



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Divergência interpopulacional e interespecífica e processo seletivo atuante nos genes ortólogos a *fruitless* e *Odysseus* em *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae*.

Wellington dos Santos

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Wellington dos Santos

**Divergência interpopulacional e interespecífica e processo seletivo atuante
nos genes ortólogos a *fruitless* e *Odysseus* em *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae*.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Marcia Aparecida Carareto

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

UNESP

2014

Santos, Wellington dos.

Divergência interpopulacional e interespecífica e processo seletivo atuante nos genes ortólogos a fruitless e Odysseus em *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae* / Wellington dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2014

60 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Claudia Marcia Aparecida Carareto

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

1. Genética. 2. Inseto – Filogenia. 3. *Drosófila* - Genética. 4. *Drosófila mojavensis*. 5. *Drosófila arizonensis*. I. Carareto, Claudia Marcia Aparecida. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.7:576.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Wellington dos Santos

Divergência interpopulacional e interespecífica e processo seletivo atuante nos genes ortólogos a *fruitless* e *Odysseus* em *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae*.

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

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Claudia Marcia Aparecida Carareto

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Prof. Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Francisco Langeani Neto

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

16 de Maio de 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com bolsa de mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*À minha mãe Rose (in memoriam). Para sempre mantereí a chama de sua existência viva
dentro de mim.*

Agradecimentos

As palavras soam vazias no momento de escrever estes agradecimentos, simplesmente por não parecerem suficientes para expressar toda gratidão que sinto por todos aqueles que estiveram presentes durante minha jornada até aqui. Muitas pessoas mereceriam ser citadas neste pequeno espaço e provavelmente são muitas as que talvez não poderei citar, não só aquelas que foram fundamentais para a realização deste trabalho, mas também todas as que possibilitaram a construção da minha vida pessoal e profissional.

Primeiramente, devo um profundo agradecimento à **Profª Drª Claudia Marcia Aparecida Carareto**, não apenas pela orientação e exemplo de profissionalismo e dedicação mas, sobretudo, por ser uma parceira durante o percurso, me ensinando e me transformando, depositando confiança em meu trabalho mesmo quando eu não acreditei que conseguiria realiza-lo.

Aos amigos do Laboratório de Evolução Molecular, **Adriana, Elaine, Elias e Maryanna**, sem os quais nenhuma etapa desse trabalho seria possível. “**Dri**”, agradeço não só por ter sido minha condutora na bancada, me ensinando detalhadamente todas as técnicas e estando disposta a me ajudar sempre que precisei, mas também e, sobretudo, por segurar minha mão e me indicar um caminho em um dos momentos mais difíceis dessa jornada. **Elaine**, obrigado pela ajuda na resolução de todos meus problemas experimentais, por puxar minha orelha sempre que necessário – que não foram poucas vezes – e por não desistir de mim em todos esses momentos. **Elias**, obrigado por ser meu tutor durante meus primeiros passos dentro do laboratório e por me ajudar nos tropeços durante todos os passos seguintes.

À **Profª Drª Lilian Castiglioni**, por todo conhecimento transmitido durante meus anos de graduação e por se dispor, em um dia de suas férias, a me levar e me indicar à Profª Claudia. Obrigado também pelas palavras de conforto e conselhos no fim desta jornada.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelo empenho dedicado ao programa e por compartilharem seus conhecimentos. Em especial à **Profª Drª Eliane Gonçalves de Freitas**, por todo apoio e compreensão junto à coordenação do programa.

Agradeço a todos **funcionários** deste instituto, pela ajuda, quando necessária, e por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis.

À minha **família**, agradeço pelo apoio e conforto quando retornava ao lar. A todos meus **tios e tias**, um imenso obrigado pelos momentos felizes e pela companhia. Agradeço especialmente minha avó **Maria**, por cuidar de mim e fazer parte da formação do meu caráter, e também por todo o carinho com que me acolhe.

Um agradecimento imensamente especial à família **Batista**, da qual de maneira “intrusiva” me considero parte. Agradeço por me acolherem na “cidade grande” e estarem presentes durante todo esse percurso. **Luciana**, obrigado por me acolher sob seu teto quando precisei, obrigado pelas broncas e pelos almoços, jantares, cafês da tarde, cafês da manhã, etc... À pequena princesinha **Isabela**, obrigado por me aceitar como tio e por todos os abraços calorosos e sinceros que só as crianças podem oferecer. E, sobretudo, agradeço ao **Marcos**, não apenas pela imensa ajuda durante todo meu crescimento acadêmico, do qual fez parte ativamente mas, principalmente, obrigado por ser um exemplo em todos os aspectos para mim.

À **Camila**, mais do que uma companheira de laboratório, uma amiga que sem esforço algum é amada por todos. Agradeço profundamente pelas palavras de conforto e apoio, por todo o carinho e confiança, pelos sorrisos fáceis e por irradiar alegria por todos os lugares em que está presente.

Aos meus colegas da FAMERP, obrigado por me iniciarem na biologia molecular. Ao **Prof. Dr. Sidney Pinheiro Junior** pela oportunidade no Departamento de Biologia Molecular e, especialmente, obrigado à **Marcela, Greiciane e Camila**, amigas maravilhosas com as quais pude buscar suporte e apoio, e pelas quais meu carinho e amizade jamais diminuirão.

A todos meus **amigos**, um singelo obrigado por fazerem parte do meu mundo, por serem meu apoio e minha base.

Por fim, agradeço à “**Dona Rose**”, minha querida mãe, que enfrentou inúmeras batalhas para que eu alçasse voo. Obrigado por me aceitar como filho quando todas as circunstâncias lhe impulsionavam o contrário. Qualquer palavra que escreva aqui será insuficiente para expressar toda gratidão que sinto por você e, mais ainda, toda saudade e dor de sua ausência.

*“Assim perguntamos sem parar,
Até um punhado de terra
Cobrir a nossa boca
Mas isto será uma resposta?”*

Heinrich Heine, *Lázaro* (1854)

RESUMO

A despeito de ter sido intensivamente estudado, muitas das questões sobre o processo de especiação ainda permanecem sem respostas, principalmente em relação às alterações genéticas que conduzem ao isolamento reprodutivo. Neste trabalho foram analisados dois genes candidatos a genes de especiação, *fruitless (fru)* e *Odysseus (OdsH)*, em duas espécies cactofílicas estreitamente relacionadas de *Drosophila*, *D. mojavensis* e *D. arizonae*, que divergiram de um ancestral comum a menos que 1 milhão de anos atrás. O gene *fru* exerce um papel predominante na especificação do potencial para o comportamento sexual de machos de *Drosophila*, podendo influenciar no isolamento reprodutivo pré-zigótico. O gene *OdsH*, que contém um homeodomínio que sofreu rápida evolução no subgrupo *melanogaster*, associa-se a esterilidade híbrida em *Drosophila*. Foram amplificados e sequenciados fragmentos destes genes em quatro linhagens de *D. mojavensis* e duas de *D. arizonae* e realizadas análises de diversidade, testes de seleção e análises filogenéticas. Ambos os genes apresentaram baixa diversidade entre as sequências das duas espécies, o que está de acordo com a divergência recente entre elas. Os testes de seleção realizados para as sequências de ambos os genes revelaram que os fragmentos analisados estão sob seleção purificadora, o que está de acordo com dados em outras espécies de *Drosophila* considerando o gene *fru*, mas é diferente do observado no subgrupo *melanogaster* para o gene *OdsH*, onde o gene mostra sinal de seleção positiva. As relações filogenéticas reconstruídas para as sequências dos dois genes, bem como redes de haplótipos permitiram fazer inferências sobre a história evolutiva das espécies e suas populações. Análises de Neighbor Joining e de Máxima Verossimilhança agruparam todas as sequências de *D. mojavensis* em um clado monofilético, como também as sequências de cada uma de suas linhagens corroborando a classificação de subespécies para as populações em que foram coletadas. Contudo, a monofilia de *D. arizonae* dependeu do método de reconstrução filogenética, também em concordância com dados da literatura. Adicionalmente, as relações entre as sequências reconstruídas pelo programa Network permitiu formular uma hipótese de especiação peripátrica, alternativa às existentes para a origem de *D. mojavensis* a partir de seu ancestral comum com *D. arizonae*.

PALAVRAS-CHAVE: *Drosophila*. *fruitless*. *Odysseus*. Especiação. Isolamento reprodutivo.

ABSTRACT

Despite having been intensively studied, many questions about the process of speciation remain unanswered, especially regarding genetic changes that lead to reproductive isolation. In this study we analyzed two genes candidates for speciation genes, *fruitless* (*fru*) and *Odysseus* (*OdsH*) in two closely related cactophilic *Drosophila* species, *D. mojavensis* and *D. arizonae*, which diverged from a common ancestor less than 1 million years ago. The *fru* gene plays a predominant role in the specification of the potential for sexual behavior of *Drosophila* male, thus influencing the pre-zygotic isolation. *OdsH*, a gene with a homeodomain that has undergone rapid evolution in the *melanogaster* subgroup of species, has been associated to hybrid sterility in *Drosophila*. Sequences of these two genes, known to be variable in *Drosophila* and other insects, were amplified and sequenced in four strains of *D. mojavensis* and two of *D. arizonae*. Analyses of diversity, selection tests and phylogenetic analyses were performed. Both genes show low diversity between the sequences from the two species, which is consistent with the recent divergence between them. The selection tests performed for the sequences showed that the fragments analyzed of both genes are under purifying selection, which is consistent with data in other *Drosophila* species considering the *fru* gene, but is different from data for *OdsH* in species of the subgroup *melanogaster*, in which is under positive selection. Phylogenetic relationships reconstructed for the sequences of the two genes, as well as networks of haplotypes allowed to make inferences about the evolutionary history of species and populations. Analyses of Neighbor Joining and Maximum Likelihood clustered all the sequences of *D. mojavensis* in a monophyletic clade, as well as the sequences of each of its strains, reinforcing the classification of subspecies for the populations from where they were collected. However, the monophyly of *D. arizonae* depended on the method of phylogenetic reconstruction, also in agreement with literature. Additionally, the relationships between the sequences reconstructed by Network allowed formulate an alternative hypothesis to the existing ones, of peripatric speciation of *D. mojavensis* from their common ancestor with *D. arizonae*.

KEY WORDS: *Drosophila*. *fruitless*. *Odysseus*. Speciation. Reproductive isolation.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. O gene <i>fruitless</i>	13
1.2. O gene <i>Odysseus</i>	15
1.3. As espécies <i>D. mojavensis</i> e <i>D. arizonae</i>	16
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material Biológico	24
3.2. Análises Moleculares	25
3.2.1. Caracterização dos genes <i>fru</i> e <i>OdsH</i>	25
3.2.2. Extração de DNA, amplificação de sequências <i>fru</i> e <i>OdsH</i> e sequenciamento	25
3.3. Análises Evolutivas	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Análises de diversidade das sequências <i>fru</i>	30
4.2 Análises de diversidade das sequências <i>OdsH</i>	32
4.3. Pressões Seletivas	33
4.4. Relações Filogenéticas	34
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. APÊNDICE.....	58
Apêndice A.....	59
Apêndice B.....	60

1. Introdução

A evolução do isolamento reprodutivo entre diferentes populações, resultando em especiação, pode ser considerada um dos eventos chave na evolução dos organismos. Entender as bases genéticas da especiação e as forças responsáveis por sua origem é um dos objetivos da Biologia Evolutiva. Contudo, as alterações gênicas e os mecanismos que levam à evolução do isolamento reprodutivo permanecem, em grande parte, desconhecidos, principalmente a relação entre os genes envolvidos com o processo, bem como o tipo de seleção atuante sobre os mesmos (NOSIL; SCHLUTER, 2011; SCHLUTER, 2009).

A evolução do isolamento reprodutivo pode incluir a ação de fatores que impedem o cruzamento ou a formação de zigotos entre populações divergentes - isolamento pré-zigótico - ou se dar por fatores que agem após a fertilização, ocasionando esterilidade ou redução da viabilidade dos descendentes híbridos - isolamento pós-zigótico (COYNE, 2001; DOBZHANSKY, 1937). Entender a contribuição de diferentes componentes do isolamento reprodutivo é uma questão crucial para a compreensão do processo de especiação. Neste contexto, identificar os genes envolvidos no isolamento e estudar seus efeitos nas características dos organismos relacionadas ao acasalamento ou ao desenvolvimento é fundamental para entendermos os fatores envolvidos na origem de novas espécies. Avanços nessa área têm sido obtidos nos últimos anos, à medida que dados genômicos foram sendo disponibilizados, bem como estudos de evolução molecular têm permitido identificar e caracterizar alguns dos genes envolvidos com o isolamento reprodutivo (ORR; MASLY; PRESGRAVES, 2004).

Apesar de ser aceito atualmente que o isolamento reprodutivo seja uma característica multigênica, alguns autores têm sugerido a existência de genes específicos presumivelmente envolvidos na origem deste isolamento (ANDRÉS; MAROJA; HARRISON, 2008; NOSIL; SCHLUTER, 2011; ORR; MASLY; PRESGRAVES, 2004). Tais candidatos a “genes de especiação”, frequentemente relacionados à reprodução, mostram altas taxas de divergência quando comparados às de genes constitutivos não relacionados à reprodução. Essa maior divergência seria decorrente de seleção positiva mediada por seleção sexual e/ou conflito sexual (CLARK; SWANSON, 2005; GERRARD; MEYER, 2007; SWANSON; VACQUIER, 2002; SWANSON et al., 2004). Dentre os candidatos a genes de especiação em *Drosophila* podemos destacar os genes *fruitless* (*fru*) e *Odyseus* (*OdsH*).

1.1. O gene *fruitless*

Espécies do gênero *Drosophila* têm sido largamente utilizadas em estudos evolutivos e, particularmente, *Drosophila melanogaster* é desde muito tempo o principal organismo modelo para estudos de especiação. O comportamento de corte de *Drosophila* é largamente inato, e inclui uma série de comportamentos ordenados envolvendo estímulos visuais, olfatórios, gustativos, auditivos e táteis, os quais permitem o reconhecimento entre machos e fêmeas e possibilitam o progresso da corte (DICKSON, 2008; KIMURA et al., 2008; VILLELLA; HALL, 2008). O comportamento do macho em *D. melanogaster* é um dos principais modelos biológicos utilizados para entender a corte em espécies do gênero. Tal comportamento é geneticamente dependente de dois genes que codificam proteínas terminais em uma cadeia hierárquica de determinação do sexo: *fruitless* (*fru*) e *doublesex* (*dsx*). Juntos, esses dois genes coordenam o desenvolvimento de quase todos os aspectos sexuais somáticos, incluindo o potencial para comportamento sexual do macho (BAKER; TAYLOR; HALL, 2001; DICKSON, 2008; PAN; ROBINETT; BAKER, 2011).

O gene *fru* apresenta quatro regiões principais (Figura 1): domínio sexo específico, domínio de dimerização (BTB), região conectora e domínio de ligação ao DNA - *zinc-finger* (DEMIR; DICKSON, 2005). Esse gene se caracteriza por produzir um conjunto de transcritos diferentes, via *splicing* alternativo, tanto sexo específicos, como independentes do sexo. Os transcritos sexo específicos, bem como aqueles não relacionados ao sexo, são produzidos a partir de quatro promotores (P1 a P4), mas as variantes sexo específicas são originadas somente a partir de P1. Além disso, *splicing* alternativo na extremidade 3' promove a síntese de um conjunto complexo de transcritos (ANAND et al., 2001; BERTOSSA; VAN DE ZANDE; BEUKEBOOM, 2009; GAILEY et al., 2006; SONG et al., 2002)

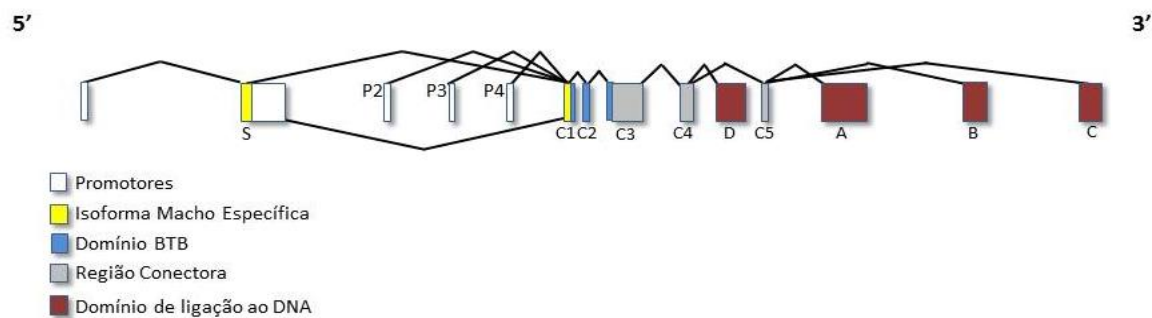


Figura 1. Estrutura e padrão de *splicing* do gene *fru* em *D. melanogaster*. Os transcritos de P1 são sexo específicos, resultando em isoformas macho específicas (em amarelo) e a inclusão de um códon de parada em transcritos fêmea específicos. *Splicing* alternativo na extremidade 3' produzem diferentes transcritos com diferentes domínios de ligação ao DNA (A, B, C e D). Os exons C1-C5 são comuns para todos os transcritos, exceto para o transcrito contendo o éxon D; P1-P4: promotores. (adaptado de Parker et al., 2013).

A ativação de neurônios que desencadeiam o comportamento de corte no macho está associada à expressão do gene *fru* nessas células (PAN; ROBINETT; BAKER, 2011). Mutantes *fru* apresentam disfunção no comportamento de corte e na orientação sexual, sendo que alguns alelos com mutações de grandes efeitos podem resultar na perda total do comportamento de corte, enquanto outros causam diversas disfunções em passos específicos desse comportamento (ANAND et al., 2001; LEE; HALL, 2001; RYNER et al., 1996). Contudo, tais mutantes são normais em relação a comportamentos não sexuais (BAKER; TAYLOR; HALL, 2001). Tais dados sugerem que *fru* seja necessário para o comportamento sexual do macho (DEMIR; DICKSON, 2005).

Resultados em diferentes insetos têm mostrado que a região N-terminal e a região conectora são as que apresentam os maiores graus de divergência dentro da sequência gênica de *fru*, o que sugere que possam estar associadas ao comportamento de corte (BERTOSSA; VAN DE ZANDE; BEUKEBOOM, 2009; GAILEY et al., 2006). Além disso, Sobrinho e Brito (2010) demonstraram em espécies da mosca-das-frutas *Anastrepha* que alguns códons da região conectora de *fru* evoluíram sob seleção positiva, sugerindo uma evolução adaptativa que possa estar relacionada à seleção sexual e/ou conflito resultante de seu envolvimento com o comportamento sexual do macho.

Em *Drosophila*, o gene *fru* apresenta grande conservação, embora o grau dessa conservação seja diferente ao longo do gene. Por exemplo, enquanto o domínio BTB é altamente conservado, apresentando alta identidade entre as espécies, a região conectora apresenta maior divergência (PARKER et al., 2013). Comparando sequências de *fru* em 18

espécies de *Drosophila*, Parker et al. (2013) demonstraram que a totalidade da região codificante do gene evoluiu sob ação de seleção purificadora, embora tenham encontrado indícios de seleção positiva em códons do domínio *zinc-finger*, diferentemente dos resultados encontrados no gênero *Anastrepha* (SOBRINHO; BRITO, 2010).

1.2. O gene *OdsH*

O gene *OdsH* está localizado no cromossomo X e é formado por quatro éxons, dos quais os éxons 2 e 3 contêm um domínio homeobox (Figura 2). *OdsH* foi primeiramente identificado como um dos genes responsáveis pela esterilidade híbrida de machos em cruzamentos envolvendo *Drosophila mauritiana* e *Drosophila simulans*. Em *D. melanogaster*, *OdsH* codifica para um transcrito testículo específico que pode ser detectado nos estágios iniciais da espermatogênese. A perda de expressão de *OdsH* ocasiona defeitos na fertilidade, possivelmente por afetar a espermatogênese (LU et al., 2010; SUN; TING; WU, 2004). Entre as anormalidades destacam-se redução do número de células da linhagem germinativa, incluindo espermatogônias e espermátócitos, como observado em machos mutantes nulos para esse gene (CHENG et al., 2012). Como a introgressão de um alelo de *OdsH* de *D. mauritiana* em um *background* de *D. simulans* resultou em perda de expressão do gene e ocorrência de esterilidade no macho híbrido, os autores sugeriram que esse gene estivesse relacionado ao isolamento pós-zigótico (TING et al., 1998, 2004).

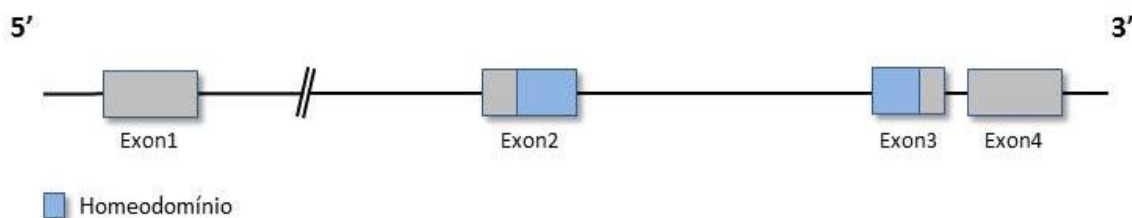


Figura 2. Esquema do gene *OdsH* de acordo com Ting et al. (1998). O gene é constituído por quatro éxons, contendo o homeodomínio (azul), o qual apresenta alta divergência entre as espécies do subgrupo *melanogaster* em *Drosophila*.

O gene *OdsH* surgiu há aproximadamente 5 milhões de anos atrás, a partir da duplicação de seu ancestral *unc-4*, um gene que codifica um fator de transcrição que apresenta

função somática no tecido nervoso (TING et al., 2004). Considerável divergência tem sido observada entre sequências de *OdsH* em espécies do complexo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana*) do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila*, especialmente dentro do homeodomínio do gene. Esse domínio apresenta taxas de substituição na sequência de aminoácidos muito mais elevadas do que seus ortólogos em outros organismos. Uma vez que homeodomínios são conhecidamente uma família conservada de fatores de transcrição, os quais regulam padrões de desenvolvimento, a rápida evolução de *OdsH* tem sido atribuída à aquisição de novas funções nos testículos (TING et al., 1998).

A análise do processo seletivo atuante no gene *fru*, relacionado ao comportamento sexual do macho, e no gene *OdsH*, relacionado à esterilidade do híbrido, pode propiciar melhor compreensão dos processos evolutivos relacionados ao isolamento reprodutivo. Assim, este trabalho teve por objetivo analisar esses dois genes em duas espécies irmãs do grupo *repleta* de *Drosophila* - *Drosophila mojavensis* Patterson e Crow, 1940, e *Drosophila arizonae* Ruiz, Heed e Wasserman, 1990, ainda não estudadas sob esses aspectos.

1.3. As espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*

Drosophila mojavensis e *D. arizonae* são espécies cactofílicas endêmicas de áreas áridas do sudoeste dos Estados Unidos e México. Pertencentes ao complexo *mulleri* do grupo *repleta* do subgênero *Drosophila* as duas espécies apresentam algumas características que as tornam um par de espécies adequado para o estudo do processo de especiação. Além de terem divergido a não mais que 0,99-0,66 milhões de anos (REED; NYBOER; MARKOW, 2007), essas espécies apresentam variação no grau de isolamento reprodutivo pré e pós-zigótico. Embora não tenha sido encontrada evidência de que possam ser formados híbridos na natureza, esse isolamento incompleto tem sido observado em laboratório (JENNINGS; ETGES, 2010; MACHADO et al., 2007; RUIZ; HEED; WASSERMAN, 1990).

A distribuição das espécies é parcialmente sobreposta originando populações alopatricas e simpátricas (Figura 3), *Drosophila arizonae* pode ser encontrada no sudoeste do Novo México, sul do Arizona até o sul do Deserto de Sonora, por todo o oeste e sudeste do México até a Guatemala e possivelmente na Baja Califórnia (México). Populações de *D. mojavensis*, por outro lado, são encontradas no Deserto de Mojave no sul da Califórnia, na

ilha de Santa Catalina (costa da Califórnia), no Deserto de Sonora, ao sul da Califórnia (EUA) e na Baja Califórnia (México), como também na costa de Sonora e Sinaloa (México), onde ocorre em simpatria com *D. arizonae* (MARKOW; HOCUTT, 1998; MARKOW; O'GRADY, 2006; REED; NYBOER; MARKOW, 2007; RUIZ; HEED, 1988; WASSERMAN; KOEPFER, 1977).

Drosophila mojavensis apresenta diferenciação genética, comportamental, ecológica e morfológica que levaram Pfeiler et al. (2009) a dividir suas populações em quatro subespécies (Figura 3): *D. mojavensis mojavensis*, encontrada no Deserto de Mojave; *D. mojavensis wrigleyi*, encontrada exclusivamente na ilha de Santa Catalina, na costa da Califórnia; *D. mojavensis sonorensis*, encontrada no Deserto de Sonora no México e no sul do Arizona e *D. mojavensis baja*, encontrada na península de Baja Califórnia (FELLOWS; HEED, 1972; MARKOW; HOCUTT, 1998; RUIZ; HEED, 1988).

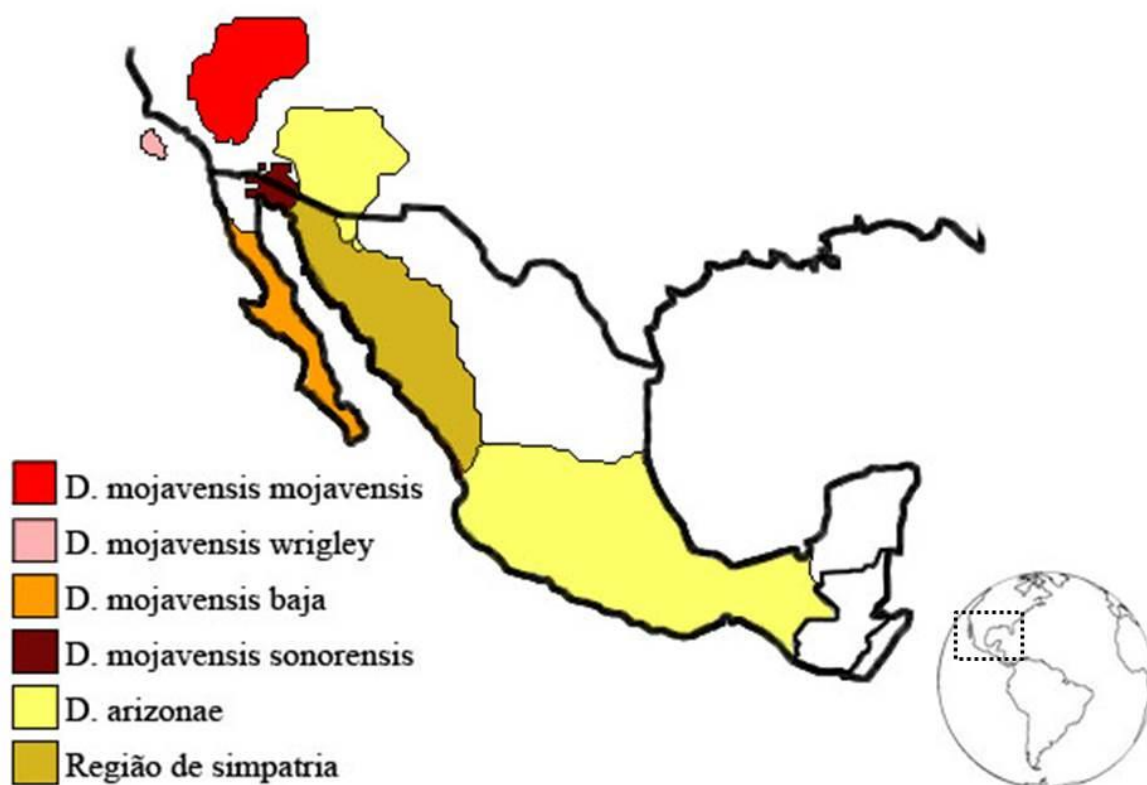


Figura 3. Distribuição geográfica das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*. As populações geográficas de *D. mojavensis* têm sido consideradas como subespécies diferentes (Adaptado de Markow & Hocutt, 1998).

As quatro principais regiões onde as subespécies de *D. mojavensis* podem ser encontradas estão isoladas por áreas onde não ocorrem plantas hospedeiras (REED et al.,

2007), o que potencialmente reduz o fluxo gênico. Cada subespécie utiliza predominante ou exclusivamente um tipo de cacto hospedeiro local (FELLOWS; HEED, 1972; JENNINGS; ETGES, 2010; MARKOW; HOCUTT, 1998; RUIZ; HEED, 1988). *Drosophila. mojavenensis sonorensis* utiliza principalmente o cacto “órgão de tubo” (*Stenocereus thurberi*); *D. mojavenensis mojavenensis* utiliza o “cacto-barril” (*Ferocactus cylindraceus*); *D. mojavenensis wrigleyi* utiliza o cacto do tipo “pera-espinhosa” (*Oppuntia* spp.) e *D. mojavenensis baja* utiliza exclusivamente o cacto “agria” (*S. gummosus*), apesar da presença de todos os outros cactos utilizados pelas outras subespécies (MARKOW e HOCUTT, 1998; REED et al., 2007; RUIZ e HEED, 1988). Estes cactos diferem em composição química e podem estar desempenhando papel importante na divergência de *D. mojavenensis* (REED et al., 2007).

Dois tipos de evidências genéticas apontam para duas origens distintas para *D. mojavenensis* e *D. arizonae* a partir de um ancestral comum: análises de marcadores moleculares e de inversões cromossômicas. Dados provenientes da análise de inversões cromossômicas (RUIZ; HEED; WASSERMAN, 1990) e de sequências do gene *Adh* (MATZKIN; EANES, 2003) suportam a hipótese de que *D. mojavenensis* e *D. arizonae* especiarão como populações alopátricas separadas pelo Golfo da Califórnia: a população da Península de Baja teria dado origem a *D. mojavenensis*, e a população do continente teria originado *D. arizonae*. Embora seja um risco fundamentar hipóteses de origem de uma espécie pela distribuição de plantas hospedeira, já que suas distribuições atuais são dependentes de eventos históricos, a ocorrência do cacto “agria”, de preferência de *D. mojavenensis*, apenas na Baja Califórnia, além dos outros três tipos de hospedeiros, secundários na preferência, pode ser usada como suporte da hipótese de origem de *D. mojavenensis* nessa região (JOHNSON 1980; HEED 1982, apud REED et al. 2007).

Reconstruções filogenéticas baseadas em sequências do gene mitocondrial que codifica para a enzima citocromo oxidase 1 (COI) propiciam um cenário diferente do acima exposto, que não suporta a origem de *D. mojavenensis* na Baja Califórnia. Para Reed et al. (2007), a explicação mais plausível para a origem de *D. mojavenensis* é que tenha ocorrido no continente com uma linhagem inicial colonizando o deserto de Mojave e outra o Deserto de Sonora, com posterior dispersão para Península Baja a partir do Deserto de Sonora. Quanto à origem de *D. arizonae* os autores argumentam que se *D. mojavenensis* divergiu no continente, as duas espécies teriam divergido simpatricamente ou *D. arizonae* teria divergido em outro lugar ainda não determinado.

Como citado anteriormente, as populações de *D. mojavenensis* são diferenciadas geneticamente o que levou a caracterizá-las como quatro subespécies (*D. m. mojavenensis*, *D.*

m. wrigleyi, *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*). Existe um isolamento sexual incipiente entre essas populações, assimétrico encontrado principalmente entre *D. mojavenensis sonorensis* e *D. mojavenensis baja*. Especificamente, fêmeas do Deserto de Sonora discriminam negativamente machos provenientes da Baja Califórnia. Apesar de não ter sido observado qualquer isolamento pós-zigótico entre populações de *D. mojavenensis*, a divergência interpopulacional em diversas características, tais como tempo de desenvolvimento e tamanho do tórax (ETGES, W.; HEED, 1987; ETGES, W. J., 1993), sugere que a diferenciação genética entre as populações pode ser, de fato, extensa (MARKOW; HOCUTT, 1998).

Drosophila arizonae não tem sido extensivamente estudada como *D. mojavenensis* no que refere às relações genéticas entre diferentes populações ou isolamento reprodutivo intraespecífico incipiente. Machado et al. (2007), contudo, encontraram forte evidência de estruturação genética entre diferentes populações de *D. arizonae*, em análises de sequências de múltiplos locos nucleares. Além disso, há também evidência filogenética, baseada em sequências de DNA mitocondrial (gene *CoI*) apontando para uma divisão entre populações do noroeste do México e sudoeste dos Estados Unidos das populações do sul do México (REED; NYBOER; MARKOW, 2007).

A recente divergência, aliada à diferenciação genética entre populações, e a distribuição parcialmente sobreposta das duas espécies tornou *D. mojavenensis* e *D. arizonae* um excelente par de espécies para estudos de especiação, o qual tem sido foco de várias pesquisas relacionadas ao isolamento reprodutivo. Estas espécies apresentam isolamento pré e pós-zigótico forte, porém incompleto, e em laboratório pelo menos alguns híbridos adultos conseguem atingir a idade adulta (BONO; MARKOW, 2009; JENNINGS; ETGES, 2010; KELLEHER; MARKOW, 2007; REED et al., 2008; WASSERMAN; KOEPFER, 1977).

O deslocamento de caráter reprodutivo entre estas espécies foi demonstrado primeiramente por Wasserman e Koepfer (1977), que mediram o grau de discriminação entre populações alopátricas e simpátricas: populações de *D. mojavenensis* e *D. arizonae* em simpatria apresentaram maior grau de isolamento do que populações alopátricas. Isto evidencia reforço do isolamento entre as populações simpátricas, que atuaria aumentando o isolamento pré-zigótico. Estudos subsequentes demonstraram que o isolamento reprodutivo total (isolamento pré-zigótico e isolamento pós-zigótico) entre linhagens simpátricas é grande, e tem sido suficiente para manter a integridade das espécies na natureza, uma vez que não há evidência de introgressão recente entre as espécies (BONO; MARKOW, 2009; MACHADO et al., 2007; REED et al., 2007).

Os dados acima apresentados indicam que as duas espécies encontram-se em diferentes etapas do processo de divergência. Sabendo-se que a seleção positiva é um dos fatores associados à diferenciação de populações, e que genes de especiação são marcadores por excelência para se estudar diferenciação intra e interespecífica, neste estudo utilizamos dois deles - *fru* e *OdsH* - para avaliar o grau de divergência e o processo seletivo atuante, na diversificação das subespécies de *D. mojavensis* e populações de *D. arizonae*.

2. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi analisar a diferenciação interpopulacional e interespecífica de *D. mojavensis* e *D. arizonae* utilizando os genes *fru* e *OdsH*, bem como investigar a natureza do processo seletivo atuante nessa diferenciação.

Objetivos Específicos:

- I. Avaliar o grau de diversidade genética entre as populações e espécies por meio de índices de diversidade nucleotídica e haplotípica.
- II. Testar a hipótese de ação de seleção positiva atuante na divergência interpopulacional e interespecífica.
- III. Reconstruir as relações filogenéticas intra e interespecíficas entre as sequências amplificadas.

3. Material e Métodos

3.1. Material Biológico

As linhagens das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae* utilizadas no presente trabalho foram obtidas a partir de coleções do “UC San Diego *Drosophila* Stock Center” (<https://stockcenter.ucsd.edu/info/welcome.php>) (Tabela 1). As linhagens estão sendo mantidas em frascos de vidro em câmara fechada com temperatura e iluminação controlada em meio de cultura contendo ágar, extrato de levedura, meio de cactos e fungicida. As linhagens foram escolhidas com base em estudos que identificaram as áreas de alopatria e simpatria das duas espécies (veja Figura 3), bem como pelo grau de diferenciação genética e isolamento reprodutivo das diferentes populações (ETGES, W. J.; TRIPODI, 2008; JENNINGS; ETGES, 2010; KOEPFER, 1987; MARKOW, 1981; PFEILER et al., 2009; WASSERMAN; KOEPFER, 1977).

Tabela 1. Linhagens de *D. mojavensis* e de *D. arizonae* utilizadas no estudo.

Espécie	Linhagem	Local da Coleta	Ano da Coleta	Símbolo
<i>D. mojavensis wrighti</i>	15081-1352.22	Catalina Island, California - U.S.A.	2002	moj22
<i>D. mojavensis mojavensis</i>	15081-1352.01	Anza Borrego Desert, California - U.S.A	1990-1996	moj01
<i>D. mojavensis baja</i>	15081-1351.30	Punta Prieta, Baja California - Mexico	2008	moj30
<i>D. mojavensis sonorensis</i>	15081-1352.26	Agiabampo Bay, Sonora - Mexico	2003	moj26
<i>D. arizonae</i>	15081-1271.18	Las Bocas, Sonora - Mexico	1996	ari18
<i>D. arizonae</i>	15081-1271.17	Metztitlan, Hidalgo - México	1997	ari17

3.2. Análises Moleculares

3.2.1. Caracterização dos genes *fru* e *OdsH*

As sequências depositadas dos genes *fru* e *OdsH* descritas e caracterizadas em *D. melanogaster* foram utilizadas para a busca das sequências gênicas ortólogas no genoma de *D. mojavensis* por meio da ferramenta BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (ALTSCHUL et al., 1990).

A região gênica de *fru* [Gene ID: 42226] é composta por 131.314 pb em *D. melanogaster*, e nela foram identificadas as regiões de introns e exons, bem como os diferentes transcritos encontrados no GenBank. A região gênica de *Odysseus* [Gene ID: 32758] apresenta 22.939 pb em *D. melanogaster* e é composta por 4 éxons. As sequências descritas de *D. melanogaster* foram utilizadas como referência para a busca das sequências de *fru* e *OdsH* no genoma de *D. mojavensis* utilizando o programa BLASTn (ALTSCHUL; GISH; MILLER, 1990).

3.2.2. Extração de DNA, amplificação de sequências *fru* e *OdsH* e sequenciamento

DNA de amostras de 30 moscas de cada linhagem foi extraído conjuntamente utilizando o método fenol-clorofórmio (JOWETT, 1986). Pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificar as regiões de interesse utilizando a ferramenta PrimerQuest® no site IDT (Integrated DNA Technologies: <http://www.idtdna.com/Primerquest>) o qual utiliza algoritmos para encontrar a melhor região para a construção de oligonucleotídeos iniciadores, levando em consideração as condições mais adequadas para o desenho desses oligonucleotídeos.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificar a região do éxon C3 em *fru* e do homeodomínio de *OdsH* (Tabela 2). Tal região apresenta maior diversidade do que outras regiões do gene em diferentes táxons de Diptera (GAILEY et al., 2006; SALVEMINI et al., 2013) e foi demonstrado por Sobrinho e Brito (2010) a ação de seleção positiva em vários códons dessa região em mosca-das-frutas do gênero *Anastrepha*. Devido o

tamanho do éxon C3 (792pb), e dos íntrons que o flanqueiam (73pb e 1846pb), foram desenhados dois pares de iniciadores (*fru* II e *fru* III), possibilitando a análise de todo éxon sem perder nenhuma informação potencial. Para a clonagem foi selecionada uma região mais ampla, de 900 pb, que incluía as regiões amplificadas pelos oligonucleotídeos *fru* II e *fru* III (Figura 4). Para análise do gene *OdsH* foi selecionada uma região de 515pb incluindo o intron 1 e o exon 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação das regiões de interesse nos genes *fru* e *OdsH*. Tm: temperatura de *melting*; Ta: temperatura de anelamento (* oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento).

Gene	Sequência 5' – 3'	Tamanho (pb)	Posição	Tm °C	Ta °C	Fragmento amplificado (em pb)
<i>fruitless</i> (<i>fru</i> I)	TGCCGATGTTCTGAAGAC CTGAGAGTCCTGCGCGTA	19 18	115832 a 115850 116714 a 116731	58,0 58,0	59,8	900
* <i>fruitless</i> (<i>fru</i> II)	TGCCGATGTTCTGAAGAC CAACAGCTCATCCCGACTAT	19 20	115832 a 115850 116385 a 116404	58,0 61,7	56,0	573
* <i>fruitless</i> (<i>fru</i> III)	GAACGATCTCCCAGCGT CTGAGAGTCCTGCGCGTA	17 18	116228 a 116244 116714 a 116731	61,0 58,0	59,8	504
<i>Odyseus</i> (<i>OdsH</i> I)	CAGCCAAAGAGCCCAAA TTGTGACTTACCGCTATGC	17 19	229 a 245 726 a 744	60,0 60,0	55,0	515

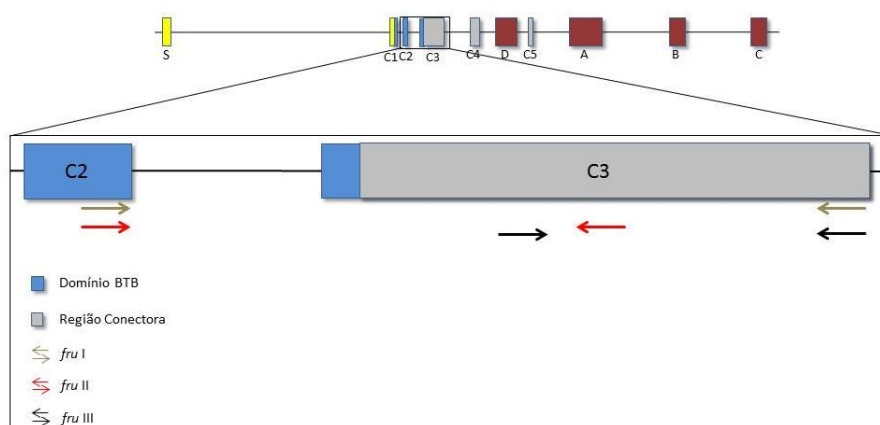


Figura 4. Representação gráfica das regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação de C3 do gene *fru* (*fru* I) e para sequenciamento de dois fragmentos dessa região (*fru* II e *fru* III). Em cinza, oligonucleotídeos utilizados para clonagem; em preto e vermelho, dois pares de oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento.

As reações de amplificação (PCRs – *Polymerase Chain Reaction*) foram conduzidas para amplificação dos fragmentos e posterior clonagem. Em cada reação foi utilizado 200ng

de DNA genômico, 0,0075 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 mM de MgCl₂, 1X tampão, 0,8 mM de cada desoxirribonucleotídeos fosfatados e 0,625 unidades de enzima polimerase (Taq Platinum – Invitrogen ®). As ciclagens foram diferentes para cada região gênica analisada: 5 minutos a 98°C e 35 ciclos de um minuto a 98°C, 1 minuto a 59,8°C e um minuto a 72°C, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C para fru I e fru III; 5 minutos a 98°C e 35 ciclos de um minuto a 98°C, 1 minuto a 56°C e um minuto a 72°C, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C para fruII e 5 minutos a 98°C e 35 ciclos de um minuto a 98°C, 1 minuto a 53°C e um minuto a 72°C, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C para *OdsH*.

Os fragmentos obtidos pela amplificação por PCR foram purificados utilizando o reagente de purificação DNA GFX DNA&Gel Band – GE® e clonados com o Kit TOPO TA Cloning - Invitrogen®, segundo as especificações dos fabricantes. Oito colônias de cada linhagem foram selecionadas aleatoriamente para extração do plasmídeo utilizando fenol/clorofórmio e sequenciadas com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para *fru* (fru II e fru III) e M13F e M13R para *OdsH*. Oito clones de cada linhagem foram selecionados para sequenciamento, realizado pela empresa Genomic – Engenharia Molecular (São Paulo/SP).

3.3. Análises Evolutivas

As sequências obtidas foram manipuladas e alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW por meio do programa MEGA 5.1 (TAMURA et al., 2011) para posterior obtenção de índices de diversidade, reconstrução filogenética e testes de seleção. Os índices de diversidade foram calculados por meio do programa DnaSP 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Foram ainda estimados o número de sítios segregantes, a média do número de diferenças nucleotídicas entre as sequências, como também foi aplicado o teste D de Tajima (TAJIMA, 1989), para inferir a ocorrência de expansão populacional por meio da diversidade das sequências.

As reconstruções filogenéticas foram realizadas por meio do programa MEGA 5.1, utilizando os métodos Neighbor-joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML) de reconstrução filogenética, com modelos de substituição nucleotídica escolhido por meio do programa MEGA 5.1. As relações entre as sequências foram também inferidas por meio do programa NETWORK 4.6.1.2 (BANDELT, 1999), disponível no website *Fluxus Technology*

Ltd.

Os testes de seleção foram realizados por meio da estimativa da razão K_A/K_S , onde K_A é a taxa de substituição não sinônima por sítio não sinônimo e K_S é a taxa de substituição sinônima por sítio sinônimo entre pares de sequências, utilizando o programa DnaSP 5.1. A relação kA/kS (ω) é utilizada para inferir a magnitude da seleção natural agindo em genes que codificam proteínas. A razão maior do que 1 implica seleção positiva; menor do que 1 implica em seleção purificadora; e igual a um indica ausência de seleção, isto é, evolução neutra. Também foram realizadas análises de máxima verossimilhança para teste de seleção códon-por-códon (HyPhy) por meio do programa MEGA 5.1 (SUZUKI; GOJOBORI, 1999; KOSAKOVSKY POND; FROST, 2005; POND; FROST; MUSE, 2005).

4. Resultados

4.1. Análises de diversidade das sequências *fru*

Foram amostrados 29 haplótipos nas sequências do gene *fru*, grande parte deles haplótipos únicos, não compartilhados entre as linhagens (Tabela 3). A diversidade haplotípica das amostras de cada linhagem, estimada pela média das diferenças nucleotídicas entre cada dois pares de sequências (π) variou de 0,00103 a 0,00309 em *D. mojavensis* e de 0,00118 a 0,00206 em *D. arizonae*. O teste D de Tajima produziu valores negativos para todas as linhagens embora tenha sido significativo apenas o D para linhagem 01 do Deserto de Mojave, sugerindo que ao menos esta população tenha experimentado um evento de expansão populacional.

Tabela 3. Estimativas de diversidade genética do exon C3 do gene *fru* em diferentes linhagens de *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

Linhagens	N	h	Hd (DP)	S	S _y	N _{sy}	Sg	π (DP)	θ_s	D de Tajima
moj01	8	6	0,893 (0,111)	9	5	4	9	0,00309 (0,00081)	0,00476	-1,723*
moj22	9	6	0,833 (0,127)	5	2	3	5	0,00152 (0,00037)	0,00252	-1,677
moj26	8	4	0,643 (0,184)	3	1	2	3	0,00103 (0,00037)	0,00159	-1,447
moj30	8	4	0,643 (0,184)	3	1	2	3	0,00103 (0,00037)	0,00159	-1,447
ari17	8	5	0,786 (0,151)	6	2	4	6	0,00206 (0,0063)	0,00317	-1,639
ari18	7	4	0,714 (0,181)	3	1	2	3	0,00118 (0,00039)	0,00168	-1,358

N = número de sequências; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica;

S = número de sítios polimórficos; S_y = número de substituições sinônimas; N_{sy} = número de substituições não sinônimas; Sg = singletons; π = diversidade nucleotídica observada; DP = desvio padrão; θ_s = diversidade nucleotídica esperada.

A diversidade esperada (θ), que variou de 0,00159 a 0,00476 em *D. mojavensis* e de 0,00168 a 0,00317 em *D. arizonae*, foi maior que a observada (π , variando de 0,00103 a 0,00309 em *D. mojavensis* e 0,00118 a 0,00206 em *D. arizonae*) em todas as linhagens. A presença de haplótipos únicos e a menor diversidade observada do que a esperada pode indicar atuação de seleção purificadora ou expansão populacional recente (Tabela 3).

A divergência genética, estimada pela porcentagem de diferenças entre as sequências (distância p) reflete a baixa diversidade nucleotídica das sequências *fru* também entre populações. A distância média variou de 0,004 a 0,008 entre as amostras de populações de *D.*

mojavensis e foi de apenas 0,0016 entre as duas amostras de populações de *D. arizonae* (Tabela 4, Apêndice A).

Tabela 4. Divergência intraespecífica (distância p) entre sequências do exon C3 do gene *fru* nas diferentes linhagens de *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

Linhagens	N	Média (Erro Padrão) (Erro Padrão)	Mínima	Máxima
<i>D. mojavensis</i>				
moj22 x moj26	17	0,004 (0,002)	0,004	0,007
moj22 x moj30	17	0,004 (0,002)	0,004	0,007
moj22 x moj01	17	0,004 (0,002)	0,004	0,010
moj26 x moj30	16	0,005 (0,003)	0,005	0,008
moj26 x moj01	16	0,008 (0,003)	0,008	0,014
moj30 x moj01	16	0,005 (0,003)	0,005	0,011
<i>D. arizonae</i>	15	0,0016 (0,0007)	0,000	0,003

A divergência interespecífica (Tabela 5, Apêndice A), também estimada pela distância p, variou de 0,026 (entre as sequências da linhagem da subespécie *D. m. wrigleyi* e de *D. arizonae* da região de Metztitlan, Hidalgo - México) a 0,031 (entre as sequências da linhagem da subespécie *D. m. sonoriensis* também com *D. arizonae*, proveniente da região de Metztitlan, Hidalgo).

Tabela 5. Divergência interespecífica (distância p) entre sequências do exon C3 do gene *fru* de *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

Linhagens	N	Média (Erro Padrão)	Mínima	Máxima
<i>D. mojavensis</i> x <i>D. arizonae</i>	48	0,028 (0,006)	0,025	0,036
moj22 x ari17	17	0,026 (0,006)	0,025	0,032
moj22 x ari18	17	0,026 (0,006)	0,025	0,029
moj26 x ari17	16	0,031 (0,006)	0,030	0,036
moj26 x ari18	15	0,029 (0,006)	0,029	0,032
moj30 x ari17	16	0,029 (0,006)	0,029	0,034
moj30 x ari18	15	0,029 (0,006)	0,029	0,032
moj01 x ari17	16	0,029 (0,006)	0,029	0,036
moj01 x ari18	15	0,028 (0,006)	0,029	0,033

4.2 Análises de diversidade das sequências *OdsH*

A região analisada de *OdsH* revelou um número de haplótipos muito menor do que a do gene *fru*, 9 no total, os quais também não são compartilhados entre as linhagens (Tabela 6). A diversidade haplotípica observada (π) também foi muito menor que a observada em *fru*, variando de zero (em três linhagens) a 0,00104 em *D. mojavensis* e de zero a 0,0052 em *D. arizonae*. A diversidade esperada (θ) variou de zero a 0,00161 em *D. mojavensis* e de zero a 0,0008 em *D. arizonae*. O teste D de Tajima não apresentou significância para nenhuma das linhagens para as quais foi possível realizá-lo.

Tabela 6. Estimativas de diversidade genética do intron 1 e exon 2 do gene *OdsH* em diferentes linhagens de *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

Linhagens	N	h	Hd (DP)	S	S _y	N _{sy}	sg	π (DP)	θ_s	D de Tajima
moj01	8	1	0	0	0	0	0	0	0	-
moj22	7	2	0,476 (0,171)	1	0	0	0	0,00099 (0,0036)	0,00085	0,55902
moj26	8	1	0	0	0	0	0	0	0	-
moj30	8	2	0,250 (0,180)	2	2	0	2	0,00104 (0,00075)	0,00161	-1,31009
ari17	8	2	0,250 (0,180)	1	0	0	1	0,0052 (0,00038)	0,0008	-
ari18	8	1	0	0	0	0	0	0	0	-

N = número de sequências; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; S = número de sítios polimórficos; S_y = número de substituições sinônimas; N_{sy} = número de substituições não sinônimas; sg = singletons; π = diversidade nucleotídica observada; DP = desvio padrão; θ_s = diversidade nucleotídica esperada.

A divergência genética entre as sequências *OdsH* das diferentes populações de cada espécie foi baixa, variando de 0,004 a 0,010 para *D. mojavensis* e de 0,009 para *D. arizonae* (Tabela 7, Apêndice B).

Tabela 7. Divergência intraespecífica (distância p) entre sequências do intron 1 e exon 2 do gene *OdsH* nas diferentes linhagens de *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

Linhagens	Média (Erro Padrão)	Mínima	Máxima
<i>D. mojavensis</i>	0,007 (0,003)	0,000	0,013
moj22 x moj26	0,007 (0,003)	0,006	0,008
moj22 x moj30	0,010 (0,004)	0,006	0,013
moj22 x moj01	0,007 (0,003)	0,006	0,008
moj26 x moj30	0,004 (0,003)	0,004	0,004
moj26 x moj01	0,004 (0,003)	0,004	0,004
moj30 x moj01	0,008 (0,004)	0,004	0,008
<i>D. arizonae</i>	0,009 (0,004)	0,000	0,01

A divergência interespecífica (Tabela 8, Apêndice B) variou de 0,017 (entre as sequências da linhagem da subespécie *D. mojavensis wrigleyi* e de *D. arizonae* da região de Las Bocas, Sonora - Mexico) a 0,029 (entre as sequências da linhagem da subespécie *D. mojavensis baja* com *D. arizonae* da região de Metztitlan, Hidalgo).

Tabela 8. Divergência interespecífica (distância p) entre sequências do intron 1 e exon 2 do gene *OdsH* entre *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

Linhagens	Média (Erro Padrão)	Mínima	Máxima
<i>D. mojavensis</i> x <i>D. arizonae</i>	0,023 (0,006)	0,017	0,031
moj26 x ari17	0,025 (0,007)	0,025	0,027
moj22 x ari17	0,024 (0,007)	0,023	0,027
moj30 x ari17	0,029 (0,007)	0,029	0,031
moj01 x ari17	0,025 (0,007)	0,025	0,027
moj26 x ari18	0,019 (0,006)	0,019	0,019
moj22 x ari18	0,017 (0,006)	0,017	0,019
moj30 x ari18	0,023 (0,006)	0,023	0,023
moj01 x ari18	0,023 (0,007)	0,023	0,023

4.3. Pressões Seletivas

Testes de seleção foram realizados visando testar a hipótese de que ao menos o éxon C3 do gene *fru* estaria sob pressão seletiva positiva, como já reportada para essa região em outros insetos (SOBRINHO; BRITO, 2010). Contudo os resultados indicaram que as sequências estudadas em *D. mojavensis* e *D. arizonae* estão sob ação de seleção purificadora tanto para as

regiões de *fru* como de *OdsH* (Tabela 9). Testes de seleção por códons (HyPhy, dados não mostrados) também não revelaram seleção positiva atuando em códons específicos nas regiões analisadas.

Tabela 9. Médias de K_S , K_A e razão K_A/K_S para o éxon C3 do gene *fru* e para o éxon 2 do gene *OdsH*.

Linhagens	K_S (Erro Padrão)	K_A (Erro Padrão)	K_A/K_S
<i>Fru</i>			
moj26-ari17	0,0730 (0,0003)	0,0210 (0,0002)	0,2886
moj22-ari17	0,0536 (0,0003)	0,0212 (0,0002)	0,3967
moj30-ari17	0,0667 (0,0003)	0,0210 (0,0002)	0,3161
moj01-ari17	0,0698 (0,0006)	0,0210 (0,0002)	0,3027
moj22-ari18	0,0544 (0,0005)	0,0194 (0,0002)	0,3582
moj26-ari18	0,0675 (0,0004)	0,0192 (0,0002)	0,2853
moj30-ari18	0,0675 (0,0004)	0,0193 (0,0002)	0,2864
moj01-ari18	0,0706 (0,0007)	0,0193 (0,0002)	0,2742
Média	0,0654 (0,0026)	0,0202 (0,0003)	0,3135
<i>OdsH</i>			
moj26-ari17	0,0568 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,2165
moj22-ari17	0,0767 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,1604
moj30-ari17	0,0767 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,1604
moj01-ari17	0,0568 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,2165
moj26-ari18	0,0374 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,3289
moj22-ari18	0,0568 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,2165
moj30-ari18	0,0568 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,2165
moj01-ari18	0,0767 (0,0000)	0,0123 (0,0000)	0,1604
Média	0,0618 (0,0049)	0,0123 (0,0000)	0,2095

4.4. Relações Filogenéticas

As relações filogenéticas para as sequências *fru* e *OdsH* foram reconstruídas pelo método Neighbor-joining (NJ) utilizando a distância p, devido à baixa divergência estimada entre as sequências. Segundo Nei e Kumar (2000), nesses casos, é desnecessária a utilização de modelos mais complexos de substituição para reconstruções filogenéticas. Adicionalmente foram utilizadas análises de Máxima Verossimilhança para comparação.

A Figura 5 mostra a reconstrução das relações filogenéticas entre as sequências de *fru* das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae* utilizando o método NJ. Nota-se que as sequências

das duas espécies agrupam-se em dois clados reciprocamente monofiléticos com alto suporte (acima de 90%).

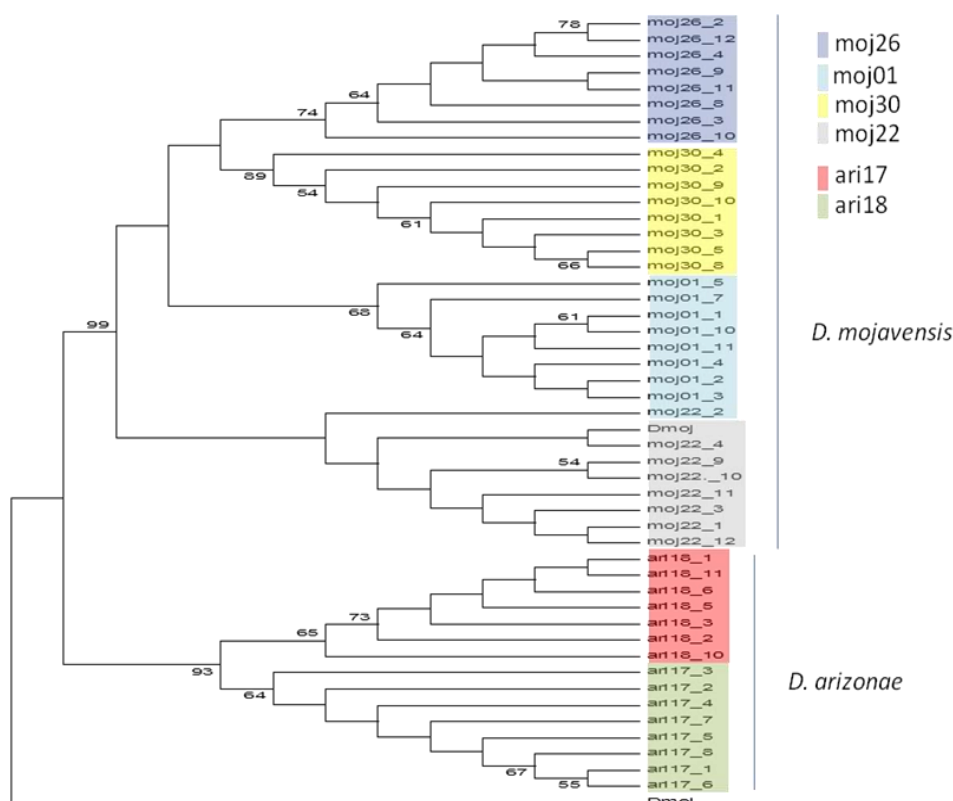


Figura 5. Relações filogenéticas entre as sequências do gene *fru* das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*. A árvore foi reconstruída usando o método Neighbor-joining (distância-p) implementado pelo programa MEGA 5. Os números nos ramos indicam valores de *bootstrap* superiores a 50% utilizando 1.000 réplicas.

A Figura 5 mostra que as sequências de linhagens derivadas das quatro populações de *D. mojavensis* também se agrupam separadamente, contudo apenas três delas com suporte de *bootstrap* confiável (*D. m. wrigleyi*, *D. m. baja*, *D. m. sonorensis*). As sequências das duas populações de *D. arizonae* também se agrupam separadamente (*bootstrap* acima de 60%).

As análises de ML, contudo não mostram as mesmas relações filogenéticas que na árvore NJ. Dentre as diferenças destacam-se principalmente a parafilia das amostras derivadas da população de *D. arizonae* da região de Metztitlan (Hidalgo, México). Nessa árvore, o clado das sequências da linhagem moj 22 (*D. m. wrigleyi*) é que não tem suporte (Figura 6).

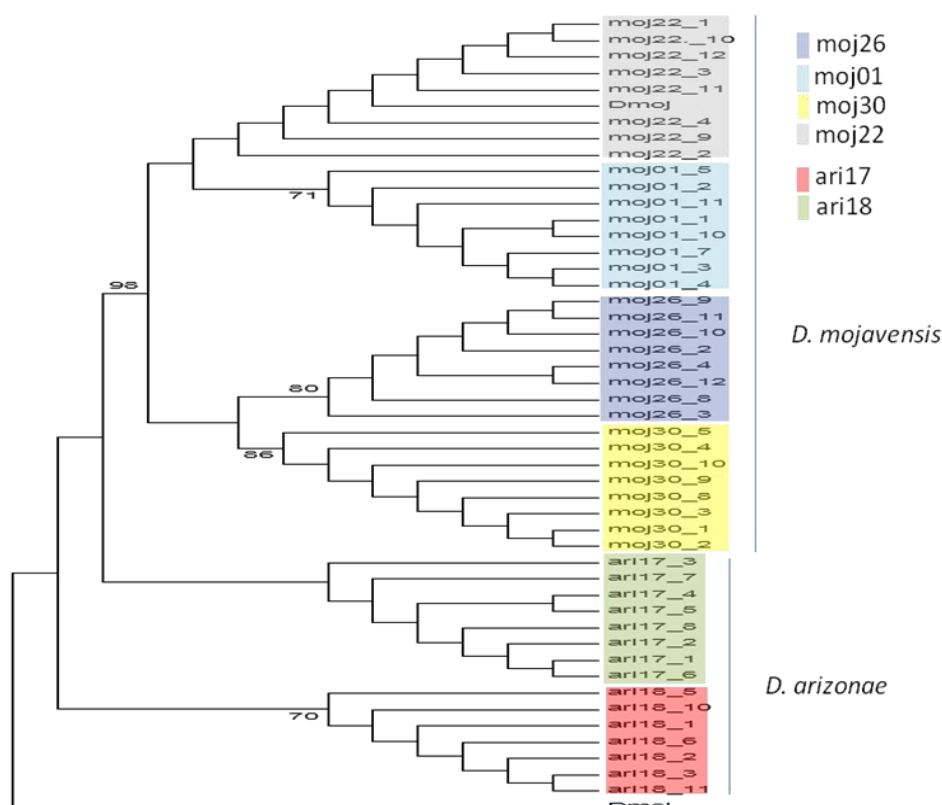


Figura 6. Relações filogenéticas entre as sequências do gene *fru* das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*. A árvore foi reconstruída usando o método Máxima verossimilhança (distância Jukes Cantor) implementado pelo programa MEGA 5. Os números nos ramos indicam valores de *bootstrap* superiores a 50% utilizando 1.000 réplicas.

As reconstruções filogenéticas com as sequências do gene *OdsH* apresentaram cenários muito semelhante àqueles fornecidos pelas sequências do gene *fru*. As reconstruções realizadas por NJ (Figura 7) produziram dois clados reciprocamente monofiléticos para as sequências das duas espécies, com alto suporte de *bootstrap* (acima de 85%) e clados contendo as sequências das linhagens de cada espécie também com alto suporte, com exceção de um deles, que contém as sequências da linhagem derivada da população de *D. m.baja* (moj30).

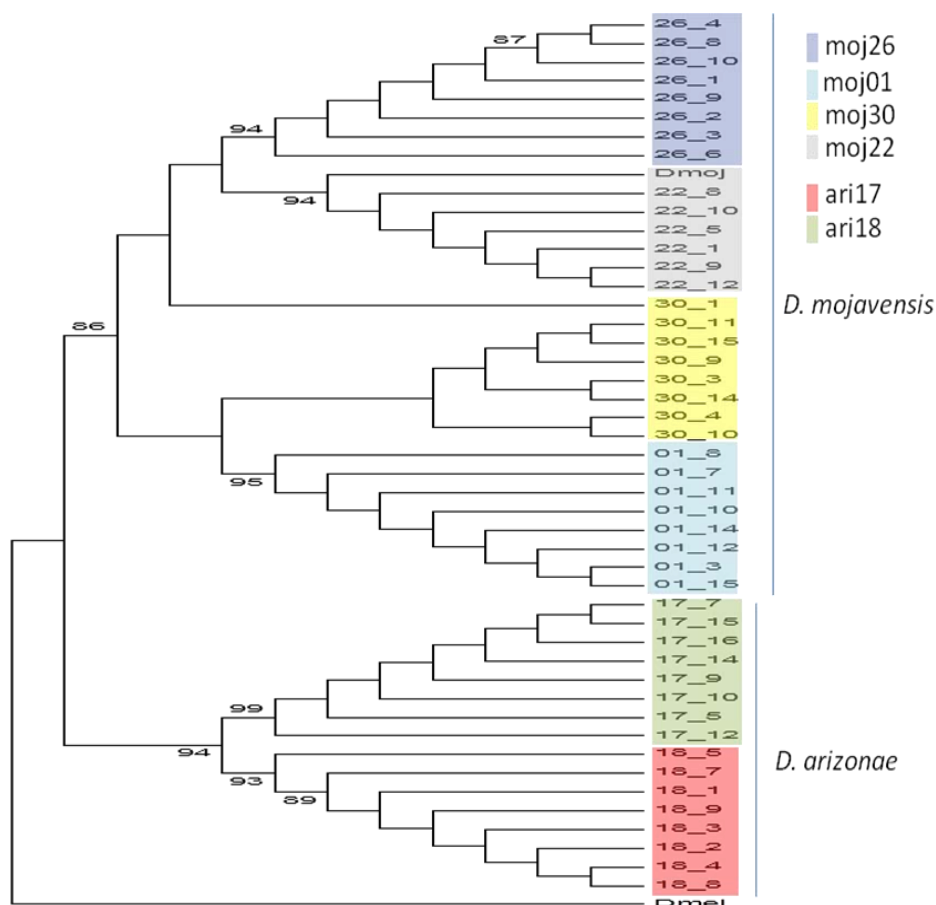


Figura 7. Relações filogenéticas entre as sequências do gene *OdsH* das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*. A árvore foi reconstruída usando o método Neighbor Joining (distância p) implementado pelo programa MEGA 5. Os números nos ramos indicam valores de *bootstrap* superiores a 50% utilizando 1.000 réplicas.

Corroborando as relações filogenéticas obtidas por meio de análise de Máxima Verossimilhança para o gene *fru*, observa-se parafilia também para sequências do gene *OdsH* na espécie *D. arizonae* (Figura 8), contudo nesse caso, a linhagem que compartilha um ancestral comum mais recente com *D. mojavensis* do que com as outras sequências de *D. arizonae* é aquela derivada da população coletada na região Las Bocas (Sonora, México).

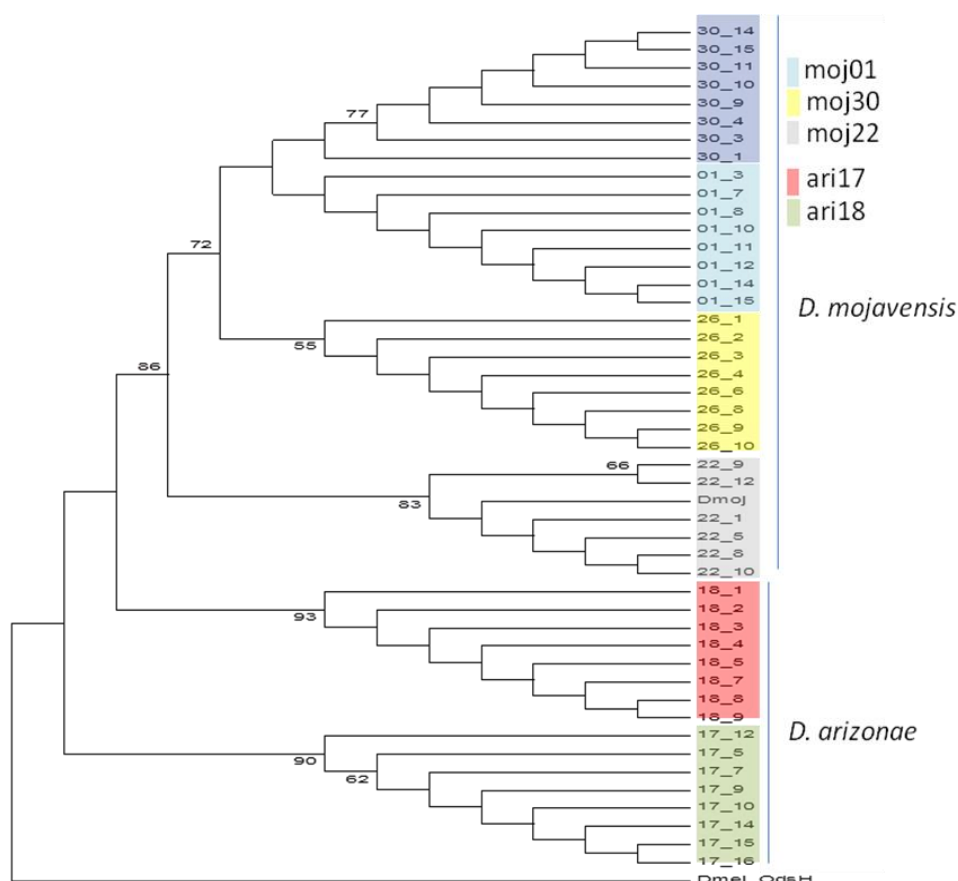


Figura 8. Relações filogenéticas entre as sequências do gene *OdsH* das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*. A árvore foi reconstruída usando o método Máxima Verossimilhança (distância Jukes Cantor) implementado pelo programa MEGA 5. Os números nos ramos indicam valores de *bootstrap* superiores a 50% utilizando 1.000 réplicas.

As relações entre as sequências também foi estabelecida pela construção de redes evolutivas tanto para *fru*, quanto para *OdsH*. (Figuras 9 e 10, respectivamente). As redes das sequências dos dois genes separam as espécies em dois grupos distintos, bem como o agrupamento das sequências de cada linhagem separadamente. Contudo, as relações evolutivas entre as linhagens não ficam claramente definidas devido à ocorrência de homoplasias, evidenciadas pelos polígonos unindo sequências de diferentes por meio de nós ancestrais.

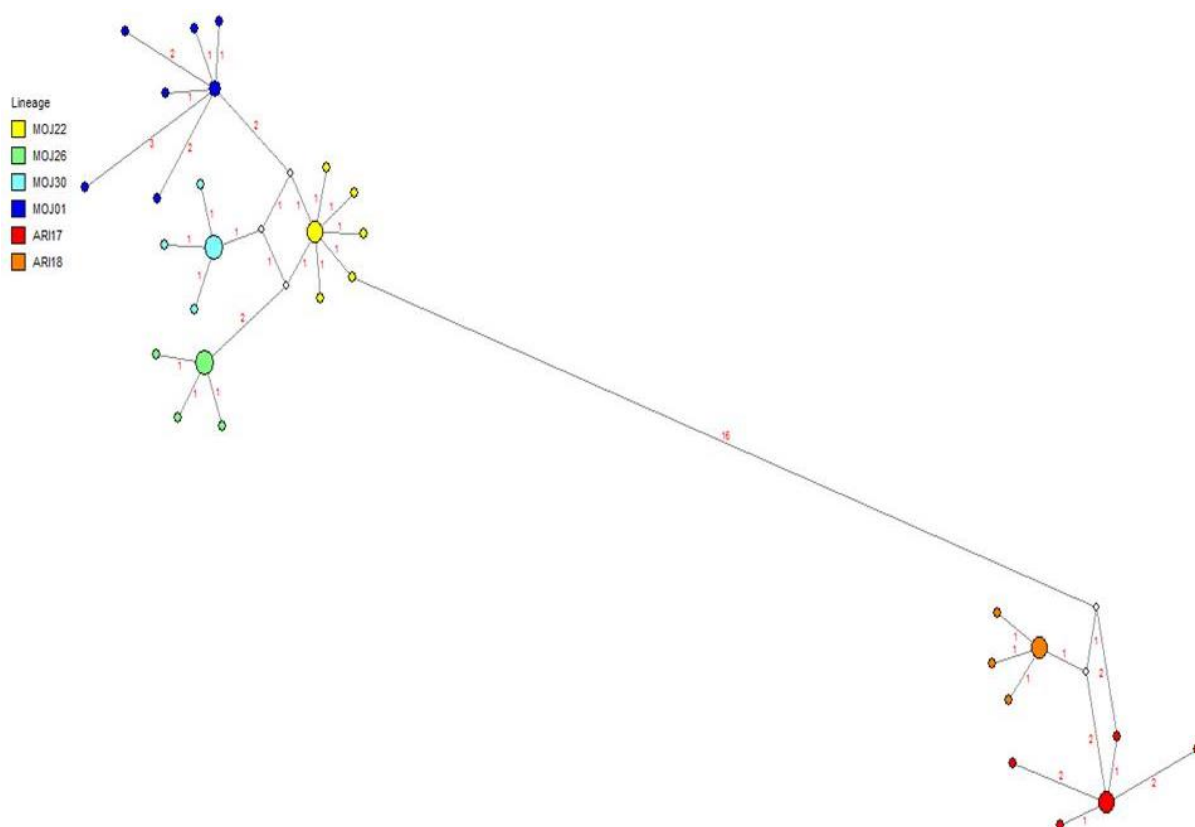


Figura 9. Rede de sequências do gene *fru*. Os círculos coloridos representam as sequências amostradas; círculos vazios correspondem a nós ancestrais, o comprimento dos ramos é proporcional ao número de mutações que ocorreram, como indicado pelos números acima de cada ramo.

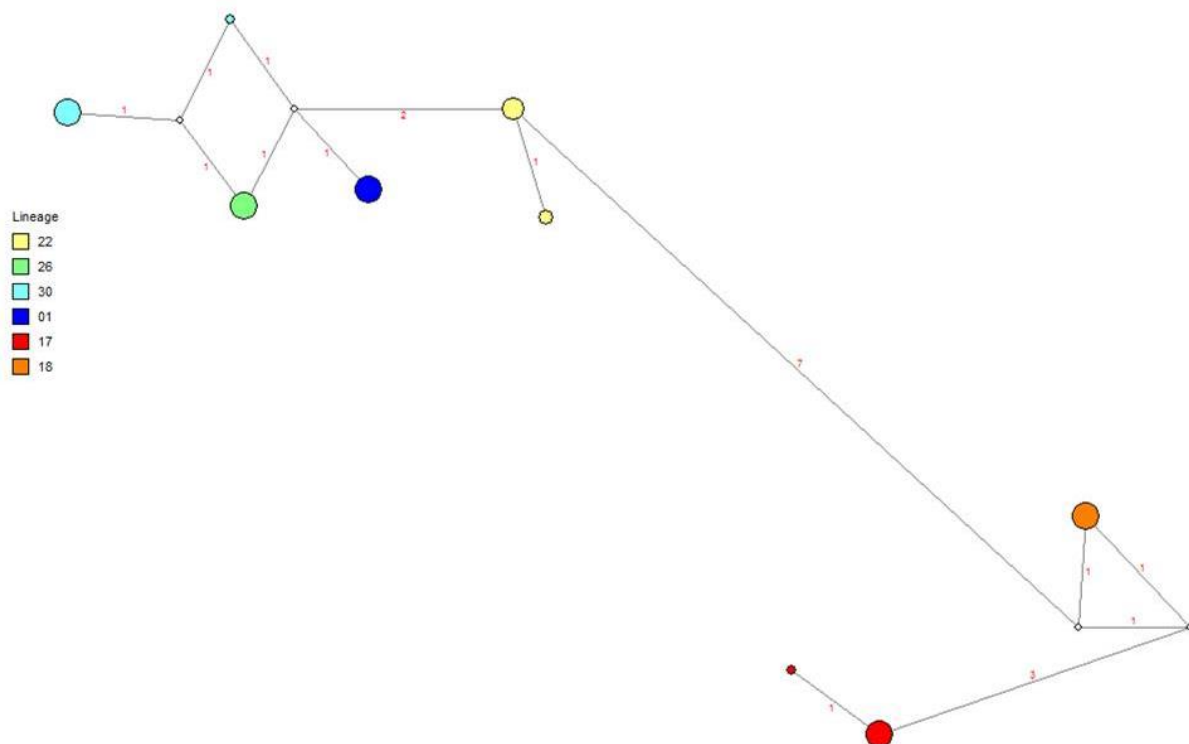


Figura 10. Rede com sequências do gene *OdsH*. Círculos coloridos representam as sequências amostradas; círculos vazios correspondem a nós ancestrais, o comprimento dos ramos é proporcional ao número de mutações que ocorreram, como indicado pelos números acima dos ramos.

5. Discussão

As espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae* divergiram recentemente, entre 0,99-0,66 milhões de anos (REED; NYBOER; MARKOW, 2007). Uma vez que efeitos de seleção positiva não foram encontrados para as regiões gênicas aqui analisadas, não há motivos para esperar alta divergência entre as sequências, e a baixa distância entre as mesmas refletem a recente separação entre as duas espécies. Os valores de ω encontrados indicam seleção purificadora, mas relativamente relaxada (ω entre 0,2 e 1,0 de acordo com Ridley, 2006) entre as populações de cada espécie, mas particularmente entre as duas espécies, maior para a sequência o gene *fru* (0,313) do que para *OdsH* (0,209). Seleção purificadora relativamente relaxada pode significar ocorrência passada de seleção positiva, já seleção positiva e purificadora atuando em momentos diferentes ao longo da evolução das sequências podem se anular mutuamente, resultando em um valor médio que pode tanto ser inferior, igual ou superior a 1,0.

Uma vez que a região conectora é mais divergente do que os demais domínios do gene *fru* foi sugerido que ela não desempenha qualquer papel importante na função gênica ou, ao contrário, que conteria informações espécie específicas. Segundo a primeira hipótese, a maior divergência da região C3 poderia ser devida a pressões seletivas relaxadas ou evolução neutra, enquanto que de acordo com a segunda a variação poderia ser explicada por seleção positiva, adaptativa. Gailey et al. (2006) rejeitaram a segunda hipótese, em face de experimentos com expressão transgênica de *fru* de *Anopheles* em *D. melanogaster*, que recuperou o desenvolvimento do músculo de Lawrence (MOL), uma estrutura que é especificada apenas pela proteína FruM. Esse resultado implica em restrição seletiva relaxada ou acúmulo de variação neutra. No entanto, os estudos de Sobrinho e Brito (2010) demonstraram um padrão seletivo positivo no exon C3 de *fru* que mostra sinais de adaptação nesta região, contudo em espécie de outra família de insetos (Tefritidae).

Por outro lado, em estudo recente Parker et al. (2013) examinaram a estrutura do gene *fruitless* em 18 espécies de *Drosophila*, dentre elas *D. mojavensis*, e determinaram os padrões de restrição seletiva atuando em toda a região codificadora. Os valores de ω variaram consideravelmente ao longo do gene, com a maior parte das regiões sendo evolutivamente conservadas, mas com pequeno número, embora significativo, de sítios evidenciando divergência como um resultado de seleção positiva. Tais sítios são restritos a regiões dos

exons A e D que sofrem *splicing* alternativo. A existência de éxons conservados sugere que sejam responsáveis por manter funções essenciais de *fru* entre os diferentes táxons, enquanto que sítios sob seleção positiva poderiam estar envolvidos na produção de transcritos associados a fenótipos espécie-específicos, principalmente aqueles relacionados ao comportamento sexual. Portanto, os resultados aqui relatados são congruentes com os reportados por Gailey et al. (2006) e Parker et al. (2013) em relação ao éxon C3 em espécies de *Drosophila*. A comparação desses resultados com aqueles reportados por Sobrinho e Brito (2010) em espécies do gênero *Anastrepha*, que indicam a ocorrência de seleção positiva nessa região de *fru*, reforça nosso entendimento de que os processos seletivos atuantes em um mesmo gene podem ser específicos para grupos de espécies particulares.

Em relação ao gene *OdsH*, a alta conservação encontrada entre as sequências de *D. mojavensis* e *D. arizonae* aqui analisadas é inesperada, frente ao que foi encontrado em estudos envolvendo duas espécies de *Drosophila* do grupo *melanogaster* (subgênero *Sophophora*), *D. mauritiana* e *D. simulans* (TING et al., 1998). Para estas espécies, que também divergiram recentemente, menos que 0,5 milhão de anos atrás (LACHAISE et al., 1988; RUSSO; TAKEZAKI; NEI, 1995), foi encontrada alta taxa de substituições não-sinônimas entre as sequências de *OdsH*, especialmente no homeodomínio (TING et al., 1998, 2004), evidenciando diferenças na pressão seletiva atuando nessa, em relação a outras regiões do gene, particularmente na linhagem conduzindo a *D. mauritiana* e *D. simulans*. Diferentemente, nossos dados não indicam aumento na taxa de evolução do homeodomínio de *OdsH* entre *D. mojavensis* e *D. arizonae*. Essa conservação no par de espécies aqui estudado, que pertencem ao subgênero *Drosophila*, novamente ilustra que eventos evolutivos podem ser particulares em diferentes táxons. Não podemos ignorar, contudo, que as linhagens utilizadas neste estudo foram coletadas há alguns anos e em decorrência podem ter uma subamostragem da variabilidade genética presente nas populações originais. Entretanto, se considerarmos que a variabilidade das mesmas linhagens entre as sequências do gene *fruitless* é muito maior, a baixa divergência das sequências de *Odyseus* pode ser uma característica intrínseca a essas espécies do grupo *repleta*.

Mesmo levando em conta o tempo recente de origem de *D. mojavensis*, alguns autores têm proposto a existência de quatro subespécies ecologicamente distintas para suas diferentes populações em face de evidências da genética de populações, ecologia, comportamento e morfologia da genitália (ETGES, W. J. et al., 2007, 2009, 2010; PFEILER et al., 2009). Dentre os marcadores moleculares utilizados destacam-se marcadores multilocos nos cromossomos 2, 3, 4 e 5 (MACHADO et al., 2007), sequências do gene *Adh* e *G6pd*

(MATZKIN; EANES, 2003; MATZKIN, 2004) e do gene da enzima citocromo oxidase 1 (REED et al., 2007). Embora o DNA mitocondrial seja a molécula mais utilizada em estudos filogenéticos e filogeográficos, esse marcador apresenta algumas limitações, como por exemplo: só recupera a linhagem materna, possui alta taxa de substituição de bases que pode levar a homoplasias, e apresenta taxas de introgressão muito mais altas do que as esperadas (AVISE, 2009). Além disso, considera-se que uma abordagem multiloco seria ideal para estudos dessa natureza, pois de acordo com Maddison (1997), genealogias reconstruídas a partir de um único gene podem ser problemáticas e podem não ser coincidentes com a genealogia das espécies. Portanto, associar marcadores mitocondriais com marcadores nucleares é de suma importância. Entretanto, de acordo com Avise (2009), achar um marcador nuclear adequado ainda é um grande desafio, principalmente em estudos intraespecíficos, devido à baixa taxa de evolução de genes nucleares (o que poderia ser resolvido com o uso de introns) e a dificuldade de isolar haplótipos nucleares de organismos diploides. Os marcadores nucleares, mais comumente, utilizados nesses estudos são os genes *period*, *Arginina quinase* (ArgK), *Fator de elongação 1- α* (EF1- α) CAD, *Hymenoptaecin*, *Defensin* (REGIER; SHULTZ, 1997; BAUZER et al., 2002; KAWAKITA et al., 2003). No presente trabalho analisamos dois genes nucleares não incluídos nessa lista, mas que se mostraram marcadores adequados para resolver relações filogenéticas não apenas entre espécies que divergiram recentemente, como *D. mojavensis* e *D. arizonae*, mas também em nível intraespecífico. As relações filogenéticas reconstruídas para as sequências dos dois genes, bem como as redes de haplótipos permitiram fazer inferências sobre a história evolutiva das espécies e suas populações.

Duas hipóteses têm sido levantadas para origem de *D. mojavensis* e *D. arizonae*. A primeira hipótese é apoiada por evidências provenientes de inversões cromossômicas e de sequências do gene *Adh* que indicam que as duas espécies tiveram origem a partir de populações alopátricas separadas pelo Golfo da Califórnia, onde a população da Baja Califórnia teria dado origem à *D. mojavensis* e a população do continente originado *D. arizonae*. Outra hipótese é apoiada por dados de sequências mitocondriais, que apontam para uma origem de *D. mojavensis* a partir do continente, onde uma linhagem primeiramente teria colonizado o Deserto de Mojave e outra o Deserto de Sonora. Não há consenso se a divergência entre *D. mojavensis* e *D. arizonae* se deu pelo evento vicariante resultante da separação da Península da Baja Califórnia, como indica os dados genéticos nucleares ou se houve especiação no continente, como indica os resultados utilizando sequências mitocondriais. Devido a esse conflito entre dados de sequências nucleares e mitocondriais,

Reed et al. (2007) enfatizam a necessidade de análises filogenéticas utilizando marcadores nucleares para determinar a atual história evolutiva entre *D. mojavensis* e *D. arizonae*.

A análise de duas sequências nucleares, dos genes *fruitless* e *Odysseus*, permite sugerir uma hipótese alternativa para a origem de *D. mojavensis* a partir do ancestral comum com *D. arizonae*. As relações reveladas pela análise de redes para os dois genes apontam para uma relação de parentesco mais próxima entre sequências de *D. mojavensis* amostrada na ilha de Santa Catalina (linhagem 22) com as de *D. arizonae*. Tanto na rede de *fru*, como na de *OdsH*, uma sequência amostrada em *D. mojavensis* de Santa Catalina se associa diretamente a uma sequência ancestral, ou não amostrada, relacionada a *D. arizonae*, sugerindo a origem da população de Santa Catalina a partir de um ancestral compartilhado com *D. arizonae*. Contudo, as homoplasias compartilhadas entre as sequências das quatro linhagens de *D. mojavensis* impedem inferências sobre as relações de parentesco entre elas. Estas relações sugerem que a população da ilha de Santa Catalina pode ter sido a primeira a se diferenciar em *D. mojavensis*, em decorrência de colonização da ilha e posterior dispersão para as outras regiões na área de distribuição atual da espécie.

Esta hipótese fundamenta-se no modelo de especiação peripátrica, ou por efeito do fundador, proposto por Mayr (1954). De acordo com este autor, populações pequenas, perifericamente isoladas, podem sofrer mudanças genéticas rapidamente devidas, principalmente, a efeitos de deriva genética no momento da fundação, seguidos por seleção natural. Sabe-se que pressões seletivas em ilhas podem ser diferentes daquelas encontradas em áreas geográficas mais extensas, a restrição ao fluxo gênico entre populações isoladas, associada à amostragem aleatória da variabilidade genética no momento da fundação, pode conduzir à especiação mais rapidamente do que em populações continentais mais amplamente dispersas. Adicionalmente, estas alterações nas frequências alélicas em certos locos podem alterar o valor seletivo de genótipos em outros locos devido a interações epistáticas entre eles. Neste contexto, a hipótese sugerida pelos resultados do presente estudo é que uma população do ancestral comum entre *D. mojavensis* e *D. arizonae* poderia ter se dispersado para a ilha de Santa Catalina, e lá originando *D. mojavensis*, enquanto a população continental teria dado origem a *D. arizonae*. A partir da população insular, amostras de *D. mojavensis* teriam retornado ao continente e se dispersado para as três principais regiões onde hoje a espécie é encontrada: Deserto de Mojave, Deserto de Sonora e Baja Califórnia, como mostra as relações entre as sequências aqui analisadas. É, contudo, indispensável destacar que o presente estudo foi realizado com linhagens de laboratório e por isso deve ser considerado com cautela. Sabe-se que para se realizar inferências sobre história populacional a estratégia mais apropriada é a

amostragem de um número razoável de indivíduos em populações naturais e a realização de análises filogeográficas utilizando sequências gênicas mitocondriais e nucleares. Apesar dessas restrições, e considerando que as sequências aqui utilizadas apresentaram um grau de variabilidade genética suficiente para a reconstrução das relações de parentesco, os nossos resultados devem ser considerados como uma abordagem inicial para se testar a hipótese de origem de *D. mojavenensis* por um processo de especiação peripátrica.

As reconstruções filogenéticas realizadas com os genes *fru* e *OdsH*, considerados genes de especiação, agrupam todas as sequências amostradas em *D. mojavenensis* como um clado monofilético. Monofilia também caracteriza as relações entre as sequências das linhagens derivadas de cada uma das quatro subespécies de *D. mojavenensis*, tendo a maior parte dos clados bom suporte. As relações entre esses clados variaram com o método de análise e do gene utilizado, e esse tipo de variação é esperado, já que genes diferentes podem ter histórias evolutivas diferentes e os métodos de reconstrução filogenética, podem utilizar algoritmos de agrupamento diferentes, como por exemplo os aqui empregados: Neighbor Joining utiliza medidas de distância e Máxima Verossimilhança associa estados de caracteres a medidas de distâncias. Diferenças nas relações de parentesco entre os principais clados de *D. mojavenensis* também foram relatadas para o gene *CoI* dependendo do método de análise filogenética utilizado (REED et al., 2007). De qualquer maneira, os agrupamentos monofiléticos revelados por nossas análises corroboram a classificação de subespécies para essas populações.

Por outro lado, a monofilia de *D. arizonae* depende do método de reconstrução filogenética. As filogenias reconstruídas com o método de Neighbor Joining, tanto para o gene *fru*, como para *OdsH*, produzem agrupamentos monofiléticos; contudo, aquelas reconstruídas por Máxima Verossimilhança revelam sempre *D. arizonae* como um táxon parafilético, sendo a linhagem ari17 ou ari18 mais proximamente aparentada a *D. mojavenensis* dependendo do gene analisado, *fru* ou *OdsH*, respectivamente. Parafilia em *D. arizonae*, envolvendo linhagens do sudeste da Califórnia também foi relatada por REED et al. (2007). A teoria da coalescência (KINGMAN, 1982) explica a parafilia em *D. arizonae*. Já que todos os alelos de determinado gene das populações contemporâneas coalescem a uma única cópia ancestral, em decorrência dos processos estocásticos e seletivos atuantes durante a história evolutiva da espécie, a monofilia das sequências pode ser alcançada em épocas diferentes em espécies distintas, e mesmo em genes diferentes na mesma espécie, dependendo da ação desses fatores nas populações.

Sendo os eventos que levam à especiação certamente complexos, durante os quais a divergência genética e o isolamento reprodutivo aumentam, podemos esperar que diferentes aspectos relacionados a essa divergência possam ser diferencialmente importantes para diferentes táxons, tornando a especiação um evento particular para diferentes grupos de organismos. Por isso, como proposto por diferentes autores, torna-se cada vez mais importante tentar identificar regras mais gerais e padrões da dinâmica do processo de especiação (COYNE; ORR, 2004; NOSIL; FEDER, 2012).

6. Conclusões

1 – A diversidade nucleotídica das regiões dos genes *fruitless* e *Odysseus* analisadas em *D. mojavensis* e *D. arizonae* é baixa, em concordância com o tempo recente de divergência das duas espécies.

2 – Seleção purificadora relativamente relaxada foi estimada para a região analisada do gene *fruitless*, tanto entre populações de cada espécie, como entre as duas espécies. Estes resultados são concordantes com os reportados para outras espécies de *Drosophila*.

3 – O gene *OdsH* também apresentou sinal de seleção purificadora e tal resultado é discordante dos obtidos em espécies do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila*, nas quais a região é variável e apresenta sinal de seleção positiva.

4 – As regiões de *fruitless* e *Odysseus* analisadas representam bons marcadores para as espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae* e também para diferentes linhagens dessas espécies.

5 – *D. mojavensis* pode ter sofrido especiação peripátrica na ilha de Santa Catalina a partir de seu ancestral comum com *D. arizonae* e posteriormente ter colonizado as outras áreas da atual distribuição da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605803602>>. Acesso em: 3 maio 2013.

ANAND, A et al. Molecular genetic dissection of the sex-specific and vital functions of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *fruitless*. **Genetics**, v. 158, n. 4, p. 1569–95, 2001.

ANDRÉS, J. A.; MAROJA, L. S.; HARRISON, R. G. Searching for candidate speciation genes using a proteomic approach: seminal proteins in field crickets. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 275, n. 1646, p. 1975–83, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2596363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 nov. 2011.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x/abstract>>. Acesso em: 4 dez. 2013.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n.1, p. 37-48, 1999.

BAKER, B. S.; TAYLOR, B. J.; HALL, J. C. Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 13–24, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11300999>>. Acesso em: 19 dez. 2011.

BAUZER, L. G. S. R. et al. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian population of *Lutzomya longipalpis*. **Insect Mol Biol.**, v. 11, p. 315-23, 2002.

BERTOSSA, R. C.; VAN DE ZANDE, L.; BEUKEBOOM, L. W. The *fruitless* gene in *Nasonia* displays complex sex-specific splicing and contains new zinc finger domains. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 7, p. 1557–69, 2009.

BONO, J. M.; MARKOW, T. A. Post-zygotic isolation in cactophilic *Drosophila*: larval viability and adult life-history traits of *D. mojavensis*/*D. arizonae* hybrids. **Journal of evolutionary biology**, v. 22, n. 7, p. 1387–95, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1420-9101.2009.01753.x/full>>. Acesso em: 29 jul. 2011.

CHENG, Y.-J. et al. Reduction of germ cells in the *Odysseus* null mutant causes male fertility defect in *Drosophila melanogaster*. **Genes & genetic systems**, v. 87, n. 4, p. 273–6, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23229314>>.

CLARK, N. L.; SWANSON, W. J. Pervasive adaptive evolution in primate seminal proteins. **PLoS genetics**, v. 1, n. 3, p. e35, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

COYNE, J. A. Reproductive Isolation. **Encyclopedia of Genetics**, p. 1679–1686, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270800014427>>.

COYNE, J. A.; ORR, H. A. **Speciation**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2004.

DEMIR, E.; DICKSON, B. J. *Fruitless* splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 785–94, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935764>>. Acesso em: 28 jul. 2011.

DICKSON, B. J. Wired for sex: the neurobiology of *Drosophila* mating decisions. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 904–9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988843>>.

DOBZHANSKY, T. H. **Genetics and the Origin of Species**. New York: Columbia Univ. Press, 1937.

ETGES, W.; HEED, W. Sensitivity to larval density in populations of *Drosophila mojavensis*: influences of host plant variation on components of fitness. **Oecologia**, v. 71, n. 3, p. 375–381, 1987. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/4218173?origin=JSTOR-pdf>>. Acesso em: 28 set. 2012.

ETGES, W. J. Genetics of host-cactus response and life-history evolution among ancestral and derived populations of cactophilic *Drosophila mojavensis*. **Evolution**, v. 47, n. 3, p. 750–767, 1993. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/2410181>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

ETGES, W. J. et al. Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. I. Male courtship song, mating success, and genotype x environment interactions. **Evolution**, v. 61, n. 5, p. 1106–19, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492965>>. Acesso em: 17 jul. 2011.

ETGES, W. J. et al. Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. III. Life-history divergence in allopatry and reproductive isolation. **Evolution**, v. 64, n. 12, p. 3549–69, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20681983>>. Acesso em: 2 ago. 2011.

ETGES, W. J. et al. Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*: II. Host plants and mating status influence cuticular hydrocarbon QTL expression and G x E interactions. **Evolution**, v. 63, n. 7, p. 1712–30, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1558-5646.2009.00661.x/full>>. Acesso em: 3 ago. 2011.

ETGES, W. J.; TRIPODI, A. D. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VIII. Mating success mediated by epicuticular hydrocarbons within and between isolated populations. **Journal of evolutionary biology**, v. 21, n. 6, p. 1641–52, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713239>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

FELLOWS, D. P.; HEED, W. B. Factors affecting host plant selection in desert-adapted cactophilic *Drosophila*. **Ecology**, v. 53, n. 5, p. 850–858, 1972. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/1934300>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

GAILEY, D. A et al. Functional conservation of the *fruitless* male sex-determination gene across 250 Myr of insect evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 3, p. 633–43, 2006.

GERRARD, D. T.; MEYER, A. Positive selection and gene conversion in SPP120, a fertilization-related gene, during the East African cichlid fish radiation. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 10, p. 2286–97, 2007.

JENNINGS, J. H.; ETGES, W. J. Species hybrids in the laboratory but not in nature: a reanalysis of premating isolation between *Drosophila arizonae* and *D. mojavensis*. **Evolution**, v. 64, n. 2, p. 587–98, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744120>>. Acesso em: 12 jul. 2011.

JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B. (Org.). **Drosophila: A Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1986. p. 275–277.

KAWAKITA, A. et al. Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 87–92, 2003.

KELLEHER, E. S.; MARKOW, T. A. Reproductive tract interactions contribute to isolation in *Drosophila*. **Fly**, v. 1, n. 1, p. 33–37, 2007. Disponível em: <<http://www.fly-bay.net/journals/fly/markowFLY1-1.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2012.

KIMURA, K.-I. et al. *Fruitless* and *doublesex* coordinate to generate male-specific neurons that can initiate courtship. **Neuron**, v. 59, n. 5, p. 759–69, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786359>>. Acesso em: 7 mar. 2013.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, v. 13, p. 235–48, 1982.

KOEPPFER, H. R. Selection for Sexual Isolation Between Geographic Forms of *Drosophila mojavensis*. I Interactions Between the Selected Forms. **Evolution**, v. 41, n. 1, p. 37–48, 1987. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/2408971>>. Acesso em: 19 jan. 2012.

KOSAKOVSKY POND, S. L.; FROST, S. D. W. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 5, p. 1208–22, 2005.

LACHAISE, D. et al. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Evolutionary Biology**, v. 22, p. 159–225, 1988. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0931-4_4>. Acesso em: 6 dez. 2013.

LEE, G.; HALL, J. C. Abnormalities of male-specific FRU protein and serotonin expression in the CNS of *fruitless* mutants in *Drosophila*. **The Journal of neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 513–26, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160431>>.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–2, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19346325>>. Acesso em: 16 jul. 2011.

LU, X. et al. Genome-wide misexpression of X-linked versus autosomal genes associated with hybrid male sterility. **Genome research**, v. 20, n. 8, p. 1097–102, 2010.

MACHADO, C. A et al. Multilocus nuclear sequences reveal intra- and interspecific relationships among chromosomally polymorphic species of cactophilic *Drosophila*. **Molecular ecology**, v. 16, n. 14, p. 3009–24, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614914>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

MADDISON, W. P. Gene trees in Species Trees. **Systematic Biology**, v. 46, n. 3, p. 523-536, 1997. Disponível em: <<http://sysbio.oxfordjournals.org/content/46/3/523.abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

MARKOW, T. A. Courtship Behavior and Control of Reproductive Isolation Between *Drosophila mojavensis* and *Drosophila arizonensis*. **Evolution**, v. 35, n. 5, p. 1022-1026, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2407873?origin=JSTOR-pdf>>.

MARKOW, T. A.; HOCUTT, G. D. Reproductive isolation in sonoran desert *Drosophila*: Testing the Limits of the Rules. In: HOWARD, D. J.; BERLOCHER, S. H. (Org.). **Endless Forms: Species and Speciation**. Oxford: Oxford Press, 1998. p. 234-244.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. **Drosophila: a guide to species identification and use**. San Diego: Elsevier Inc., 2006.

MATZKIN, L. M. Population genetics and geographic variation of alcohol dehydrogenase (*Adh*) paralogs and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6pd) in *Drosophila mojavensis*. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 2, p. 276-85, 2004.

MATZKIN, L. M.; EANES, W. F. Sequence variation of alcohol dehydrogenase (*Adh*) paralogs in cactophilic *Drosophila*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 181-94, 2003.

MAYR, E. Change of genetic environment and evolution. In: HUXLEY, J.; HARDY, A. C.; FORD, E. B. **Evolution as a Process**. Allen & Unwin, London, 1954.
NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York, 200

NOSIL, P.; FEDER, J. L. Genomic divergence during speciation: causes and consequences. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1587, p. 332-42, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3233720&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

NOSIL, P.; SCHLUTER, D. The genes underlying the process of speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 4, p. 160-167, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534711000024>>. Acesso em: 6 mar. 2013.

ORR, H. A.; MASLY, J. P.; PRESGRAVES, D. C. Speciation genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, n. 6, p. 675-9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531163>>. Acesso em: 4 jul. 2011.

PAN, Y.; ROBINETT, C. C.; BAKER, B. S. Turning males on: activation of male courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21144, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3120818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

PARKER, D. J. et al. The evolution of novelty in conserved genes; evidence of positive selection in the *Drosophila fruitless* gene is localised to alternatively spliced exons. **Heredity**, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24149653>>. Acesso em: 7 nov. 2013.

PEREZ, D. E. et al. Genetics of reproductive isolation in the *Drosophila simulans* clade: DNA marker-assisted mapping and characterization of a hybrid-male sterility gene, *Odysseus* (*Ods*). **Genetics**, v. 134, n. 1, p. 261–275, 1993.

PEREZ, D. E.; WU, C.-I. Further characterization of the *Odysseus* locus of hybrid sterility in *Drosophila*: one gene is not enough. **Genetics**, v. 140, n. 1, p. 201–206, 1995.

PFEILER, E. et al. Genetic, ecological and morphological differences among populations of the cactophilic *Drosophila mojavensis* from southwestern USA and northwestern Mexico, with descriptions of two new subspecies. **Journal of Natural History**, v. 43, n. 15-16, p. 923–938, 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222930802610535>>. Acesso em: 29 jul. 2011.

POND, S. L. K.; FROST, S. D. W.; MUSE, S. V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 21, n. 5, p. 676–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509596>>. Acesso em: 7 nov. 2013.

REED, L. K.; LAFLAMME, B. A.; MARKOW, T. A. Genetic architecture of hybrid male sterility in *Drosophila*: analysis of intraspecies variation for interspecies isolation. **PloS one**, v. 3, n. 8, p. e3076, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2517651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 jul. 2011.

REED, L. K.; NYBOER, M.; MARKOW, T. A. Evolutionary relationships of *Drosophila mojavensis* geographic host races and their sister species *Drosophila arizonae*. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1007–1022, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2006.02941.x/full>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

REGIER, J. C., SCHULTZ, J. W. Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. **Molecular Biology and Evolution**, v.14, p. 902-13, 1997.

RUIZ, A.; HEED, W. B. Host-plant specificity in the cactophilic *Drosophila mulleri* species complex. **Journal of Animal Ecology**, v. 57, n. 1, p. 237–249, 1988.

RUIZ, A.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M. Evolution of the *mojavensis* cluster of cactophilic *Drosophila* with descriptions of two new species. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 1, p. 30–42, 1990. Disponível em: <<http://jhered.oxfordjournals.org/content/81/1/30.short>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

RUSSO, C.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of *Drosophilid* species. **Molecular Biology and evolution**, v. 12, n. 3, p. 391–404, 1995. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/12/3/391.short>>. Acesso em: 6 dez. 2013.

RYNER, L. C. et al. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. **Cell**, v. 87, n. 6, p. 1079–89, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978612>>.

SCHLUTER, D. Evidence for ecological speciation and its alternative. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 737–41, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197053>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

SOBRINHO, I. S.; DE BRITO, R. A. Evidence for positive selection in the gene *fruitless* in *Anastrepha* fruit flies. **BMC evolutionary biology**, v. 10, n. 1, p. 293, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

SONG, H.-J. et al. The *fruitless* gene is required for the proper formation of axonal tracts in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. **Genetics**, v. 162, n. 4, p. 1703–24, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SUN, S.; TING, C.-T.; WU, C.-I. The normal function of a speciation gene, *Odysseus*, and its hybrid sterility effect. **Science**, v. 305, n. 5680, p. 81–3, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232104>>. Acesso em: 29 jul. 2011.

SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T. A method for detecting positive selection at single amino acid sites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 10, p. 1315–1328, 1999. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/16/10/1315.short>>. Acesso em: 8 dez. 2013.

SWANSON, W. J. et al. Evolutionary expressed sequence tag analysis of *Drosophila* female reproductive tracts identifies genes subjected to positive selection. **Genetics**, v. 168, n. 3, p. 1457–1465, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1448773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17 jul. 2011.

SWANSON, W. J.; VACQUIER, V. D. The rapid evolution of reproductive proteins. **Genetics**, v. 3, 2002.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, 1989. Disponível em <<http://www.genetics.org/content/123/3/585.full.pdf+html>>. Acesso em: 8 dez. 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–9, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

TING, C.-T. et al. A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. **Science**, v. 282, n. 5393, p. 1501–1504, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5393.1501>>. Acesso em: 24 dez. 2011.

TING, C.-T. et al. Gene duplication and speciation in *Drosophila*: evidence from the *Odysseus* locus. **PNAS**, v. 101, n. 33, p. 12232–12235, 2004. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/101/33/12232.short>>. Acesso em: 3 fev. 2012.

VILLELLA, A.; HALL, J. C. Neurogenetics of courtship and mating in *Drosophila*. **Advances in genetics**, v. 62, n. 08, p. 67–184, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010254>>. Acesso em: 1 mar. 2013.

WASSERMAN, M.; KOEPFER, H. R. Character displacement for sexual isolation between *Drosophila mojavensis* and *Drosophila arizonensis*. **Evolution**, v. 31, n. 4, p. 812–823, 1977. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/2407442>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

Apêndice A

Tabela 1. Divergência evolucionária (distância p) entre as sequências de *fruitless*. Erro padrão é mostrado acima da diagonal, em azul.

[illegible]

Apêndice B

Tabela 1. Divergência evolucionária (distância p) entre as sequências de *fruitless*. Erro padrão é mostrado acima da diagonal, em azul.

[illegible]