information Content*) foi obtido utilizando o programa CERVUS v.3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007). A frequência de alelos nulos (A_n) foi calculada no programa FreeNA, que estima frequências de alelos nulos para cada loco e população analisados seguindo o algoritmo EM (*Expectation*

Maximization) de Dempster et al. (1977) (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Esse programa também fornece valores de F_{st} após a correção para a presença de alelos nulos. A riqueza alélica média (A_r), que é uma medida não enviesada do número de alelos, estimada independentemente do tamanho amostral e que permite a comparação entre tamanhos amostrais diferentes (EL MOUSADIK; PETIT, 1996), foi calculada no programa FSTAT v.2.93 (GOUDET, 2001).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada loco dentro das populações no programa GenAEx. Todos os níveis de significância foram determinados após correção sequencial de Bonferroni para testes múltiplos (HOLM, 1979). A ocorrência de possíveis gargalos de garrafa (*bottlenecks*) recentes foi testada no programa BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY et al., 1999). Esse programa calcula a distribuição da heterozigosidade esperada a partir do número de alelos e de um dado tamanho amostral, sob o pressuposto de um equilíbrio entre mutação e deriva genética. A simulação do processo de coalescência dos locos amostrados foi realizada dentro do modelo de duas fases (TPM – *two phase model*), utilizando o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon signed-rank test*), ignorando a proporção de mutação pelo modelo de passos (SMM – *Stepwise Mutation Model*) e utilizando os parâmetros de 90% mutações de um único passo, 10% de mutações de múltiplos passos, 12 de variação da distribuição geométrica e 1000 iterações. Esses parâmetros correspondem aos valores mais sensíveis para a maioria dos microssatélites, considerando que menos de 20 locos estavam sob análise (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY et al., 1999).

O grau de diferenciação genética entre as populações amostradas foi verificado utilizando diversas abordagens: índices de distância (NEI, 1978) e diferenciação genética (G_{st} e F_{st}), Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e o uso do algoritmo Bayesiano não espacial. A distância não enviesada de Nei D (NEI, 1978) e as estatísticas F (NEI, 1977; WRIGHT, 1978) e G (MEIRMANS; HEDRICK, 2011) foram calculadas no programa GenAEx. Para os valores de F_{st} aplicou-se a classificação da diferenciação genética usando o guia qualitativo proposto por Wright (1978) em 'baixo' (0 – 0,05), 'moderado' (0,05 – 0,25) e 'alto' (>0,25). A matriz de dados foi aplicada ao programa TFPGA (*Tools For Population Genetic Analyses* - MILLER, 1997) para a verificação de isolamento por distância entre as populações por meio do Teste de Mantel (1967)

correlacionando as distâncias genéticas (NEI, 1978) com as distâncias geográficas. A análise de agrupamento *Neighbor Joining* foi obtida utilizando as distâncias D de Nei no programa GDA (*Genetic Data Analyses* – LEWIS; ZAYKIN, 2001).

A PCoA foi realizada no programa GenAIEx para verificar o nível de divergência genética entre as populações das espécies em um espaço multidimensional utilizando os dados de frequência. Para a realização dessa análise, uma matriz de distância genética foi gerada pelo próprio programa, interpolando novos valores a partir da média da distância genética (calculada utilizando todos os valores de distância individuais par-a-par existentes).

O software STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado para inferir a estrutura populacional a partir de um método Bayesiano baseado em agrupamento. Para isso, foi testado qual o número de agrupamentos (K) melhor explicava os dados analisados (K variando de 1 a 13), com burnin e número de MCMC após burnin de 10000 e 25 interações, conforme recomendações do programa por meio da ferramenta Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012). Avaliou-se a hipótese de mistura, que assume a existência de frequências alélicas correlacionadas, onde cada amostra é composta parcialmente pelo genoma de cada população ancestral. Junto com o modelo de frequência alélica, a hipótese de mistura permite obter L (K), que é logaritmo da máxima verossimilhança (log likelihood). Esse modelo é considerado o mais apropriado quando a origem e o grau de isolamento entre as populações estudadas são desconhecidos (PRITCHARD et al., 2000). Assim, a probabilidade a priori, isto é, a probabilidade de que um indivíduo pertença a qualquer população de referência (K), é definida com sendo $1/K$. A partir dos resultados gerados, um gráfico de barras foi produzido por meio da ferramenta CLUMPAK (KOPELMAN et al., 2015), de acordo com o teste de Evanno (EVANNO et al., 2005; EARL; VONHOLDT, 2012).

Uma AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) sem hierarquia e com hierarquia com base nos resultados do STRUCTURE foi feita no ARLEQUIN 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) a fim de estimar a distribuição da variabilidade genética das populações. Também foram feitas análises hierárquicas com base nas distribuições de regiões geográficas e fitofisionomias de Mata Atlântica. Uma Análise de Ordenação Multivariada de Correspondência

Canônica (CCA - *Canonical Correspondence Analysis*) utilizando dados ambientais e de frequência alélica foi realizada no programa PAST 3.25 (*PAleontological STatistics* – HAMMER et al., 2001). Para as populações de *D. prosaltans*, o principal objetivo dessa análise foi verificar o agrupamento das populações com base na correlação das frequências alélicas com fatores ambientais como longitude, latitude e altitude.

Resultados

- **Diversidade Genética das populações**

A análise de 12 locos de microssatélites espécie-específicos para *D. prosaltans* usando 108 machos de oito populações da espécie provenientes de fragmentos de Mata Atlântica resultou na detecção de 170 alelos. A riqueza alélica média (A_r) para todos os locos foi de aproximadamente 8 alelos segundo o programa FSTAT e o número de alelos encontrados por loco variou de 11 alelos (Dpro_N) a 18 alelos (Dpro_K). Os valores de frequência alélica por loco para cada uma das populações constam no Apêndice B. Os locos foram 100% polimórficos para todas as populações analisadas e os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) variaram de 0,8219 (Dpro_N) a 0,9054 (Dpro_K). O valor médio de PIC foi de 0,8644, indicando que os locos foram informativos para as análises populacionais. A Tabela 4 traz os valores de PIC , frequência de alelos nulos e riqueza alélica por loco.

Tabela 4. Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), frequência de alelos nulos (A_n) e riqueza alélica por loco (A_r).

Loco	PIC	A_n	A_r
Dpro_A	0,8799	0.2126	7.921
Dpro_B	0,9023	0.0198	8.538
Dpro_C	0,8969	0.2337	8.362
Dpro_D	0,8369	0.1593	7.069
Dpro_F	0,8936	0.0000	8.191
Dpro_G	0,8613	0.1943	7.256
Dpro_J	0,8657	0.2014	7.303
Dpro_K	0,9054	0.0962	8.656
Dpro_L	0,8300	0.1966	6.764
Dpro_M	0,8557	0.2561	7.170

Dpro_N	0,8219	0.3089	6.436
Dpro_O	0,8229	0.2904	6.454

O nível de diversidade genética das populações de *D. prosaltans* foi mensurado em relação a diferentes parâmetros (Tabela 5). A maioria das populações apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg com correção de Bonferroni ($p < 0,05$) para pelo menos um loco. O loco Dpro_D foi o único loco em equilíbrio para todas as populações. A população de CUR apresentou o maior número de locos fora do equilíbrio, enquanto a população de VIT não apresentou nenhum loco fora do equilíbrio. Os locos Dpro_N e Dpro_O apresentaram desvio para o maior número de populações, seis no total, exceto SDC e VIT para o loco Dpro_N e MAT e VIT para o loco Dpro_O, enquanto o loco Dpro_K apresentou desvio apenas para a população de ADB. A heterozigosidade média observada (H_o) (\pm erro padrão) variou de $0,376 \pm 0,091$ (ADB) a $0,540 \pm 0,102$ (NGR) enquanto a heterozigosidade média esperada (H_e) variou de $0,687 \pm 0,043$ (SDC) a $0,759 \pm 0,020$ (MAT). Os valores do índice de fixação (F) variaram de $0,252 \pm 0,148$ (NGR) a $0,531 \pm 0,106$ (ADB). Alelos exclusivos foram observados em todas as populações e, as populações que apresentaram maior e menor número de alelos exclusivos foram, respectivamente, SDC e ELD.

Tabela 5. Nível de diversidade genética (\pm erro padrão) das oito populações de *D. prosaltans* de Mata Atlântica analisadas. Na: Número médio de alelos; Ne: Número médio efetivo de alelos; Ho: Heterozigosidade média observada; He: Heterozigosidade média esperada; F: Índice de Fixação; H-W: Lista de locos com desvio das expectativas de Hardy-Weinberg; Np: Número de alelos exclusivos; Ap: Frequência média dos alelos exclusivos.

População	Na	Ne	Ho	He	F	H-W	Np	Ap
CUR	6,750 \pm 0,605	4,196 \pm 0,427	0,433 \pm 0,089	0,704 \pm 0,061	0,362 \pm 0,110	A, B, C, F, G, J, M, N, O	5	0,104
ADB	6,917 \pm 0,723	4,873 \pm 0,678	0,376 \pm 0,091	0,755 \pm 0,029	0,531 \pm 0,106	A, C, F, K, L, M, N, O	4	0,144
MAT	6,667 \pm 0,607	4,457 \pm 0,367	0,504 \pm 0,094	0,759 \pm 0,020	0,342 \pm 0,120	C, G, M, N	4	0,054
NGR	6,000 \pm 0,492	4,078 \pm 0,337	0,540 \pm 0,102	0,735 \pm 0,024	0,252 \pm 0,148	B, C, L, N, O	8	0,102
PIC	6,667 \pm 0,632	4,341 \pm 0,458	0,426 \pm 0,078	0,737 \pm 0,030	0,439 \pm 0,092	B, F, J, M, N, O	4	0,086
ELD	5,917 \pm 0,529	4,222 \pm 0,426	0,388 \pm 0,095	0,726 \pm 0,037	0,480 \pm 0,116	A, B, F, J, L, M, N, O	1	0,036
SDC	5,417 \pm 0,621	3,915 \pm 0,543	0,477 \pm 0,100	0,687 \pm 0,043	0,340 \pm 0,120	F, O	9	0,253
VIT	4,917 \pm 0,529	3,891 \pm 0,457	0,454 \pm 0,087	0,714 \pm 0,023	0,372 \pm 0,119	---	5	0,213
Total	6,156 \pm 0,214	4,247 \pm 0,164	0,450 \pm 0,032	0,727 \pm 0,012	0,390 \pm 0,041	---	---	---

A Estatística F de Wright (Tabela 6) revelou resultados positivos para todos os locos em relação aos valores de Fst, com uma variação entre 0,093 (Dpro_A) e 0,323 (Dpro_D). O valor médio (\pm erro padrão) para todos os locos indicou diferenciação genética moderada entre todas as populações (Fst = 0,173 \pm 0,020) e o índice de fixação de Wright revelou elevada deficiência de heterozigotos (Fit = 0,494 \pm 0,078; Fis = 0,392 \pm 0,091), em concordância com o Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg com correção de Bonferroni. Os maiores valores para o número de migrantes (Nm) foram encontrados para os locos Dpro_A e Dpro_M (2,426 e 2,351, respectivamente) enquanto os menores valores foram observados para os locos Dpro_C, Dpro_D e Dpro_F (0,783, 0,525 e 0,982, respectivamente) (Tabela 6).

Os resultados da análise das populações individuais no programa BOTTLENECK sob o modelo de mutação TPM (*Two Phase Model*) mostraram a ocorrência de gargalo recente, considerando o excesso de heterozigosidade, nas populações de NGR ($p = 0,02124$) e VIT ($p = 0,00232$). É possível que o resultado para a população de VIT seja superestimado pelo fato dessa população ter sido amostrada por oito isolinhagens.

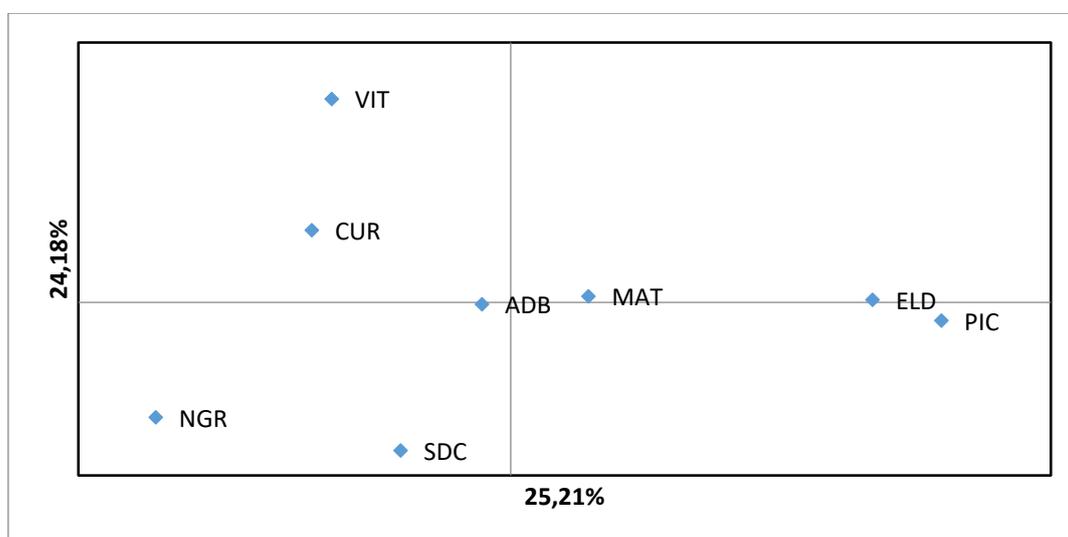
Tabela 6. Estatística F de Wright (Fis, Fit e Fst) e número de migrantes (Nm) de todas as populações pelo GenAlEx e Fst com correção para alelos nulos pelo FreeNA.

Loco	Fis	Fit	Fst	Nm	Fst FreeNA
Dpro_A	0,429	0,483	0,093	2,426	0,051296
Dpro_B	-0,138	0,005	0,125	1,746	0,100521
Dpro_C	0,539	0,651	0,242	0,783	0,161266
Dpro_D	0,452	0,629	0,323	0,525	0,286574
Dpro_F	-0,253	0,001	0,203	0,982	0,195623
Dpro_G	0,484	0,585	0,197	1,020	0,120822
Dpro_J	0,510	0,594	0,172	1,204	0,113321
Dpro_K	0,148	0,234	0,101	2,235	0,057714
Dpro_L	0,460	0,531	0,132	1,648	0,078440
Dpro_M	0,587	0,627	0,096	2,351	0,024624
Dpro_N	0,754	0,798	0,179	1,148	0,100707
Dpro_O	0,735	0,792	0,214	0,918	0,123547
Média	0,392	0,494	0,173	1,416	0,120788
Erro Padrão	0,091	0,078	0,020	0,187	---

- **Estrutura Genética das populações**

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) é apresentada na Figura 2. O primeiro eixo explica 25,21% da variação e separa as populações MAT, ELD e PIC das demais, sendo MAT a mais diferenciada e ELD e PIC mais semelhantes entre si. O segundo eixo, que explica 24,18% da variação, separa as populações VIT, CUR, MAT e ELD das demais.

Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com as oito populações de *D. prosaltans* gerada a partir das distâncias genéticas pelo programa GenAlEx.



Os resultados dos cálculos de Distância de Nei (1978) (Tabela 7) geraram, de forma geral, valores de distância genética elevados para as populações, tanto para pares geograficamente próximos como CUR e ADB: $D = 0,699$ e MAT e NGR $D = 0,819$, quanto para distantes, CUR e VIT: $D = 0,613$. Esses dados corroboram os obtidos pelo teste de Mantel, que indicou correlação negativa ($r = -0,2855$), isto é, que não há isolamento por distância entre as populações analisadas. A maior distância genética foi encontrada para o par NGR e PIC ($D = 1,378$) enquanto a menor foi para o par ADB e MAT ($D = 0,449$). A Estatística F par a par mostrou que as populações mais diferentes entre si são CUR e SDC (0,139) e as mais semelhantes são ADB e MAT (0,066) (Tabela 8). A Estatística G par a par apresentou o maior e menor valor para os pares CUR e SDC (0,101) e ADB e MAT (0,039), respectivamente (Tabela 9).

Tabela 7. Distância genética de Nei (1978) entre as populações calculada pelo programa GenAlEx.

CUR	ADB	MAT	NGR	PIC	ELD	SDC	VIT	
0,000								CUR
0,699	0,000							ADB
0,581	0,449	0,000						MAT
0,755	0,773	0,819	0,000					NGR
0,847	0,822	0,753	1,378	0,000				PIC
1,000	0,857	0,704	1,294	0,508	0,000			ELD
1,090	1,052	1,224	0,853	1,180	1,151	0,000		SDC
0,613	0,809	0,849	1,156	1,196	0,845	1,120	0,000	VIT

Tabela 8. Valores de Fst par a par calculados pelo programa GenAlEx.

CUR	ADB	MAT	NGR	PIC	ELD	SDC	VIT	
0,000								CUR
0,099	0,000							ADB
0,086	0,066	0,000						MAT
0,104	0,093	0,093	0,000					NGR
0,114	0,096	0,089	0,123	0,000				PIC
0,127	0,100	0,089	0,123	0,078	0,000			ELD
0,139	0,122	0,125	0,114	0,131	0,133	0,000		SDC
0,103	0,102	0,102	0,122	0,123	0,111	0,135	0,000	VIT

Tabela 9. Valores de Gst par a par calculados pelo programa GenAlEx.

CUR	ADB	MAT	NGR	PIC	ELD	SDC	VIT	
0,000								CUR
0,066	0,000							ADB
0,059	0,039	0,000						MAT
0,076	0,066	0,070	0,000					NGR
0,080	0,067	0,064	0,098	0,000				PIC
0,091	0,070	0,062	0,097	0,051	0,000			ELD
0,101	0,085	0,093	0,082	0,096	0,096	0,000		SDC
0,061	0,062	0,067	0,087	0,086	0,071	0,091	0,000	VIT

A análise Bayesiana da estrutura das populações usando o STRUCTURE indicou a existência de dois agrupamentos (K=2) (Figura 3). A população de NGR foi a mais diferenciada em comparação com as demais, com a grande maioria de seus membros pertencendo a um único agrupamento (azul). Todas as populações tiveram membros em ambos os agrupamentos. A Figura 4 apresenta a árvore por *Neighbor-joining* obtida para as populações de *D. prosaltans* a partir da Distância Genética de Nei (1978), cujo resultado foi concordante com o padrão de agrupamento do STRUCTURE.

A estimativa da distribuição da variabilidade genética pela AMOVA (Tabela 10) mostrou na análise sem hierarquia que 81,36% da variação dos locos analisados está dentro das populações, com apenas 18,64% da variação sendo distribuída entre as mesmas. Na análise com hierarquia, com base nos resultados do STRUCTURE que revelaram a distribuição das populações em dois agrupamentos, foi possível observar em concordância com a análise sem hierarquia, que a maior parte da variação se distribui dentro das populações (80,18%) do que entre as populações dentro dos agrupamentos (16,35%) ou entre os agrupamentos (3,47%). Os resultados das análises hierárquicas com base na distribuição de regiões geográficas e fitofisionomias de Mata Atlântica (APÊNDICE C) corroboram o resultado anterior a respeito da maior porcentagem de variação ser distribuída intrapopulacionalmente. A CCA (Figura 5) agrupou em sentido horário no primeiro quadrante as populações de NGR e MAT, no segundo quadrante, ADB e CUR, no terceiro quadrante, PIC, VIT e ELD e SDC no último quadrante, sendo que as variáveis longitude, latitude e altitude são mais determinísticas na diferenciação e separação da população de SDC das demais.

Figura 3. Estrutura genética das oito populações de *D. prosaltans* gerada pela análise do STRUCTURE. N = Região Norte; SE = Região Sudeste; S = Região Sul. As siglas das populações podem ser consultadas na Tabela 1.

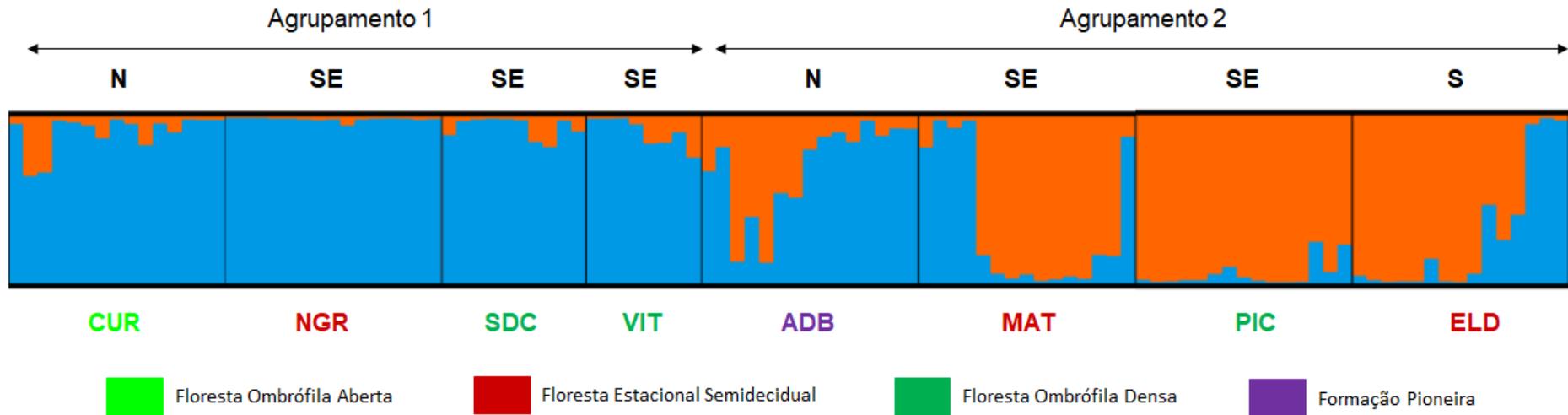


Figura 4. Árvore *Neighbor-joining* obtida para as oito populações de *D. prosaltans* usando a Distância Genética de Nei (1978). Os ramos em laranja e azul representam o padrão de agrupamento concordante com o resultado do STRUCTURE. As cores das siglas das populações representam as fitofisionomias de Mata Atlântica conforme as informações da Figura 3.

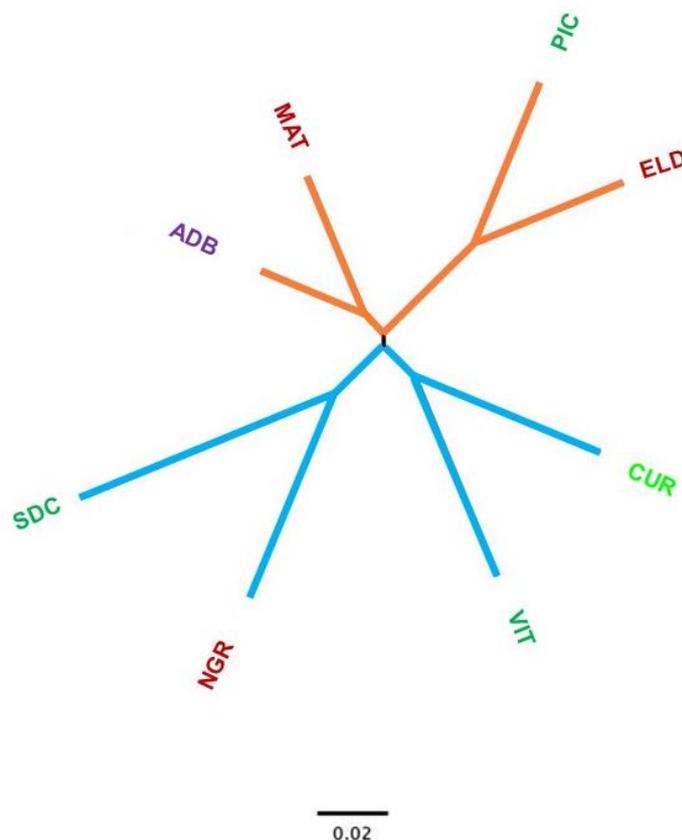
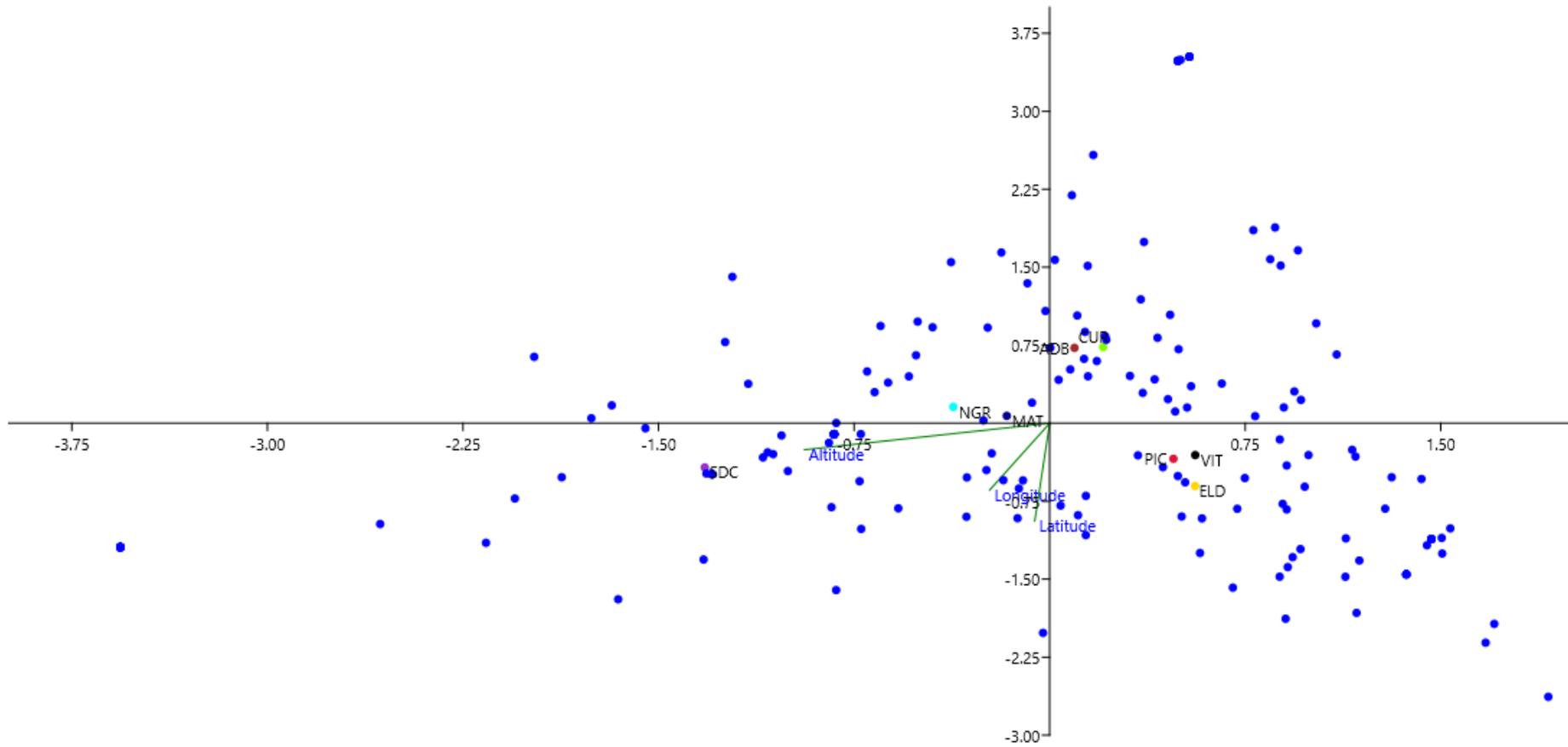


Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) sem hierarquia e com hierarquia segundo resultados do STRUCTURE (Agrupamento 1= CUR, NGR, SDC e VIT; Agrupamento 2= ADB, MAT, PIC e ELD). Índices de Fixação para análise com hierarquia = FST: 0,19823; FSC: 0,16937; FCT: 0,03474. DF = *degrees of freedom* (graus de liberdade); SS = *sum of squares* (soma dos quadrados); VC = *variance component* (componente de variância); %PV = porcentagem de variação total.

Fonte	DF	SS	VC	%PV
Entre Populações	7	322,832	0,40492	18,64%
Dentro das Populações	890	1572,600	1,76697	81,36%
Total	897	1895,432	2,17189	100%
Entre Agrupamentos (FCT)	1	82,879	0,07657	3,47%
Entre Populações dentro dos Agrupamentos (FSC)	6	239,953	0,36030	16,35%
Dentro das Populações (FST)	890	1572,600	1,76697	80,18%
Total	897	1895,432	2,20383	100%

Figura 5. Análise de Correspondência Canônica para as populações de *D. prosaltans*.



Discussão

Em concordância com a intenção de se obter informações sobre a diversidade de organismos que permanecem vivendo em áreas ameaçadas e fragmentadas, como a Mata Atlântica e os biomas da América do Sul e da Região Neotropical de forma geral, para reunir dados sobre a influência de fatores evolutivos e eventos ambientais, geográficos, demográficos e outros na biodiversidade, o presente trabalho investigou a diversidade genética de oito populações de *D. prosaltans* de regiões de Mata Atlântica por meio de marcadores microssatélites espécie-específicos, os quais têm sido utilizados com êxito na literatura em estudos genéticos e evolutivos, sendo eficientes para caracterizar a estruturação micro e macrogeográfica em populações naturais, para detectar processos demográficos e para inferir o papel das forças evolutivas (SCHÖFL; SCHLÖTTERER, 2006; BARKER et al., 2009, 2011). As populações aqui analisadas mostraram-se altamente polimórficas quanto ao marcador molecular utilizado. A estruturação populacional encontrada, mesmo que moderada, é corroborada pelos resultados de trabalhos anteriores com a espécie e com o grupo *saltans* de isolamento reprodutivo, estrutura e polimorfismo cromossômico (BICUDO, 1973a, b; BICUDO, 1978a, b).

A diversidade genética dos locos de microssatélites das populações de *D. prosaltans*, representada pelos valores de heterozigosidade média observada (H_o), cuja média total para todos os locos e populações foi de 0,450, foi próxima ou ligeiramente superior a encontrada para outras espécies de *Drosophila* endêmicas de Mata Atlântica ou de outras regiões e biomas. Trava (2018), que também avaliou algumas populações de *D. sturtevantii* das mesmas localidades (SDC, PIC, MAT e NGR) analisadas no presente trabalho, detectou uma diversidade genética minimamente inferior para locos de microssatélites ($H_o = 0,430$). A espécie *D. sturtevantii* pertence ao grupo *saltans*, assim como a espécie *D. prosaltans*, e ambas apresentam uma faixa de distribuição geográfica ampla, muitas vezes sobreposta, embora *D. sturtevantii* seja muito mais abundante, o que pode influenciar na preservação da variação genética de suas populações de forma semelhante, pela ação de prováveis forças evolutivas comuns nas mesmas.

Estudos utilizando marcadores microssatélites em outras espécies de *Drosophila* neotropicais como as cactofílicas *D. gouveai* e *D. antonietae* (MORAES; SENE, 2007; MACHADO et al., 2010) e as espécies do grupo *guarani*, *D. maculifrons*

e *D. ornatifrons* (SILVA et al., 2015; ZORZATO, 2015), trazem um valor médio de 0,360 para a diversidade. Em concordância com os resultados de Zorzato (2015) e Gustani et al. (2015), o número amostral das populações não teve correlação com a diversidade genética populacional. A população de SDC, por exemplo, mesmo que amostrada por um menor número de indivíduos, apresentou um valor elevado de diversidade genética ($H_o = 0,502$).

Alguns estudos de variabilidade genética de populações naturais de *Drosophila* trazem os valores de heterozigosidade média esperada (H_e) como indicativos da diversidade genética para locos de microssatélites. Considerando esse parâmetro, os valores encontrados para *D. prosaltans*, variando de 0,687 (SDC) a 0,759 (MAT), são semelhantes aos encontrados para outras espécies do gênero. Barker et al. (2009) observaram para 15 locos de microssatélites de *D. buzzatii*, oriundos de populações argentinas e australianas, estimativas de H_e variando entre 0,502 e 0,794. Em populações de *D. subobscura* da região central dos Bálcãs, foi verificado para 11 locos de microssatélites estimativas de H_e variando entre 0,6279 e 0,9336 (NOVICIC, et al., 2011). Cavasini (2015) em uma análise de estrutura populacional de *D. mediopunctata* utilizando 10 locos de microssatélites oriundos de quatro populações de regiões geomorfológicas distintas de São Paulo e do Rio de Janeiro encontrou um valor médio de H_e de 0,794.

Os maiores valores de H_o foram encontrados para as populações de MAT e NGR, 0,504 e 0,540 respectivamente, que estão inseridas em áreas agrícolas de cultivo de laranja, seringueira e cana-de-açúcar, principalmente. Trava (2018), também utilizando microssatélites espécie-específicos em populações de *D. sturtevantii*, observou os maiores valores de H_o para as populações de Serra da Cantareira/SP (SDC), Serra do Mar-Núcleo Picinguaba/SP (PIC) e Pratigi/BA (0,52, 0,50 e 0,52, respectivamente), que são reservas florestais de Mata Atlântica de grande área, cujas características ecológicas e climáticas, bem como uma maior disponibilidade de microhabitats específicos, poderiam ter favorecido a manutenção da diversidade genética de *D. sturtevantii*. Em contrapartida, Zorzato (2015) avaliando populações de *D. ornatifrons* do sul do Brasil verificou que os maiores valores de H_o pertenciam a duas populações que passaram por uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional. Embora, a análise do BOTTLENECK tenha detectado gargalo populacional recente apenas para a população de NGR e VIT de *D.*

prosaltans, é possível que o padrão observado seja mais semelhante ao verificado por Zorzato (2015) para *D. ornatifrons* do que por Trava (2018) para *D. sturtevantii*.

Marcadores moleculares que evoluem a taxas mais rápidas, como é o caso dos microssatélites, são mais eficazes para determinar a ocorrência de gargalos recentes e, no caso de populações que passaram por uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional, a redução do número de alelos é mais rápida do que da heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, de forma que se detecta altos valores de H_o nessas populações (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY et al., 1999), como observado para as populações de MAT e NGR de *D. prosaltans*, embora gargalos genéticos tenham sido identificados pelo BOTTLENECK apenas para as populações de NGR e VIT.

Pelo fato dos marcadores microssatélites serem hipervariáveis, de acordo com um modelo de isolamento por distância, a detecção de proximidade genética entre populações indica que diferentes combinações de alelos surgiram em cada geração e foram ordenadas pelo espaço geográfico (SUNNUCKS, 2000). Em relação aos parâmetros par a par aqui analisados, para as populações de *D. prosaltans*, de forma geral, foram obtidos valores de F_{st} e G_{st} mais baixos e próximos de zero, quando comparados com os valores de Distância Genética de Nei, que se apresentaram mais elevados. Por exemplo, para os pares MAT-NGR e CUR-ADB, os valores de F_{st} e G_{st} foram mais próximos de zero (MAT-NGR $F_{st} = 0,093$, $G_{st} = 0,070$; CUR-ADB $F_{st} = 0,099$, $G_{st} = 0,066$), enquanto a Distância de Nei foi elevada para ambos os pares (MAT-NGR $D = 0,819$, CUR-ADB $D = 0,699$). Esse resultado reforça a necessidade de uma abordagem com várias estatísticas diferentes para a análise de dados, uma vez que as mesmas são influenciadas por diversos parâmetros como, por exemplo, taxa de migração entre as populações, taxa de mutação do marcador, diferenças entre locos, grau de polimorfismo, amostragem, entre outros (MEIRMANS; HEDRICK, 2011; WHITLOCK, 2011).

Trava (2018) considerou como nível de significância para os valores par a par de G_{st} e de Distância Genética de Nei, 0,05 e 0,75, respectivamente e, nesse sentido, como a maioria das comparações par a par para as populações de *D. prosaltans* tiveram valores próximos ou acima desses, as análises seriam concordantes em apontar a diferenciação entre as populações.

As populações de MAT e NGR são separadas por 140 Km de distância e as populações de CUR e ADB são ainda mais próximas entre si, menos que 10 Km de

distância as separa. Uma possível similaridade genética para esses pares de populações indicada pelos valores de F_{st} e G_{st} poderia ser explicada pelo fluxo gênico via populações intermediárias assim como proposto por Trava (2018) para as populações de MAT e NGR de *D. sturtevanti*. Porém, os valores de Distância de Nei parecem indicar barreiras ao fluxo gênico. Silva et al. (2015) analisaram a estrutura populacional de *D. maculifrons* e identificaram diferenciação moderada entre duas populações de unidade de conservação de Floresta de Araucária, uma fitofisionomia de Mata Atlântica, apesar da taxa elevada de migração entre os fragmentos e da presença de outros fragmentos intermediários entre eles. Assim, é necessário aprofundar a investigação sobre as características ecológicas e uso de nicho de *D. prosaltans*, bem como investigar a influência de fatores seletivos e estocásticos em suas populações, já que o fluxo gênico, ocorrendo por meio de populações intermediárias ou restrito por barreiras, não parece constituir um fator de explicação único provável e suficiente para a distribuição da variabilidade encontrada nas populações. O efeito fundador, que poderia ser uma consequência após um evento de gargalo genético recente, por exemplo, poderia ser apontado como um fator de explicação para ausência de identidade entre as populações, já que o estabelecimento de uma nova população por meio de alguns poucos indivíduos faz com que essa população tenha consigo somente uma pequena fração da variação genética total da população parental (RIDLEY, 2007).

Alelos exclusivos foram encontrados em todas as populações de *D. prosaltans* analisadas. Quando um alelo é exclusivo de uma determinada população e ele ocorre com elevada frequência, há indícios de que essa população seja diferenciada e com baixo fluxo gênico com as demais, já que esse alelo não está presente nas outras populações. Quando os alelos exclusivos são detectados em baixa frequência, pode ser que eles não estejam sendo transmitidos via fluxo gênico para as demais populações por estarem presentes em poucos indivíduos daquela população a qual eles são exclusivos. Nesse quesito, a população de SDC apresentou-se diferenciada das demais com o maior número de alelos exclusivos (9 alelos em 4 locos diferentes) com frequências variando desde valores baixos (0,050 para o alelo 1 do loco Dpro_J) até valores mais elevados (0,450 para o alelo 3 do loco Dpro_J). Na CCA, a população de SDC mostrou-se ainda diferenciada das demais por ser a mais influenciada, com base dos dados de frequência alélica, pelas variáveis ambientais longitude, latitude e altitude, corroborando o resultado dos alelos exclusivos.

Os alelos nulos são frequentemente evocados para explicar a deficiência de heterozigotos e desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg observados (DAKIN; AVISE, 2004; DHARMARAJAN et al., 2013). O índice de fixação de Wright revelou elevada deficiência de heterozigotos para as populações de *D. prosaltans* ($Fit = 0,494 \pm 0,078$; $Fis = 0,392 \pm 0,091$) e todas as populações tiveram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni ($p < 0,05$) para pelo menos um loco. Esses resultados podem estar correlacionados à frequência média de alelos nulos estimada pelo programa FreeNA (0,368). Ainda, outros fatores podem ter influência sobre essas observações, por exemplo: desvios das frequências esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ocorrer pela influência de forças evolutivas como seleção natural ou por endogamia (HARTL; CLARK, 2010; DHARMARAJAN et al., 2013); e valores elevados de Fis podem ocorrer pela influência da endogamia, seleção natural ou efeito Wahlund (PROUT; BARKER, 1993; DHARMARAJAN et al., 2013). Embora os marcadores microssatélites sejam considerados seletivamente neutros ou quase-neutros, inferências sobre uma ação indireta da seleção natural são cabíveis considerando a pleiotropia, efeito carona, desequilíbrio de ligação ou ainda a influência dessas regiões na expressão gênica de forma geral. Cavasini et al. (2015), por exemplo, verificou a localização cromossômica de locos microssatélites de *D. mediopunctata* associada a regiões com inversões e mutações cromossômicas de valor adaptativo o que permitiria inferir uma ação seletiva indireta sobre esses locos por meio do efeito carona.

Apesar da separação geográfica das populações amostradas, não houve relação entre posição geográfica e distância genética pelo resultado do Teste de Mantel ($r = -0,2855$), e a diferenciação entre elas foi apenas moderada ($Fst = 0,173 \pm 0,020$). Trava (2018) também não identificou isolamento por distância entre as populações de *D. sturtevantii*, incluindo algumas localidades aqui também analisadas. A análise Bayesiana da estrutura das populações usando o STRUCTURE corrobora o resultado da estatística F de Wright ao indicar a existência de apenas dois agrupamentos ($K=2$) (Figura 3). A população de NGR, na qual foi detectado evento de gargalo populacional recente pela análise do BOTTLENECK, foi a mais diferenciada em comparação com as demais, com a grande maioria de seus membros pertencendo a um único agrupamento (azul). Pelo fato da população de NGR ser uma população de mata inserida em área agrícola, a ocorrência do gargalo genético pode estar correlacionada à pulverização de inseticidas e agrotóxicos em geral na época em que

as coletas foram realizadas. O gargalo explicaria a correlação entre a heterozigiosidade observada e a suscetibilidade à inseticidas, levando a população local a números baixos. Tal gargalo teria afetado a diversidade genética em locos neutros como os microssatélites aqui analisados (CHEN et al., 2012).

Todas as populações tiveram membros em ambos os agrupamentos. Populações fortemente isoladas geograficamente foram incluídas nesses dois agrupamentos, o que pode ser devido a características ecológicas, polimorfismo ancestral compartilhado e/ou mutação recorrente. Não foi observada correlação geral com as distâncias geográficas, como mencionado anteriormente, ou com as distribuições regionais ou de fitofisionomia de Mata Atlântica. É possível que, com a elevada taxa de mutação dos microssatélites (1×10^{-6} a 1×10^{-2} mutações por loco por geração em eucariotos em geral segundo Arthofer et al., 2018), a ausência de correlação da estruturação com as fitofisionomias de Mata Atlântica ou regiões seja decorrente do fato da separação das populações e/ou do estabelecimento de barreiras ao fluxo gênico entre elas serem muito antigas, relacionadas aos ciclos glaciais do Pleistoceno (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2014). Assim, não somente a fragmentação do bioma ao qual as populações pertencem seria um fator que explicaria o enquadramento das populações nos agrupamentos genéticos.

Outras análises podem ser realizadas posteriormente para verificar variáveis que sejam determinísticas em relação aos agrupamentos encontrados. Zorzato (2019), por exemplo, verificou a influência da temperatura e da umidade sobre os padrões de estruturação de populações de *D. sturtevantii* e essas mesmas variáveis podem ser igualmente importantes nos padrões de estrutura de *D. prosaltans*, visto que as espécies têm uma faixa de distribuição geográfica que se sobrepõe em algumas regiões (MAGALHÃES, 1962). A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) explica uma baixa porcentagem de variação em cada um de seus eixos e não foi identificado nenhum padrão de diferenciação entre as populações que corroborasse as demais análises realizadas. A Análise de Variância Molecular (AMOVA), com base nos resultados do STRUCTURE (e também com base na distribuição das regiões geográficas e fitofisionomias de Mata Atlântica – APÊNDICE C), revelou que a maior parte da variação se distribui dentro das populações (80,18%) do que entre as populações (16,35%) ou entre os agrupamentos (3,47%), sendo coerente com a estruturação populacional moderada encontrada para as populações de *D. prosaltans*.

Conclusão

Os microssatélites foram eficientes para detectar uma estruturação moderada nas populações de *D. prosaltans*, refletindo a diferenciação observada em estudos anteriores por outros marcadores genéticos. Foi evidenciada a formação de dois grupos genéticos distintos, os quais não foram possíveis de serem explicados ou associados com distância geográfica ou fitofisionomia de Mata Atlântica, e podem ser decorrentes de eventos genéticos específicos como as mutações recorrentes ou até mesmo a manutenção de polimorfismo ancestral nas populações. A maior parte da variabilidade genética está dentro das populações, que apresentaram alelos exclusivos que provavelmente não estão sendo compartilhados pela baixa taxa de fluxo gênico. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade da espécie como modelo para estudos populacionais além de corroborarem a diferenciação genética ocorrendo em *D. prosaltans* observada em estudos anteriores. Isto poderá ser melhor avaliado ampliando o número de microssatélites e de populações amostradas.

Referências

- BARKER, J. S. F.; FRYDENBERG, J.; GONZÁLEZ, J.; DAVIES, H. I.; RUIZ, A.; SORENSEN, J. G.; LOESCHCKE, V. Bottlenecks, population differentiation and apparent selection at microsatellite loci in australian *Drosophila buzzatii*. **Heredity**, London, v. 102, p. 389-401, 2009.
- BARKER, J. S. F.; FRYDENBERG, J.; SARUP, P.; LOESCHCKE, V. Altitudinal and seasonal variation in microsatellite allele frequencies of *Drosophila buzzatii*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 24, p. 430-439, 2011.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*: I: the *saltans* subgroup. **Genetica**, Dordrecht, v. 44, p. 520-552, 1973a.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*: II: further study on *D. prosaltans*. **Genetica**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 5-15, 1978a.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in *Drosophila prosaltans*. **Genetica**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 11-27, 1978b.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I: the *saltans* subgroup. **Genetica**, Dordrecht, v. 44, p. 313-329, 1973b.
- CAVASINI, R. **Análise da estrutura genética de populações naturais de *Drosophila mediopunctata* com marcadores microssatélites**. 2015. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 621-631, 2007.
- CHAVES, N. B.; TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, p. 340-348, 2008.

- CHEN, H.; WANG, H.; SIEGFRIED, B. D. Genetic Differentiation of Western Corn Rootworm Populations (Coleoptera: Chrysomelidae) Relative to Insecticide Resistance. **Faculty Publications**, 527, 2012.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Austin, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, London, v. 93, p. 504-509, 2004.
- DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B (Methodological), v. 39, p. 1-38, 1977.
- DHARMARAJAN, G.; BEATTY, W. S.; RHODES, O. E. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund Effect: dispelling unfounded expectations. **The Journal of Wildlife Management**, Montgomery, v. 77, p. 226-234, 2013.
- DOBZHANSKY, T.; STREISINGER, G. Experiments on sexual isolation in *Drosophila*: II: geographic strains of *Drosophila prosaltans*. **Genetics**, Austin, v. 30, p. 340-345, 1944.
- DUDA, O. Die sudamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter berucksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen arten. **Archiv fur Naturgeschichte**, Leipzig, v. 91, p.1-228, 1927.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 4, p. 359-361, 2012.
- ELLSTRAND, N. C. Is the gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, Philadelphia, v. 101, n. 5, p. 737-753, 2014.
- EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 832-839, 1996.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-20, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.
- FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo de *Drosophila*. **Cultus**, São Paulo, v. 1, n. 5, p. 1-71, 1949.
- GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation Indices, version 2.9.3. Armonk: IBM, 2001. Disponível em: <https://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; SANTOS, M. H.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from atlantic forest of southern Brazil. **Zoological Science**, Tokyo, v. 32, n. 2, p. 141-150, 2015.

- HAMMER, O.; HARPER, D. A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, v. 4, p. 1-9, 2001. Disponível em: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>. Acesso em: 31 jan. 2020.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. *In*: SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (eds.). **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1983. p. 335-348.
- HARTL, D. A.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4.^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- HEDRICK, P. **Genetics of populations**. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2011.
- HOENIGSBERG, H. F.; SANTIBANEZ, S. K. Observations on the sexual behavior of *Drosophila equinoxialis* and *Drosophila prosaltans*. **The American Naturalist**, Chicago, v. 94, n. 878, p. 382-384, 1960.
- HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, Stockholm, v. 6, p. 65–70, 1979.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.
- KOPELMAN, N. M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A.; MAYROSE, I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.
- LABORDA, P. R.; MORI, G. M.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 297, 2009a.
- LABORDA, P. R.; KLACZKO, L. B.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 281-296, 2009b.
- LEE, C.-R.; MITCHELL-OLDS, T. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 4631–4642, 2011.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data: version 1.0 (d16c)**, 2001. Disponível em: < <https://phylogeny.uconn.edu/software/>>. Acesso em: 08 jan. 2020.
- MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Microsatellite allele sequencing in population analyses of the south american cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 100, p. 573-584, 2010.
- MAGALHÃES, L. E. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. **The University of Texas Publications**, Austin, v. 6205, p. 135-154, 1962.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 5-18, 2011.

- MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses –TFPGA – 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.** Computer software distributed by autor. 1997.
- MORAES, E. M.; SENE, F. M. Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, = Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionforschung, Berlin, v. 45, p. 336-344, 2007.
- MORAND, M. E.; BRACHET, S.; ROSSIGNOL, P.; DUFOUR, J.; FRASCARIA-LACOSTE, N. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 377-385, 2002.
- MOURÃO, C. A.; BICUDO, H. E. M. C. Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo *saltans* (Drosophilidae, Diptera). **Papeis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 20, p. 123-134, 1967.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, London, v. 41, p. 225-233, 1977.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NOVICIC, Z. K.; JELIC, M.; JOVANOVIC, M.; DIMITRIJEVIC, D.; VESELINOVIC, M. S.; STAMENKOVIC-RADAK, M.; ANDJELKOVIC, M. Microsatellite variability of *Drosophila subobscura* populations from the central Balkans. **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, v. 13, p. 479-494, 2011.
- NOVICIC, Z. K.; JELIC, M.; SAVIC, T.; VESELINOVIC, M. S.; DIMITRIJEVIC, D.; JOVANOVIC, M.; KENIG, B.; STAMENKOVIC-RADAK, M.; ANDJELKOVIC, M. Effective population size in *Drosophila subobscura*: ecological and molecular approaches. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 19, p. 65-74, 2013.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research: – an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 2537-2539, 2012. Disponível em: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288-295, 2006.
- PENARIOL, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MADI-RAVAZZI, L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2008.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 90, p. 502-503, 1999.
- POURNOSRAT, R.; KAYA, S.; SHAAF, S.; KILIAN, B.; OZKAN, H. Geographical and environmental determinants of the genetic structure of wild barley in southeastern Anatolia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 2, e0192386, 2018.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 945-959, 2000.
- PROUT, T.; BARKER, J. S. F. F statistics in *Drosophila buzzatii*: selection, population size and inbreeding. **Genetics**, Austin, v. 134, p. 369-375, 1993.
- RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

- RODERICK, G. K.; CROUCHER, P. J. P.; VANDERGAST, A. G.; GILLESPIE, R. G. Species differentiation on a dynamic landscape: shifts in metapopulation genetic structure using the chronology of the hawaiian archipelago. **Evolutionary Biology**, New York, v. 39, p. 192-206, 2012.
- SANGUINETTI, C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 209, 1994.
- SCHÖFL, G.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite variation and differentiation in african and non-african populations of *Drosophila simulans*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3895-3905, 2006.
- SILVA, D. C.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Migration rate and genetic diversity of two *Drosophila maculifrons* (Duda, 1927) populations from highland araucaria forest fragments in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 1, p. 254-255, 2015.
- SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L. A. (ed.). **Ecological genetics**. Princeton: Princeton University Press, 1994. p. 3-17.
- SOSA, P.; BATISTA, F.; GONZÁLEZ, M. A.; BOUZA, N. Conservación genética de especies vegetales amenazadas. In: BAÑARES-BAUDET, A. (ed.). **Biología de la conservación de plantas amenazadas**. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales, 2002. p. 133-160.
- SOUZA, T. A. J.; NOLL, F. B.; BICUDO, H. E. M. D. C.; MADI-RAVAZZI, L. Scanning electron microscopy of male *Terminalia* and its application to species recognition and phylogenetic reconstruction in the *Drosophila saltans* group. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, e97156, 2014.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 15, p. 199-203, 2000.
- TRAVA, B. M. **Estrutura populacional de *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica**. 2018. 124 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2019.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. Á. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 4-71, 2007.
- VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomics studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, [S. l.], v. 63, p. 1-332, 1990.
- WHITLOCK, M. C. Gst and D do not replace Fst. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 1083-1091, 2011.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population: variability within and among natural populations**. Chicago: The University of Chicago Press, v. 4, 1978.
- ZANELLA, C. M.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; SPERB-LUDWIG, F. Microssatélites: metodologias de identificação e análise. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 94-117
- ZORZATO, S. V. **Análise da estrutura populacional de *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) coletadas na região sul do Brasil**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2019.
- ZORZATO, S. V. **Filogeografia de *Drosophila sturtevantii* (Diptera: Drosophilidae) em biomas Neotrópicos**. 2019. 99f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2019.

3. Transferability of species-specific microsatellite primers from *D. prosaltans* to *D. austrosaltans*

Paixão, Jéssica Fernanda; Lilian Madi-Ravazzi.

Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de *Drosophila*, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto-SP, Brasil; email:lilian.madi@unesp.br

Abstract

A heterologous amplification test of 12 *Drosophila prosaltans* species-specific microsatellite primers for the species *Drosophila austrosaltans* is reported here. Of all the microsatellite primers tested, 66.7% had good amplification, a result superior to that found in the literature for tests on other pairs of species of *Drosophila*, probably due to the phylogenetic relationship between the two species evaluated. The results presented here corroborate the possibility of transferability of microsatellite primers between closely related species phylogenetically and the potential of these markers in the investigation of the populacional studies in species of the genus *Drosophila*, as well as in other species.

Introduction

Microsatellites (STR, SSR or SSLP) are tandem repeats abundant in the genomes of prokaryotes and eukaryotes. Their presence favor different kinds of analyses in several areas of study (Zanella *et al.*, 2017). In genetics, they have been used, among others, in genetic mapping, species delimitation, kinship analysis, molecular profile, hybridization patterns and phylogenetic proximity.

The possibility of using previous isolated and well-characterized microsatellite primers for a species in the study of phylogenetically related species has been a desirable and well-documented shortcut by researchers, especially when the aim is to optimize the availability of resources. In addition, the use of heterologous microsatellites allows analyzes of the relationship between species to be made with regard to different biological aspects (Laborda *et al.*, 2009).

In the present work, we tested the transferability of specific microsatellite loci from *D. prosaltans* (Duda, 1927) to *D. austrosaltans* (Spassky, 1957) (*Drosophila saltans* group). These species present complete pre-zygotic reproductive isolation

from each other (Bicudo, 1973, 1978) and are related phylogenetically, although they do not form sister clades within the *saltans* subgroup (Roman, 2018).

Materials and Methods

Twelve species-specific microsatellites loci of *D. prosaltans* (Table 1) were tested in two Atlantic Forest populations of *D. austrosaltans* (Table 2).

Table 1. Microsatellite primers developed for *D. prosaltans*.

Loci	Primer Sequence (5'-3')	Motif	Size (bp)
Dpro_A	Primer F: TTCTGTTGAACGTCACATGC Primer R: ACCACTTACCACCTATCCCT	(TG) ₁₀	238
Dpro_B	Primer F: CAAACTGTAGCTTGTGTGGG Primer R: TACTCATTCGCTTCCTGTCC	(TG) ₇	170
Dpro_C	Primer F: GCATCACTAACCGAATCACG Primer R: CTAATGCTTCCTGCCCTCTC	(GT) ₁₀	201
Dpro_D	Primer F: GACGGGCAAGAGAGTAGAAA Primer R: CCGCAACCAGAAAGAGAAAAG	(GT) ₇	235
Dpro_F	Primer F: TACTCATTCGCTTCCTGTCC Primer R: CAAACTGTAGCTTGTGTGGG	(CA) ₈	172
Dpro_G	Primer F: TCTCCTTGTCATGATGGTCG Primer R: CTTGCAAGCGGTTGAGTAAA	(GT) ₇	223
Dpro_J	Primer F: TGCCTGGTTGACTGACTAAC Primer R: CCGTAATGATGCTGCACAAA	(ACTG) ₅	215
Dpro_K	Primer F: GCTTGGCCCATTTATCTTGG Primer R: CCAGTATCTATACCGGGCAC	(CGG) ₅	167
Dpro_L	Primer F: AGCATTTTAAGCAACGCCAA Primer R: ATCATTCATTACGCGTTCGC	(TG) ₈	292
Dpro_M	Primer F: GCTTCTTAGTCCTGACTGGG Primer R: TTTGTGAGTTTGCAGCACTC	(GT) ₆	124
Dpro_N	Primer F: ACAAGCTTATGGAATGGGAA Primer R: CTGACTTCTTGCTGTTGGTG	(GT) ₉	269
Dpro_O	Primer F: CAGGCACGTTAGCAACATTT Primer R: TGTCACCTTTTTGCAGGCAAA	(CA) ₉	173

Table 2. Information on Atlantic Forest populations of *D. austrosaltans*.

Collection site	Collection date	Coordinates	Phytophysionomies	Area Size (ha)	Nº males by population
Fazenda Cambuhy, Matão/SP (MAT)	01/2016	21°37'S, 48°32'O	Semidecidual Seasonal Forest	2.189	10
Fazenda São João, Nova Granada/SP (NGR)	02/2016	20°32'S, 49°14'O	Semidecidual Seasonal Forest	1.359	15

The transferability tests performed were: PCR in Touchdown (Laborda *et al.*, 2009) for each primer using the same concentrations of reagents that had been used for populations of *D. prosaltans* from the same collection sites (Test 1); for primers that had good Touchdown amplification, adjustments in reagents concentrations and tests with a variation of five different annealing temperatures (Test 2); for primers that had good amplification in one of the temperatures of Test 2, final adjustments in the concentrations of reagents (Test 3). Table 3 shows the test results and the positive or absent amplification for each locus. The PCR amplification products were visualized by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel stained with 15% silver nitrate (Sanguinetti *et al.*, 1994, with modifications). The gels were photographed using the BioDoc-It® 210 Imaging System.

Table 3. Data on the transferability of species-specific microsatellites primers from *D. prosaltans* to *D. austrosaltans*.

Loci	T1	T2	T3	Ta	[] MgCl ₂	[] dNTP e Primers
Dpro_A	+	---	---	---	1,8 µl	0,8 µl
Dpro_B	-	-	---	---	---	---
Dpro_C	+	+	+	62°C	1,2 µl	0,6 µl
Dpro_D	+	---	---	---	1,6 µl	0,6 µl
Dpro_F	-	-	---	---	---	---
Dpro_G	+	+	+	62°C	1,2 µl	0,5 µl
Dpro_J	+	+	+	64°C	1,5 µl	0,8 µl
Dpro_K	-	-	---	---	---	---
Dpro_L	-	+	+	62°C	2,0 µl	0,8 µl

Dpro_M	+	+	+	62°C	1,5 µl	0,8 µl
Dpro_N	-	-	---	---	---	---
Dpro_O	+	+	+	62°C	1,4 µl	0,8 µl

T1 = Test with PCR cycle at Touchdown and the same concentration of reagents used for *D. prosaltans*;

T2 = test with five variations in annealing temperature and adjustments in reagents concentrations; **T3**

= test with a specific optimal annealing temperature after the result of the T2 test. + = positive amplification; - = no amplification; --- = not tested due to previous results.

Results and Discussion

The heterologous amplification of microsatellite markers specific from *D. prosaltans* to *D. austrosaltans* resulted in a transferability rate of 66.7%, that is, 8 out of the 12 pairs of primers tested, had good amplification and could be used in population analyzes of the species. The microsatellite transferability rate reported here was high when compared to data from the microsatellite transferability literature among species of the genus *Drosophila*. Laborda *et al.* (2009) described 134 polymorphic microsatellite loci for the species *D. mediopunctata* (*tripunctata* group) and tested their heterologous amplification for 30 species of the subgenus *Drosophila* and *Sophophora*, obtaining an overall transferability rate of 48%.

These specific *D. mediopunctata* microsatellite loci were later tested in other studies. Tractz *et al.* (2012) obtained a transferability rate of 28% and 50% for the species *D. ornatifrons* and *D. maculifrons* (*guarani* group), respectively. Trava *et al.* (2016) obtained a transferability rate of only 10% for the species *D. sturtevantii* of the *saltans* group. Trava (2018) described 13 polymorphic microsatellite loci for the species *D. sturtevantii* and tested their transferability to 15 species in the *saltans* group, obtaining a total transferability rate of 54.87%, since the test was for species within the same group.

In general, low transferability rates of microsatellite loci are correlated to the phylogenetic distance between the species being evaluated, since through the evolutionary processes of both species, mutations could have been fixed in the flank region of the loci, resulting in null alleles, responsible for low transferability (Trava *et al.*, 2016). This premise would explain the success in heterologous amplification between *D. prosaltans* and *D. austrosaltans*, species of the same subgroup, as well as the small amplification rate of *D. mediopunctata* loci obtained by Trava and collaborators (2016) for species *D. sturtevantii*, as they belong to different subgenera.

The primers tested here could be useful for an investigation of the diversity and genetic structure of *D. austrosaltans* populations and their transferability could be evaluated for other species in the *Drosophila saltans* group. The anticipated success for these studies may encourage others of the same nature, with the advantages already mentioned.

Acknowledgments: to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (process 2014/14059-0 and 2016/11994-5) and CAPES for financial support.

References: Bicudo, H.E.M.C. 1978, Genet. 1: 11-27; Bicudo, H.E.M.C. 1973, Genet. 44: 313-329; Duda, O. 1927, Archiv fur Naturgeschichte 91: 1-228; Laborda, P.R., L.B. Klaczko, and A.P. de Souza 2009, Conservation Genet. Resour. 1: 281-296; Roman, B.E. Reconstrução filogenética do grupo *saltans* de *Drosophila* utilizando marcadores morfológicos e moleculares. 2018. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2018; Spassky, B. 1957, Univ. Texas Publ. 5721: 48-61; Sanguinetti, C., E. Dias Neto, and A.J.G. Simpson 1994, Biotechniques 17: 209; Tractz, C.C., G.R. Salomon, S.V. Zorzato, L.P.B. Machado, and R.P. Mateus 2012, Dros. Inf. Serv. 95: 76-79; Trava, B.M. Estrutura populacional de *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica. 2018. 124f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2018. Trava, B.M.; L.P.B. Machado, R.P. Mateus, L. Madi-Ravazzi 2016, Dros. Inf. Serv. 99: 16-18; Zanella, C. M., C. Turchetto, C. Palma-Silva, and F. Sperb-Ludwig 2017, Sociedade Brasileira de Genética 94-117.

4. Genetic variability assessed by microsatellites in sympatric species *D. prosaltans* and *D. austrosaltans* (Diptera, Drosophilidae, *saltans* group)

Jéssica Fernanda Paixão¹ and Lilian Madi-Ravazzi¹

¹Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de *Drosophila*, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail = jessicafernanda.ibilce@gmail.com

Abstract

Here we report for the first time an analysis of the microsatellite diversity in Atlantic Forest populations of two sympatric species from *Drosophila saltans* group: *D. prosaltans* and *D. austrosaltans*. *D. prosaltans* showed a higher percentage of polymorphism than *D. austrosaltans*, although the mean *PIC* values for both species were high (*PIC* = 0.8258 and 0.7909 for *D. prosaltans* and *D. austrosaltans*, respectively), demonstrating that the microsatellite loci were informative for population analyzes. The values of mean observed heterozygosity (*H_o*) and mean number of alleles (*N_a*) were close, indicating that the species present similar levels of diversity for the used marker. A moderate interpopulation genetic differentiation was found for both species and no recent genetic bottleneck was detected for the populations. The results presented here can inspire more in-depth studies of the same nature, in order to learn a little more about the factors that shape the genetic variability of sympatric species.

Keywords: Genetic diversity, microsatellite markers, SSR, Atlantic Forest. Sympatric species.

Drosophila prosaltans (Duda, 1927) and *D. austrosaltans* (Spassky, 1957) are species belonging to the *saltans* subgroup of the *saltans* group. Both species are widely distributed in forests areas of the neotropical region, being found in Central and South America. In some regions, they are sympatric (Magalhães, 1962). Classical studies with the *saltans* group from the 1970's discuss about both species. *D. prosaltans* and *D. austrosaltans* present complete pre-zygotic reproductive isolation from each other, although they produce fertile hybrids in crosses with other species of the *saltans* subgroup. *D. prosaltans* presents greater fertility than *D. austrosaltans*, related to the egg laying capacity, as well as greater productivity (Bicudo, 1973a, 1978a).

Regarding the analysis of chromosomal polymorphism in the *saltans* group and especially in the *saltans* subgroup, it was demonstrated that the qualitative degree of the polymorphism is greater in species that have a wide area of geographic distribution and, in accordance with this, *D. prosaltans* showed greater chromosomal diversity than *D. austrosaltans* and the other species of the subgroup (Bicudo, 1973b, 1978b). The *saltans* subgroup has many phylogenetic inconsistencies, which may be the result of its recent divergence. Thus, it is not possible to infer much about the relationships between these species based on the literature, even if they are from the same subgroup (O'Grady *et al.*, 1998; Roman *et al.*, 2020, in preparation).

Assuming the success reported in the literature for the transferability of microsatellite markers to be used in population analyzes (Bravo *et al.*, 2006; Tractz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013) and emphasizing the importance of analyzes of the genetic diversity of species because this is the raw material to be worked by evolutionary forces, the genetic diversity of two Atlantic Forest populations of *D. austrosaltans* and *D. prosaltans* was investigated through the amplification of eight microsatellite loci that were specifically designed for *D. prosaltans* and were transferred to *D. austrosaltans* (Paixão and Madi-Ravazzi, 2020, accepted for publication in D.I.S).

The present work fundamentally contributes to the set of information about this group of *Drosophila* species since the literature on it is extremely scarce and old. The information gap on the ecological characteristics of the species, their distribution, the sharing of resources, whether they are specialists or not, their patterns of genetic variability, among others, underscore the need to investigate these aspects and the importance of this initiative in order to also encourage other researchers to understand the biology of these flies.

Primarily, the comparison of the genetic variability of microsatellites between the two species would be based on the analysis of a vast number of populations, since the expectation was to find, in a sufficient sample number, populations of both species in different collection locations throughout Brazil. Unlike what was expected, it was possible to observe during our sample effort that *D. austrosaltans* is less abundant than *D. prosaltans* or even that *D. sturtevanti*, another species of the *saltans* group studied by our research group. Although they can be sympatric in other locations, *D. austrosaltans* seems to be more specialized and his sampling could also be influenced by seasonality (Torres and Madi-Ravazzi, 2006). As our collections were only during

the summer, we investigated here the variability patterns of two Atlantic Forest populations of the species, whose sample number was sufficient for molecular analyzes.

The populations of the species evaluated here come from fragments of Atlantic Forest in the interior of the state of São Paulo with phytogeography Seasonal Semideciduous Forest. The populations of Matão / SP (MAT) (21° 37'S, 48° 32'O) and Nova Granada / SP (NGR) (20° 32'S, 49° 14'O) were sampled by 10 and 15 males of the *D. austrosaltans* and 15 and 15 males of *D. prosaltans*. The samples were collected using closed traps with banana baits and biological yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (Penariol *et al.*, 2008). Males were identified by analyzing the terminalia using specific identification keys (Freire-Maia and Pavan 1949; Mourão and Bicudo 1967; Vilela and Bächli 1990; Souza *et al.*, 2014). Isolines were established with the wild females and their identification was carried out by analyzing the terminalia of the descendant males.

The DNA of the samples was extracted according to the protocol of Trava *et al.* (2020). Eight species-specific microsatellite loci of *D. prosaltans*, here called Dpro_A, Dpro_C, Dpro_D, Dpro_G, Dpro_J, Dpro_L, Dpro_M and Dpro_O, were amplified to the populations of *D. prosaltans* and transferred and amplified heterologously to the populations of *D. austrosaltans* under standard PCR conditions (Paixão and Madi-Ravazzi, 2020, accepted for publication in D.I.S). The PCR amplification products were visualized by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel stained with 15% silver nitrate (Sanguinetti *et al.*, 1994, with modifications). The gels were photographed using the BioDoc-It® 210 Imaging System UVP coupled camera system and genotyped manually.

From the molecular data, the genotype matrices were built based on the approximate size of the fragments obtained for each microsatellite in each analyzed population. Each of the descriptive analyzes of genetic diversity and the respective softwares used are shown in Table 1. The occurrence of possible recent genetic bottlenecks was tested in the BOTTLENECK program (Cornuet and Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999). The simulation of the coalescence process of the sampled loci was performed under the TPM model - *Two Phase Model*, using the Wilcoxon Signed-Rank Test, ignoring the proportion of mutation by the SMM model - *Stepwise Mutation Model* and using the parameters of 90% mutations of a single step, 10% of mutations of multiple steps, 12 of variation of the geometric distribution and 1000 interactions. The degree of genetic differentiation between the sampled populations was verified using

Wright's F Statistics with the qualitative guide proposed by Wright (1978) in 'low' (0 – 0.05), 'moderate' (0.05 – 0.25) and 'high' (> 0.25).

Table 1. Descriptive analyzes of the genetic diversity of microsatellites of the species.

Analyze	Software
Percent of Polymorphism	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
PIC = Allelic Polymorphic Information Content	CERVUS v.3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007)
An = frequency of null alleles	GENEPOP v.4.7.3 (ROUSSET, 2008)
Ho = mean observed heterozygosity	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
He = mean expected heterozygosity	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Na = mean number of alleles	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Ne = mean effective number of alleles	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
F = fixation index	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Fst = Wright F statistic - subpopulations with all	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Fis = Wright F statistic - individuals in relation to subpopulations	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Fit = Wright F statistic - individuals in relation to all	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Nm = number of migrants	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Ar = mean allelic richness	FSTAT v.2.93 (GOUDET, 2001)
Np = number of private alleles	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Ap = mean frequency of private alleles	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Loci with departure of Hardy-Weinberg expectations (HWE) with Bonferroni correction ($p < 0,05$)	GenAlEx v.6.51b2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012)
Occurrence of bottlenecks	BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY et al., 1999)

The analyse of eight microsatellite loci in the two populations of *D. prosaltans* and *D. austrosaltans* resulted in the detection of 84 and 70 alleles, respectively. The mean allelic richness, that is, the ratio between the sum of the population allele numbers per locus and the total number of loci, resulted in a mean of approximately 8 and 6 alleles per locus to *D. prosaltans* and *D. austrosaltans*, respectively, with values ranging from 7 alleles (Dpro_L to *D. prosaltans* and Dpro_G to *D. austrosaltans*) to 10 alleles (Dpro_C, Dpro_D and Dpro_M to *D. austrosaltans*) and 14 alleles (Dpro_G to *D. prosaltans*) per locus. The loci were 100% polymorphic to *D. prosaltans* and, on average, $93.75 \pm 6.25\%$ polymorphic to *D. austrosaltans*, and the PIC (*Allelic Polymorphic Information Content*) values for this species ranged from 0.716 (Dpro_A) to 0.846 (Dpro_D).

The genetic diversity data for the species are shown in Table 2. The mean frequency of null alleles found could be responsible for explaining the heterozygote deficiency revealed by the high *F_{is}* and *F_{it}* values and also by the deviations of the Hardy-Weinberg Equilibrium loci, indicating the action of evolutionary forces in populations and, further suggesting, the occurrence of inbreeding or Wahlund effect (Dakin and Avise, 2004; Hartl and Clark, 2010; Machado *et al.*, 2010; Dharmarajan *et al.*, 2013).

The populations showed significant deviations from the Hardy-Weinberg Equilibrium with Bonferroni correction ($p < 0.05$) for at least one locus. For the *D. austrosaltans*, the Dpro_G locus presented itself as monomorphic for the MAT population in this analysis and, in addition, only the Dpro_L locus had a deviation for this population. The NGR population presented the following loci with departures from the HWE: Dpro_A, Dpro_L, Dpro_G, Dpro_J, Dpro_M, and Dpro_O. For *D. prosaltans*, just Dpro_G locus did not show departures from the HWE to the MAT population, while for the NGR population, the loci Dpro_A, Dpro_C, Dpro_D and Dpro_M showed departures.

Table 2. Data on genetic diversity of *D. prosaltans* and *D. austrosaltans* (mean \pm standard error).

	<i>D. prosaltans</i>		<i>D. austrosaltans</i>	
	MAT	NGR	MAT	NGR
Percent of Polymorphism	100%	100%	87,50%	100%
PIC (mean)	0.8258		0.7909	
An	0.2735		0.2735	
Ho	0.275 \pm 0.037	0.442 \pm 0.098	0.292 \pm 0.079	0.325 \pm 0.049
He	0.774 \pm 0.029	0.770 \pm 0.014	0.626 \pm 0.093	0.758 \pm 0.016
Na	6.750 \pm 0.648	6.875 \pm 0.227	4.875 \pm 0.693	7.250 \pm 0.366
Ne	4.890 \pm 0.538	4.467 \pm 0.259	3.465 \pm 0.577	4.273 \pm 0.312
F	0.649 \pm 0.045	0.423 \pm 0.127	0.535 \pm 0.092	0.575 \pm 0.063
Fst	0.086 \pm 0.011		0.143 \pm 0.043	
Fis	0.535 \pm 0.066		0.569 \pm 0.065	
Fit	0.574 \pm 0.063		0.621 \pm 0.065	
Nm	2.915 \pm 0.312		2.888 \pm 0.932	
Ar	8.044		5.895	
Np	29	30	12	31
Ap	0.130	0.137	0.223	0.126
Loci with departure of HWE	7	4	1	6
Occurrence of bottlenecks	---	---	---	---

The presence of private alleles reinforces the moderate interpopulation genetic differentiation observed for the two populations of *D. prosaltans* and *D. austrosaltans* according to the F_{st} values (Wright, 1978). When an allele is private to a certain population and it occurs with high frequency, there are indications that this population is differentiated and has a low gene flow with the others. Although the mean frequency of the private alleles for populations of both species was relatively low, some alleles specifically were found in high frequency, for example, in the MAT population of *D. austrosaltans*, the alleles 3 and 2 of the Dpro_D and Dpro_M loci with a frequency of 0.500 and 0.450, respectively and, in the NGR population of *D. austrosaltans*, the alleles 4 and 5 of the Dpro_D and Dpro_M loci with a frequency of 0.367 and 0.467, respectively. In *D. prosaltans* MAT population we found the allele 2 of the Dpro_D locus with a frequency of 0.333 and to the NGR population, the alleles 5 and 2 of the Dpro_M and Dpro_O locus with 0.400 and 0.450 of frequency, respectively. It is possible that even though they are separated by a geographical distance of only 140 km, barriers to gene flow have not provided the sharing of these alleles among populations of each species.

The mean value of H_o observed for the species ($H_o = 0.308 \pm 0.045$ for *D. austrosaltans* and $H_o = 0.358 \pm 0.055$ for *D. prosaltans*) was lower than H_e ($H_e = 0.692 \pm 0.049$ for *D. austrosaltans* and $H_e = 0.772 \pm 0.016$), although it is within a variation threshold found in the literature for other species of the genus *Drosophila* (Moraes and Sene, 2007; Machado *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015; Trava *et al.*, 2020). The H_o values of the MAT and NGR populations of *D. austrosaltans* and *D. prosaltans* were similar as well the mean number of alleles (Table 2), indicating that these species have similar levels of genetic diversity for the studied marker, which may be due to the action of the same evolutionary forces and environmental variations of the same intensity in the populations of both species, since both live in sympatric in many regions (Magalhães, 1962).

The results of the analysis of individual populations in the BOTTLENECK program under the TPM mutation model did not indicate the occurrence of any recent genetic bottleneck in the populations analyzed, considering the excess of heterozygosity. It is necessary to consider that regardless of the identification or not of the occurrence of recent genetic bottlenecks in the populations by the statistical analysis of the program, the agricultural environment, the availability of resources and

the application of insecticides and pesticides can be determinants in the population number and consequently in the levels of heterozygosity found (Chen *et al.*, 2012).

Despite being geographically close, it is likely that barriers to gene flow have shaped the interpopulation differentiation found for each species. Still, it was possible to observe for the descriptive analyzes of genetic diversity performed here similar patterns of variation for the studied sympatric species. However, it is necessary to carefully investigate the factors that may explain this similarity, since in the literature it has already been reported for species of the same subgroup, phylogenetically related and, with overlapping geographic distribution, differentiation (and not similarity) in the variation patterns of other molecular markers (Ayala *et al.*, 1970). Still, this type of analysis needs to be better explored in the literature with different genetic markers. The microsatellite loci analyzed, even if they come from transferability between species, were hypervariable and polymorphic and have the potential to be informative for the study of the population structure of the species of the *Drosophila saltans* group.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (process 2014/14059-0 and 2016/11994-5) and CAPES for financial support.

References

- Ayala, FJ, Mourão, CA, Pérez-Salas, S, Richmond, R and Dobzhansky, T (1970) Enzyme Variability in the *Drosophila willistoni* Group, I. Genetic Differentiation Among Sibling Species. *Proc Natl Acad Sci* 67: 225-232.
- Bicudo, HEMC (1973a) Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*: I: the *saltans* subgroup. *Genet* 44: 520-552.
- Bicudo, HEMC (1973b) Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I: the *saltans* subgroup. *Genet* 44: 313-329.
- Bicudo, HEMC (1978a) Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*: II: further study on *D. prosaltans*. *Genet* 48: 5-15.
- Bicudo, HEMC (1978b) Reproductive isolation in *Drosophila prosaltans*. *Genet* 1: 11-27.
- Bravo, JP, Hoshino, AA, Angelici, CMLCD, Lopes, CR and Gimenes, MA (2006) Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germoplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genet Mol Biol* 29: 516-524.
- Chen, H, Wang, H, and Siegfried, BD (2012) Genetic Differentiation of Western Corn Rootworm Populations (Coleoptera: Chrysomelidae) Relative to Insecticide Resistance. *Faculty Publications* 527.

- Cornuet, JM and Luikart, G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Dakin, EE and Avise, JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Dharmarajan, G, Beatty, WS and Rhodes, OE (2013) Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund Effect: dispelling unfounded expectations. *J Wildl Manag* 77: 226-234.
- Duda, O (1927) Die sudamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter berucksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen arten. *Archiv fur Naturgeschichte* 91: 1-228.
- Freire-maia, N and Pavan, C (1949) Introdução ao estudo de *Drosophila*. *Cultus* 1: 1-71.
- Goudet, J. (2010) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation Indices, version 2.9.3. Armonk: IBM. Available in: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Hartl, DA and Clark, AG (2010) Princípios de genética de populações. 4th edition. Artmed, Porto Alegre, 660 p.
- Kalinowski, ST, Taper, ML and Marshall, TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16: 1099-1106.
- Machado, LPB, Mateus, RP, Sene, FM and Manfrin, MH (2010) Microsatellite allele sequencing in population analyses of the south american cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). *Biol J Linn Soc Lond*, 100: 573-584.
- Magalhães, LE (1962) Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. *Univ Tex Publ* 6205: 135-154.
- Moraes, EM and Sene, FM (2007) Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical an current factors in shaping the genetic population structure. *J Zool Syst Evol Res* 45: 336-344.
- Mourão, CA and Bicudo, HEMC (1967) Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo *saltans* (Drosophilidae, Diptera). *Pap Avulsos Zool* 20: 123-134.
- O' Grady, PM, Clark, JB and Kidwel, MG (1998) Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol* 15: 656-664.
- Oliveira, GAF, Pádua, JG, Costa, JL, Jesus, ON, Carvalho, FM and Oliveira, EJ (2013) Cross-species Amplification of Microsatellite Loci Developed for *Passiflora edulis Sims*. in Related *Passiflora* Species. *Braz Arch Biol Technol* 56: 785-792.
- Peakall, R and Smouse, PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research: an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Peakall, R and Smouse, PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Penariol, L, Bicudo, HEMC and Madi-ravazzi, L (2008) On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. *Biota Neotrop*, 8: 47-51.
- Piry, S, Luikart, G and Cornuet, JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Heredity* 90: 502-503.
- Rousset, F (2008) Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8: 103-106.

- Sanguinetti, C, Dias Neto, E and Simpson, AJG (1994) RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 209.
- Silva, DC, Machado, LPB and Mateus, RP (2015) Migration rate and genetic diversity of two *Drosophila maculifrons* (Duda, 1927) populations from highland araucaria forest fragments in southern Brazil. *Braz J Bio* 75: 254-255.
- Souza, TAJ, Noll, FB, Bicudo, HEMC and Madi-Ravazzi, L (2014) Scanning electron microscopy of male *Terminalia* and its application to species recognition and phylogenetic reconstruction in the *Drosophila saltans* group. *PLoS One* 9: e97156.
- Spassky, B (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Univ Tex Publ* 5721: 48-61.
- Torres, FR, Madi-Ravazzi, L (2006) Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp. (Diptera) in two woodlands in the State of São Paulo, Brazil. *Iheringia, Sér. Zool* 96: 437-444.
- Tractz, CC, Salomon, GR, Zorzato, SV, Machado, LPB and Mateus, RP (2012) Allele diversity of cross-species microsatellite amplification on populations of *Drosophila guarani* species group from araucaria forest in Brazil. *Dros Inf Serv* 95: 76-79.
- Trava, BM, Mateus, RP, Machado, LPB and Madi-Ravazzi, L (2020) Moderate population structure in *Drosophila sturtevanti* from Atlantic Forest biome. *Scientific Reports* In press.
- Vilela, CR, Bächli, G (1990) Taxonomics studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 63: 1-332.
- Wright, S (1978) *Evolution and the genetics of population: variability within and among natural populations*. Univ Chicago Press 4.

5. CONCLUSÃO GERAL

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

REFERÊNCIAS

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

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

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611–20, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, p. 564–567, 2010.

EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 81, p. 117-142, 2006.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo de *Drosophila*. **Cultus**, São Paulo, v. 1, n. 5, p. 1-71, 1949.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. *Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese*. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (ed.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica - Belo Horizonte: Conservação Internacional. 2005. p. 3-12.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation Indices, version 2.9.3. Armonk: IBM, 2001. Disponível em: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: 1 ago. 2019.

GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; SANTOS, M. H.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from atlantic forest of southern Brazil. **Zoological Science**, Tokyo, v. 32, n. 2, p. 141-150, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMER, O.; HARPER, D. A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, [S. l.], v. 4, p. 1-9, 2001. Disponível em: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>. Acesso em: 31 jan. 2020.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (eds.). **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1983. p. 335-348.

HARTL, D. A.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4.ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HEDRICK, P. **Genetics of populations**. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2011.

HOENIGSBERG, H. F.; SANTIBANEZ, S. K. Observations on the sexual behavior of *Drosophila equinoxialis* and *Drosophila prosaltans*. **The American Naturalist**, Chicago, v. 94, n. 878, p. 382-384, 1960.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, Stockholm, v. 6, p. 65–70, 1979.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

KOPELMAN, N. M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A.; MAYROSE, I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.

- KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 1147–1150, 2004.
- LABORDA, P. R.; MORI, G. M.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 297, 2009a.
- LABORDA, P. R.; KLACZKO, L. B.; SOUZA, A. P. *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 281-296, 2009b.
- LEE, C.-R.; MITCHELL-OLDS, T. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 4631–4642, 2011.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data: version 1.0 (d16c). Storrs: University of Connecticut, 2001. Disponível em: <https://phylogeny.uconn.edu/software/>. Acesso em: 8 jan. 2020.
- LIMA, R. A. F.; MORI, D. P.; PITTA, G. MELITO, M. O.; BELLO, C.; MAGNAGO, L. F.; ZWIENER, V. P.; SARAIVA, D. D.; MARQUES, M. C. M.; DE OLIVEIRA, A. A.; PRADO, P. I. How much do we know about the endangered atlantic forest?: reviewing nearly 70 years of information on tree community surveys. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 24, p. 2135–2148, 2015.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.
- MACHADO, C. A.; HEY, J. The causes of phylogenetic conflict in a classic species group. **Proceeding of the Royal Society of London: Series B: Biological Sciences**, London, v. 270, p. 1193-2002, 2003.
- MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Microsatellite allele sequencing in population analyses of the south american cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 100, p. 573-584, 2010.
- MAGALHÃES, L. E. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. **The University of Texas Publications**, Austin, v. 6205, p. 135-154, 1962.
- MANEL, S.; PONCET, B. N.; LEGENDRE, P.; GUGERLI, F.; HOLDEREGGER, R. Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabis alpina*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 3824–3835, 2010.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 5-18, 2011.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica> Acesso em: 18 abr. 2019.
- MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses**: TFGPA – 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Northern Arizona University: Flagstaff, 1997.
- MIROL, P. M.; SCHÄFER, M. A.; ORSINI, L.; ROUTTU, J.; SCHLÖTTERER, C.; HOIKKALA, A.; BUTLIN, R. K. Phylogeographic patterns in *Drosophila montana*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1085-1097, 2007.

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

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 90, p. 502-503, 1999.

PISA, G.; ORIOLI, V.; SPILOTROS, G.; FABBRI, E.; RANDI, E.; BANI, L. Detecting a hierarchical genetic population structure: the case study of the fire salamander (*Salamandra salamandra*) in northern Italy. **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 5, p. 743-758, 2015.

POURNOSRAT, R.; KAYA, S.; SHAAF, S.; KILIAN, B.; OZKAN, H. Geographical and environmental determinants of the genetic structure of wild barley in southeastern Anatolia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 2, e0192386, 2018.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 945-959, 2000.

PROUT, T.; BARKER, J. S. F. F statistics in *Drosophila buzzatii*: selection, population size and inbreeding. **Genetics**, Austin, v. 134, p. 369-375, 1993.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. G.; HIROTA, M. M. The brazilian atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed?: implications for conservation. **Biological Conservation**, Essex, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RODERICK, G. K.; CROUCHER, P. J. P.; VANDERGAST, A. G.; GILLESPIE, R. G. Species differentiation on a dynamic landscape: shifts in metapopulation genetic structure using the chronology of the hawaiian archipelago. **Evolutionary Biology**, New York, v. 39, p. 192-206, 2012.

ROMAN, B.E. **Reconstrução filogenética do grupo saltans de *Drosophila* utilizando marcadores morfológicos e moleculares**. 2018. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2019.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 103-106, 2008.

SANGUINETTI, C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 209, 1994.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, p. 211-215, 1992.

SCHÖFL, G.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite variation and differentiation in african and non-african populations of *Drosophila simulans*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3895-3905, 2006.

SILVA, D. C.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Migration rate and genetic diversity of two *Drosophila maculifrons* (Duda, 1927) populations from highland araucaria forest fragments in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 1, p. 254-255, 2015.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L. A. (ed.). **Ecological genetics**. Princeton: Princeton University Press, 1994. p. 3-17.

SOARES, T. N.; SANT' ANA, L. L.; DE OLIVEIRA, L. K.; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G. Transferability and characterization of microsatellite loci in *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3146-3149, 2013.

SOSA, P.; BATISTA, F.; GONZÁLEZ, M. A.; BOUZA, N. Conservación genética de especies vegetales amenazadas. In: BAÑARES-BAUDET, A. (ed.). **Biología de la conservación de plantas amenazadas**. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales, 2002. p. 133-160.

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

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

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

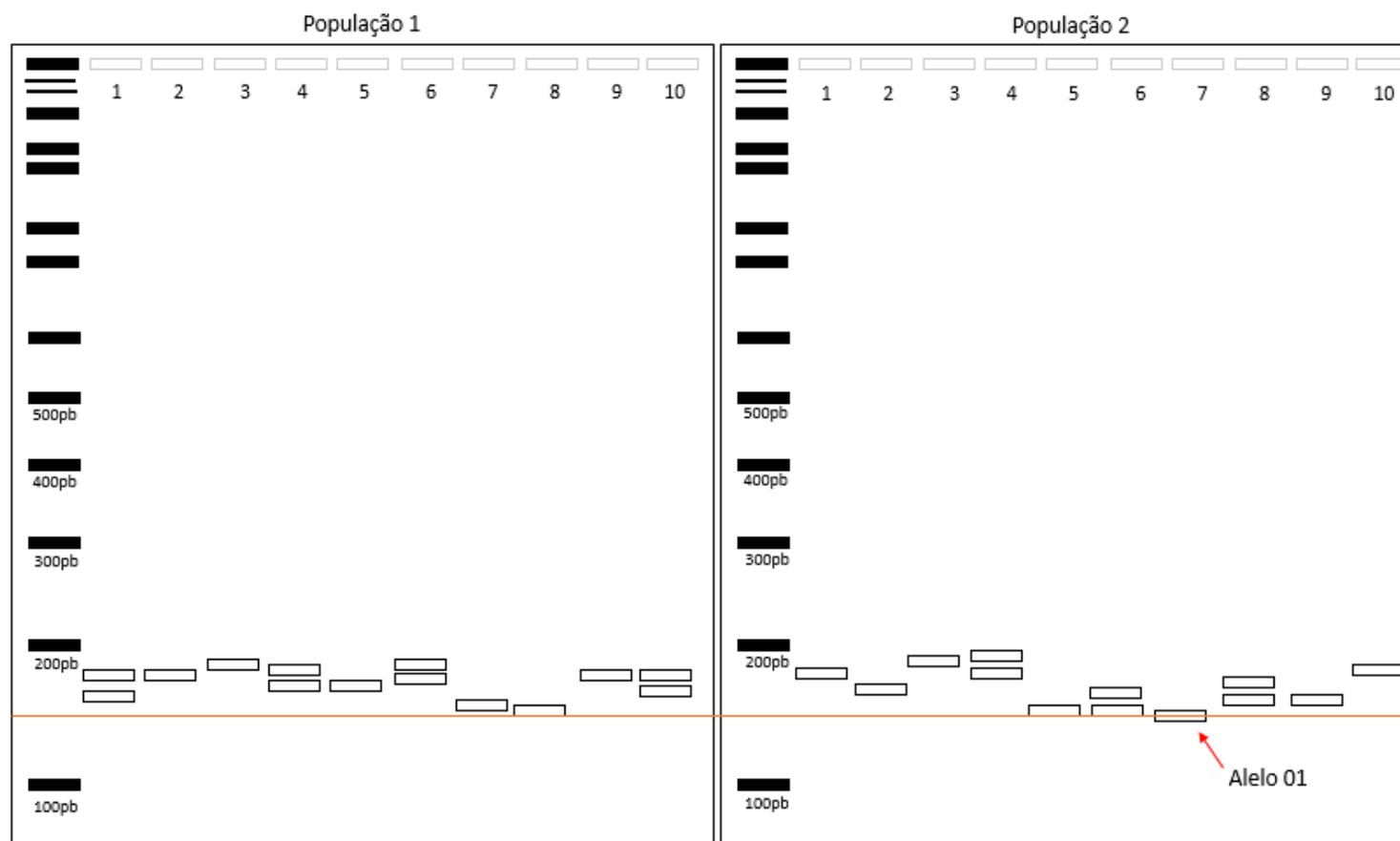
ZANELLA, C. M.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; SPERB-LUDWIG, F. Microsatélites: metodologias de identificação e análise. *In*: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira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

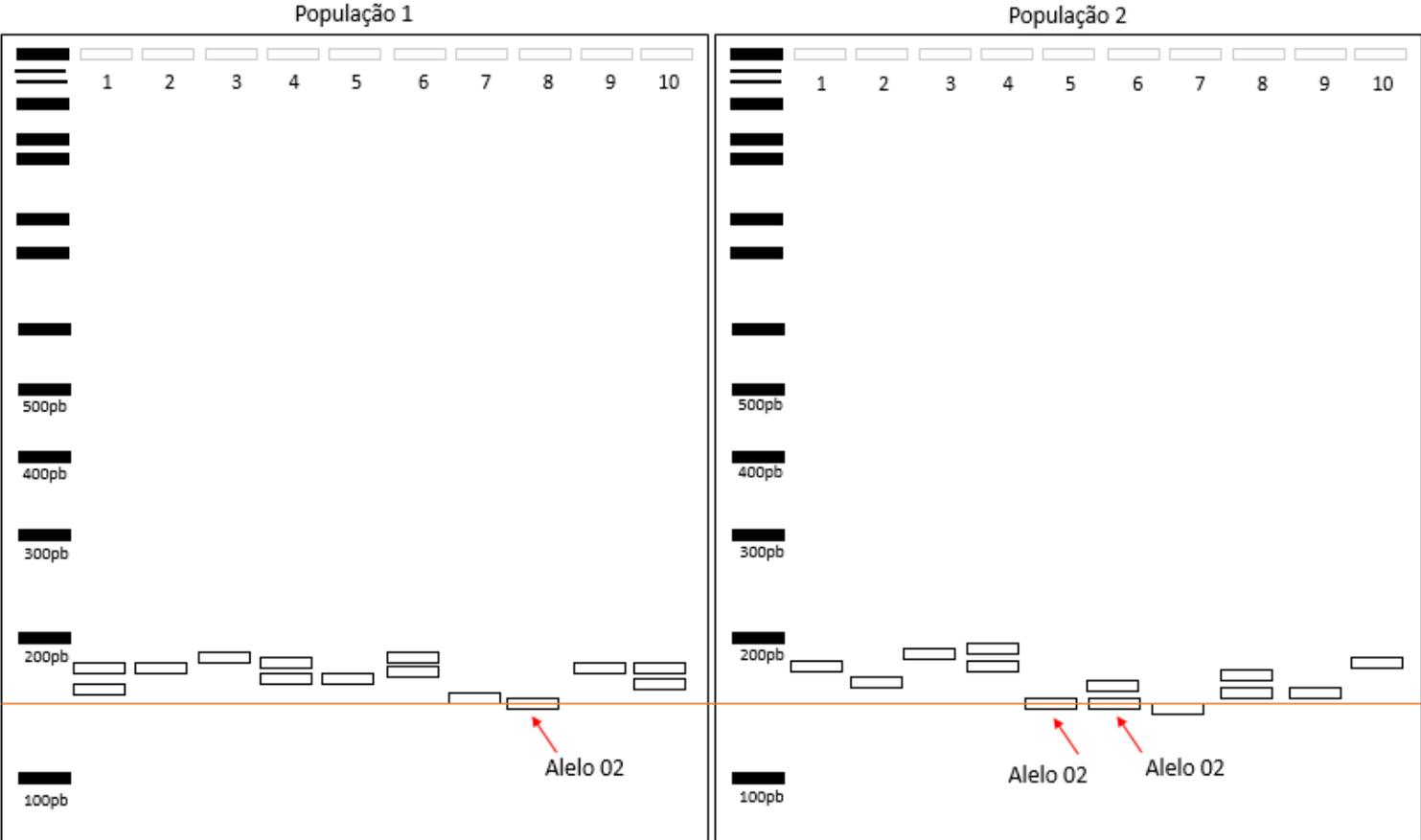
ZORZATO, S. V. **Análise da estrutura populacional de *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae) coletadas na região sul do Brasil**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2019.

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

APÊNDICE A – Genotipagem dos géis

As imagens dos géis de cada uma das populações para um mesmo loco são posicionadas uma ao lado da outra, fixando-se uma taxa de proporção para as mesmas para que elas possam ser alinhadas com base nas marcações de pares de base do marcador (*ladder*). É necessário traçar uma linha e de baixo para cima realizar a identificação dos alelos. O alelo de menor tamanho, como demonstrado na figura abaixo, será denominado de Alelo 01. Sobe-se a linha para identificar o próximo alelo, que será denominado como Alelo 02, que está exemplificado na página seguinte, e assim sucessivamente. A identificação dos alelos é colocada em diferentes formatos de matrizes de dados para que essa informação seja utilizada nas análises.





APÊNDICE B – Frequências alélicas por loco e por população para a espécie *D. prosaltans*

Loco	N° de Alelos	CUR	ADB	MAT	NGR	PIC	ELD	SDC	VIT
Dpro_A	N	13	13	15	14	15	14	9	8
	1	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	3	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125
	5	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
	6	0,077	0,154	0,200	0,143	0,100	0,000	0,000	0,125
	7	0,462	0,077	0,233	0,250	0,133	0,071	0,111	0,000
	8	0,000	0,077	0,167	0,036	0,067	0,071	0,000	0,188
	9	0,077	0,077	0,000	0,107	0,267	0,214	0,444	0,063
	10	0,077	0,154	0,100	0,036	0,067	0,071	0,000	0,063
	11	0,154	0,192	0,000	0,357	0,167	0,000	0,333	0,125
	12	0,000	0,077	0,000	0,000	0,133	0,071	0,000	0,063
	13	0,077	0,077	0,000	0,071	0,000	0,179	0,000	0,000
	14	0,000	0,038	0,000	0,000	0,033	0,107	0,000	0,063
	15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,179	0,111	0,000
	16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000
Dpro_B	N	15	13	13	14	15	14	8	8
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,313
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
	3	0,000	0,077	0,115	0,000	0,167	0,000	0,188	0,000
	4	0,000	0,038	0,077	0,000	0,133	0,143	0,000	0,000
	5	0,000	0,154	0,231	0,000	0,233	0,321	0,313	0,000
	6	0,067	0,077	0,038	0,000	0,000	0,107	0,000	0,375
	7	0,133	0,077	0,038	0,286	0,067	0,000	0,000	0,125
	8	0,333	0,077	0,154	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
	9	0,000	0,115	0,115	0,000	0,200	0,321	0,188	0,000
	10	0,067	0,077	0,154	0,179	0,000	0,000	0,313	0,000
	11	0,000	0,115	0,038	0,036	0,100	0,000	0,000	0,000
	12	0,200	0,115	0,038	0,286	0,000	0,107	0,000	0,000
	13	0,133	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	14	0,000	0,000	0,000	0,179	0,000	0,000	0,000	0,000
	15	0,067	0,038	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000
Dpro_C	N	15	14	15	14	11	13	7	8
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,071	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,375
	4	0,067	0,000	0,000	0,000	0,091	0,423	0,143	0,313
	5	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,192	0,000	0,000
	6	0,367	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077	0,786	0,188
	7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,115	0,000	0,000

8	0,033	0,036	0,000	0,000	0,364	0,038	0,000	0,000	
9	0,000	0,000	0,100	0,000	0,091	0,000	0,000	0,000	
10	0,367	0,000	0,000	0,000	0,136	0,077	0,000	0,000	
11	0,000	0,536	0,167	0,000	0,182	0,000	0,000	0,000	
12	0,067	0,143	0,300	0,214	0,045	0,000	0,000	0,000	
13	0,000	0,000	0,000	0,214	0,000	0,000	0,000	0,000	
14	0,000	0,286	0,233	0,357	0,000	0,000	0,000	0,000	
15	0,000	0,000	0,200	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000	
16	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	
Dpro_D	N	14	15	15	15	15	15	8	7
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,375	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,000
4	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,367	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,000	0,333	0,000	0,000	0,267	0,000	0,000	0,125	0,000
7	0,000	0,000	0,267	0,000	0,633	0,733	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,100	0,200	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,500
9	0,964	0,067	0,067	0,433	0,000	0,000	0,125	0,286	0,000
10	0,000	0,000	0,167	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,033	0,200	0,100	0,100	0,067	0,000	0,000	0,000
12	0,036	0,000	0,033	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071
13	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143
14	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Dpro_F	N	14	15	15	15	15	15	10	8
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,350	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,375
4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
5	0,000	0,000	0,000	0,567	0,000	0,000	0,000	0,350	0,000
6	0,000	0,000	0,300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150	0,000
7	0,071	0,267	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250
8	0,214	0,067	0,167	0,000	0,467	0,267	0,000	0,000	0,000
9	0,179	0,000	0,000	0,033	0,167	0,200	0,000	0,000	0,000
10	0,036	0,200	0,000	0,400	0,000	0,100	0,150	0,000	0,000
11	0,107	0,133	0,433	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,143	0,167	0,067	0,000	0,200	0,200	0,000	0,000	0,000
13	0,179	0,167	0,000	0,000	0,167	0,133	0,000	0,000	0,000
14	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
15	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Dpro_G	N	15	14	15	15	15	15	9	8
1	0,067	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,036	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000
3	0,000	0,000	0,033	0,000	0,233	0,033	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,036	0,133	0,000	0,067	0,000	0,111	0,000	0,000
5	0,200	0,000	0,100	0,233	0,267	0,000	0,056	0,000	0,000

6	0,400	0,250	0,500	0,033	0,100	0,000	0,000	0,063	
7	0,067	0,214	0,067	0,000	0,000	0,000	0,556	0,500	
8	0,100	0,036	0,067	0,033	0,200	0,633	0,111	0,063	
9	0,067	0,393	0,033	0,300	0,000	0,233	0,111	0,000	
10	0,100	0,036	0,000	0,133	0,000	0,000	0,000	0,375	
11	0,000	0,000	0,000	0,067	0,033	0,000	0,000	0,000	
12	0,000	0,000	0,000	0,133	0,067	0,100	0,000	0,000	
13	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	
Dpro_J	N	15	15	15	15	15	15	10	8
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,450	0,000
4	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,333	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,133	0,067	0,267	0,467	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063
7	0,000	0,000	0,267	0,267	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000
8	0,100	0,167	0,000	0,000	0,533	0,200	0,100	0,375	0,000
9	0,167	0,067	0,100	0,000	0,267	0,200	0,000	0,125	0,000
10	0,033	0,167	0,233	0,033	0,133	0,267	0,000	0,250	0,000
11	0,200	0,367	0,133	0,167	0,000	0,200	0,000	0,125	0,000
12	0,033	0,133	0,000	0,000	0,067	0,067	0,000	0,063	0,000
13	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Dpro_K	N	15	15	15	12	12	9	10	7
1	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,067	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000
5	0,000	0,167	0,400	0,042	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000
6	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,056	0,050	0,000	0,000
7	0,067	0,300	0,000	0,000	0,042	0,222	0,150	0,000	0,000
8	0,033	0,167	0,167	0,125	0,083	0,222	0,150	0,000	0,000
9	0,000	0,067	0,033	0,000	0,000	0,111	0,200	0,071	0,000
10	0,133	0,133	0,067	0,250	0,042	0,000	0,050	0,286	0,000
11	0,067	0,033	0,033	0,125	0,125	0,222	0,000	0,071	0,000
12	0,233	0,033	0,100	0,125	0,042	0,056	0,050	0,429	0,000
13	0,267	0,000	0,000	0,042	0,208	0,000	0,100	0,143	0,000
14	0,033	0,000	0,033	0,000	0,250	0,056	0,000	0,000	0,000
15	0,067	0,000	0,000	0,042	0,083	0,056	0,000	0,000	0,000
16	0,033	0,033	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000
17	0,067	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,100	0,000	0,000
Dpro_L	N	14	15	15	15	15	14	9	8
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000
3	0,000	0,067	0,000	0,367	0,000	0,071	0,167	0,000	0,000
4	0,000	0,400	0,000	0,267	0,000	0,214	0,056	0,000	0,000

5	0,143	0,133	0,467	0,000	0,333	0,321	0,000	0,000	
6	0,429	0,267	0,400	0,133	0,200	0,071	0,222	0,500	
7	0,179	0,067	0,000	0,067	0,267	0,000	0,000	0,250	
8	0,071	0,000	0,067	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	
9	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	
10	0,071	0,033	0,000	0,167	0,000	0,143	0,167	0,125	
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,179	0,056	0,125	
12	0,000	0,033	0,067	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	
13	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
14	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Dpro_M	N	14	13	15	13	14	15	10	8
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,267	0,000	0,214	0,000	0,200	0,125	0,125
3	0,357	0,000	0,100	0,115	0,357	0,000	0,050	0,125	0,125
4	0,214	0,308	0,333	0,000	0,143	0,333	0,050	0,250	0,250
5	0,107	0,154	0,167	0,192	0,036	0,400	0,250	0,000	0,000
6	0,107	0,077	0,033	0,346	0,000	0,100	0,250	0,125	0,125
7	0,036	0,154	0,000	0,192	0,071	0,067	0,000	0,125	0,125
8	0,071	0,154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,063	0,063
9	0,000	0,038	0,100	0,038	0,036	0,000	0,050	0,000	0,000
10	0,071	0,000	0,000	0,038	0,000	0,100	0,050	0,125	0,125
11	0,036	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,000	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063
13	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Dpro_N	N	11	12	15	15	15	11	9	8
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,364	0,000	0,313
2	0,000	0,000	0,067	0,200	0,000	0,273	0,000	0,438	0,438
3	0,091	0,000	0,133	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,182	0,167	0,400	0,467	0,067	0,182	0,333	0,000	0,000
5	0,364	0,417	0,200	0,000	0,067	0,000	0,111	0,250	0,250
6	0,273	0,417	0,133	0,033	0,567	0,000	0,167	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,067	0,067	0,033	0,000	0,333	0,000	0,000
8	0,091	0,000	0,000	0,000	0,067	0,182	0,056	0,000	0,000
9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
Dpro_O	N	14	12	12	12	15	14	10	8
1	0,000	0,000	0,000	0,042	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,417	0,467	0,000	0,100	0,125	0,125
3	0,000	0,000	0,000	0,167	0,133	0,071	0,700	0,000	0,000
4	0,071	0,000	0,083	0,000	0,267	0,286	0,000	0,000	0,000
5	0,571	0,125	0,375	0,000	0,000	0,393	0,000	0,438	0,438
6	0,214	0,583	0,333	0,250	0,033	0,071	0,100	0,250	0,250
7	0,071	0,167	0,083	0,042	0,033	0,071	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000
9	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,188	0,188

10	0,071	0,000	0,000	0,083	0,000	0,071	0,000	0,000
11	0,000	0,000	0,042	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
12	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

APÊNDICE C – Análise de Variância Molecular (AMOVA) hierarquizada quanto à distribuição de regiões geográficas e fitofisionomias de Mata Atlântica para as populações de *D. prosaltans*

Tabela 1. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com hierarquia segundo a distribuição de regiões geográficas das populações de *D. prosaltans* (Agrupamento 1 [NORDESTE] = CUR e ADB; Agrupamento 2 [SUDESTE] = NGR, MAT, SDC, PIC e VIT; Agrupamento 3 [SUL] = ELD). DF = *degrees of freedom* (graus de liberdade); SS = *sum of squares* (soma dos quadrados); VC = *variance component* (componente de variância); %PV = porcentagem de variação total.

Fonte	DF	SS	VC	%PV
Entre Agrupamentos	2	79,189	-0,05686	-2,65%
Entre Populações dentro dos Agrupamentos	5	243,643	0,43560	20,30%
Dentro das Populações	890	1572,600	1,76697	82,35%
Total	897	1895,432	2,14571	100%

Tabela 2. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com hierarquia segundo a distribuição de fitofisionomias de Mata Atlântica das populações de *D. prosaltans* (Agrupamento 1 [Floresta Ombrófila Aberta] = CUR; Agrupamento 2 [Formação Pioneira] = ADB; Agrupamento 3 [Floresta Estacional Semidecidual] = NGR, MAT e ELD; Agrupamento 4 [Floresta Ombrófila Densa] = SDC, PIC e VIT). DF = *degrees of freedom* (graus de liberdade); SS = *sum of squares* (soma dos quadrados); VC = *variance component* (componente de variância); %PV = porcentagem de variação total.

Fonte	DF	SS	VC	%PV
Entre Agrupamentos	3	83,974	-0,05021	-2,33%
Entre Populações dentro dos Agrupamentos	4	238,858	0,43956	20,38%
Dentro das Populações	890	1572,600	1,76697	81,94%
Total	897	1895,432	2,15632	100%