

Juliana Polachini de Castro

**O Uso de RAPD como Marcador Genético
no Estudo do Polimorfismo de DNA e
Caracterização Genética de Espécies de
Drosophila do Cluster *Buzzatii***



1910000877



JULIANA POLACHINI DE CASTRO

O USO DE RAPD COMO MARCADOR GENÉTICO
NO ESTUDO DO POLIMORFISMO DE DNA E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Drosophila DO CLUSTER *buzzatii*.



877/99

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

for seriado

São José do Rio Preto - SP

1999

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob a orientação da Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi



O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob a orientação da Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus pais

*Pelo amor, carinho, incentivo, dedicação,
sacrifícios e ensinamentos sem os quais não teria
concluído mais este pequeno capítulo do livro da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

"Descobertas e aperfeiçoamentos importantes invariavelmente envolvem a cooperação de muitas mentes. Eu posso ter recebido o crédito por ter deixado uma ídria, mas quando olho o desenvolvimento subsequente, eu percebo que o mérito pertence também aos outros."

Alexander Graham Bell

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas, e de forma particular:

à minha orientadora, Profa. Dra. *Lilian Madi Rezaca*, pela confiança, amizade, entusiasmo e incentivo que sempre estiveram presentes durante a realização deste trabalho e, principalmente por me orientar nesses primeiros passos de vida acadêmica e científica;

à Profa. Dra. *Hermione E. M. C. Bicudo*, pela acolhida carinhosa em seu laboratório e pela revisão do *Summary and Conclusions*;

à Profa. Dra. *Claudia M. Ap. Caravita*, pela amizade e colaboração durante toda a execução deste trabalho e pela análise criteriosa da pró-forma;

Aos meus pais

ao Prof. Dr. *Marco Antonio Del Lanza*, do Departamento de Genética e Evolução da UNESP, pelas sugestões durante a análise estatística dos dados;

à Profa. *Adriana*, pela atenção dispensada à leitura do *Summary and Conclusions*;

ao Prof. Dr. *James Robert Coleman* pela atenção dispensada à leitura do *Summary and Conclusions*.

AGRADECIMENTOS

"Descobertas e aperfeiçoamentos importantes invariavelmente envolvem a cooperação de muitas mentes. Eu posso ter recebido o crédito por ter deixado uma trilha, mas quando olho o desenvolvimento subsequente, eu percebo que o mérito pertence também aos outros."

Alexander Graham Bell

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas, e de forma particular:

à minha orientadora, Profa. Dra. *Lilian Madi Ravazzi*, pela confiança, amizade, entusiasmo e incentivo que sempre estiveram presentes durante a realização deste trabalho e, principalmente por me orientar nesses primeiros passos de vida acadêmica e científica;

à Profa. Dra. *Hermione E. M. C. Bicudo*, pela acolhida carinhosa em seu laboratório e pela revisão do *Summary and Conclusions*;

à Profa. Dra. *Cláudia M. Ap. Carareto*, pela amizade e colaboração durante toda a execução deste trabalho e pela análise criteriosa da pró-forma;

ao Prof. Dr. *Marco Antonio Del Lama*, do Departamento de Genética e Evolução da Faculdade Federal de São Carlos, pelas valiosas sugestões durante a análise da pró-forma;

à Profa. *Adriana Barbosa Santos*, do Departamento de Ciências da Computação e Estatística, pela ajuda na análise estatística dos dados.

ao Prof. Dr. *James Robert Coleman* pela atenção dispensada à leitura do *Summary and Conclusions*;

aos Profs. Drs. *Eloiza Tajara* e *José Osmar Gaspar* pela amizade e colaboração nos momentos de dificuldades;

ao amigo incondicional *Felipe Rafael Torres*, pela amizade, conselhos, bom humor e companheirismo, com certeza sem a sua ajuda seria muito mais difícil concluir este trabalho;

aos amigos de Pós-Graduação *Lilian, Luciana, Priscila* e *Marcos* pela amizade, companheirismo e incentivo;

aos demais companheiros da Pós-Graduação, Professores, Servidores Técnico-Acadêmicos e funcionários do Departamento de Biologia, pelo convívio fraternal e proveitoso;

às minhas amigas *Fabiana, Karina* e *Simone*, que estiveram ao meu lado nos melhores momentos da minha vida acadêmica e que comigo compartilharam as alegrias e decepções de um trabalho científico;

à minha amiga *Silvia Cremones Nascimento*, personificação da verdadeira amizade, por ser exemplo de coragem e perseverança, companheira de todas as horas, com quem eu divido todos os momentos da minha vida e aprendo a ser uma pessoa melhor a cada dia, minha eterna gratidão;

à minha tia *Mirley*, pelo carinho, apoio e incentivo constantes;

à minha querida irmã *Livia*, que soube exemplificar com seu amor e dedicação o significado do companheirismo;

aos meus pais *Raul* e *Elza*, por todo o carinho, exemplo, amor e esforços realizados para a minha formação pessoal e profissional;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro;

a Deus, pela possibilidade de chegar até aqui

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
1. Marcadores moleculares como ferramentas no estudo da diferenciação genética	01
2. A técnica de RAPD	03
3. A utilização da técnica de RAPD em estudos genéticos	06
4. O grupo repleta de <i>Drosophila</i>	08
5. O cluster buzzatii	13
6. Objetivos	
II. MATERIAL E MÉTODOS	16
1. Linhagens utilizadas	16
2. Extração do DNA genômico	18
3. Detecção da presença de DNA	20
4. Oligonucleotídeos utilizados	22
5. Amplificação do DNA	24
6. Eletroforese em gel	26
7. Análise dos dados	28
III. RESULTADOS	33
1. Padrão de Bandas de DNA	33
2. Polimerização de DNA	36
3. Similaridade Genética	38
4. Análise de Agrupamento	41
5. Presença de DNA amplificado não-específico	43
IV. DISCUSSÃO	71

“Modele a sua vida no exemplo do bambu gigante:

O exterior, embora liso e agradável ao contato, é duro e resistente à espada. Por dentro é macio, flexível, com muito espaço vazio para o contínuo crescimento. Sozinho, sobe alto e reto, sempre se projetando para o céu. Lá em cima espalha sua beleza ao sol. Não se apoia em nada. Cria seu próprio caminho, talvez próximo dos outros, uma parte de outros, mas depende basicamente de sua própria força e vigor”

Léo Buscaglia

ÍNDICE

V. RESUMO E CONCLUSÕES	84
I. INTRODUÇÃO	01
1. Marcadores moleculares como ferramentas no estudo da diferenciação genética	01
2. A técnica de RAPD	03
3. A utilização da técnica de RAPD em estudos genéticos	06
4. O grupo <i>repleta</i> de <i>Drosophila</i>	08
5. O <i>cluster buzzatii</i>	09
6. Objetivos	15
II. MATERIAL E MÉTODOS	16
1. Linhagens utilizadas	16
2. Extração do DNA genômico	18
3. Detecção da presença de DNA nas amostras	19
4. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados	19
5. Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	20
6. Eletroforese em gel de agarose	21
7. Análise dos dados	22
III. RESULTADOS	25
1. Padrão de bandas de RAPD nas linhagens estudadas	26
2. Polimorfismo de DNA quanto ao padrão RAPD	46
3. Similaridade Genética	56
4. Análise de Agrupamento	63
5. Presença de DNA amplificado não-específico	69
IV. DISCUSSÃO	71



V. RESUMO E CONCLUSÕES	84
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	86
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

O potencial evolutivo de uma população é determinado pelo seu grau de variação genética. Desse modo, a quantidade de variação genética de uma população é um parâmetro fundamental nos estudos evolutivos.

O estudo da variabilidade genética é baseado no uso de vários marcadores. Até os meados da década de 60, eram utilizados marcadores controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, tais como nanismo, cor de pétala, etc. Marcadores fenotípicos são fáceis de serem identificados, mas em alguns casos difíceis de serem avaliados com precisão, principalmente por causa da interferência do ambiente ou de genes modificadores. Além disso, são poucos os marcadores analisáveis em um único cruzamento, e grupos de ligações podem ser detectados em apenas uma pequena fração do genoma, restringindo a utilidade dos mesmos (Williams *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos propiciou o entendimento da estrutura genética de populações naturais, estudar o fluxo gênico entre populações e os processos de hibridação natural (van Heusden e Bachmann, 1992). Os alelos isoenzimáticos apresentam expressão co-dominante, possibilitando a estimativa direta de parâmetros tais como frequências genotípicas, frequências alélicas e, a partir desses, coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade. Pelo fato dessas enzimas possuírem função metabólica ou por limitações da técnica, muitas vezes não é possível detectar as variações (Hoy, 1994). Sendo assim, além do número de locos ser limitado, frequentemente depara-se com o problema da ausência de

I. INTRODUÇÃO

I. 1. Marcadores moleculares como ferramentas no estudo da diferenciação genética.

O potencial evolutivo de uma população é determinado pelo seu grau de variação genética. Desse modo, a quantidade de variação genética de uma população é um parâmetro fundamental nos estudos evolutivos.

O estudo da variabilidade genética é baseado no uso de vários marcadores. Até os meados da década de 60, eram utilizados marcadores controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, tais como nanismo, cor de pétala, etc. Marcadores fenotípicos são fáceis de serem identificados, mas em alguns casos difíceis de serem avaliados com precisão, principalmente por causa da interferência do ambiente ou de genes modificadores. Além disso, são poucos os marcadores analisáveis em um único cruzamento, e grupos de ligações podem ser detectados em apenas uma pequena fração do genoma, restringindo a utilidade dos mesmos (Williams *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos propiciou o entendimento da estrutura genética de populações naturais, estudar o fluxo gênico entre populações e os processos de hibridação natural (van Heusden e Bachmann, 1992). Os alelos isoenzimáticos apresentam expressão co-dominante, possibilitando a estimativa direta de parâmetros tais como frequências genotípicas, frequências alélicas e, a partir desses, coeficientes de diversidade gênica e heterozigiosidade. Pelo fato dessas enzimas possuírem função metabólica ou por limitações da técnica, muitas vezes não é possível detectar as variações (Hoy, 1994). Sendo assim, além do número de locos ser limitado, freqüentemente depara-se com o problema da ausência de



polimorfismo genético para um ou vários dos locos isoenzimáticos disponíveis.

Os marcadores moleculares têm sido um instrumento poderoso para o estudo da genética e dos mecanismos evolutivos por possibilitarem a transposição dessas dificuldades (Williams *et al.*, 1993). A análise do DNA apresenta várias vantagens significativas quando comparada com técnicas de análise de proteínas, como por exemplo: (1) a análise do genótipo é mais acurada que a do fenótipo, (2) uma ou mais seqüências apropriadas podem ser selecionadas com base na taxa evolutiva ou modo de herança, (3) os métodos são, na maior parte, gerais para qualquer tipo de DNA e (4) o DNA pode ser obtido de pequenas quantidades de tecido e é relativamente estável.

Com o advento das técnicas modernas da biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos genéticos. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA, denominados RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (Grodzicker *et al.*, 1974). Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através de enzimas de restrição e observado por hibridação desses fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos quimioluminescentes. Como as isoenzimas, os marcadores RFLP apresentam expressão co-dominante, e entre as suas vantagens destaca-se a capacidade de abranger todo o genoma do organismo estudado. Entretanto, a análise RFLP requer grande quantidade de DNA, disponibilidade de sondas para se detectar a variação, além da necessidade da utilização de eletroforese e *Southern blot*, o que a torna uma técnica relativamente dispendiosa em custo quanto no tempo de obtenção dos resultados.

Na classe dos marcadores moleculares que envolvem seqüências repetitivas de DNA no genoma, enquadram-se as seqüências hipervariáveis denominadas VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), constituídas de



um número variável de seqüências idênticas (de 15-60 pb) repetidas lado a lado. VNTRs, ou Minisatélites, têm sido utilizados para identificação de variedades e clones, na análise de diversidade genética e na determinação de paternidade. O princípio de obtenção e detecção desse tipo de marcador é essencialmente o mesmo utilizado para RFLP, diferindo basicamente no tipo de sonda utilizada. O elevado nível de polimorfismo detectado por esta técnica faz com que, virtualmente, todo indivíduo possua um perfil diferente de bandas, lembrando um código de barras de embalagem de produtos industrializados, daí a origem do conceito de impressão digital genética ou *genetic fingerprint*. Entretanto, a necessidade de isolar e clonar sondas seqüenciais para cada espécie tem limitado o uso do *fingerprinting* de DNA em vários estudos (Hoy, 1994).

Após a concepção da tecnologia da reação em cadeia da polimerase - PCR, *Polimerase Chain Reaction* - (Mullis e Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), novas classes de marcadores moleculares foram descritas. Dentre estes, destacam-se os microsátélites (Litt e Luty, 1989), pequenas seqüências de um a quatro nucleotídeos repetidas em *tandem*. Em genomas eucariotos, essas seqüências simples são mais freqüentes, melhor distribuídas ao acaso e formam locos genéticos muito mais polimórficos do que os locos hipervariáveis constituídos por minisatélites. Esses locos altamente polimórficos foram também denominados por Beckmann e Soller (1990) de STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*). Entretanto, essa técnica necessita de um desenvolvimento prévio dos marcadores, o que dificulta a análise de genomas menos conhecidos.

Outra classe de marcadores são os AFLPs - *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Zabeau, 1993). A análise desses fragmentos combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR. Da mesma forma que as demais técnicas descritas, a técnica de AFLP



é relativamente dispendiosa tanto em custo quanto no tempo de obtenção dos resultados.

Uma modificação da PCR, denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), tornou-se uma ferramenta apropriada para o estudo de organismos cuja informação genética é pequena, uma vez que requer pouca quantidade de DNA e pode ser utilizada para pequenos organismos ou partes deles. É rápida e relativamente barata quando comparada com as demais classes de marcadores moleculares (van Heusden e Bachmann, 1992).

I. 2. A técnica de RAPD

Um grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade do conhecimento prévio de uma seqüência (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Esta técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos de pesquisadores nos Estados Unidos. Williams *et al.* (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, ou seja, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Welsh e McClelland (1990) propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction*), uma vez que os *primers* possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso, e sim em lugares específicos do genoma (Crowhurst *et al.*, 1991).

Os RAPDs são produzidos pela aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) à amostras de DNA genômico, usando como *primer* uma única seqüência de oligonucleotídeos de 9 a 10 bases construído casualmente, o que resulta na amplificação de uma seqüência alvo



desconhecida. Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase (Lynch e Milligan, 1994). Esses fragmentos podem ser separados por tamanho sobre um gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio em luz UV, eliminando a necessidade de sondas radioativas.

Devido ao fato dessa técnica não necessitar de clonagem, seqüenciamento de nucleotídeos ou hibridização por *Southern blot*, ela tem permitido a detecção rápida e efetiva dos polimorfismos e marcadores genéticos em uma grande quantidade de plantas e animais. Além disso, necessita de pouca quantidade de DNA para a análise, o que facilita sua utilização em estudos de insetos de pequeno porte, tais como a *Drosophila*.

Uma vez que os *primers* são de tamanho intermediário (na ordem de 10 pares de base), múltiplos fragmentos amplificados em diferentes graus (de diferentes locos) estão usualmente presentes para cada *primer* em cada genoma. Dessa forma, o número de locos que pode ser examinado é ilimitado. Pelo fato dos *primers* consistirem de seqüências casuais, não discriminando entre regiões codificadoras e não codificadoras, é razoável supor ser esta uma técnica de amostragem do genoma mais casual que os métodos convencionais (Lynch e Milligan, 1994).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida, entretanto evidências experimentais indicam que diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementariedade do *primer* com o sítio de iniciação, impedindo a amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990). Outras fontes de polimorfismo incluem deleções de sítios de iniciação ou inserções, que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer (Brauner *et al.*, 1992).



Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado está presente ou ausente.

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é a de serem herdados como marcadores dominantes (Williams *et al.*, 1990). Este modelo de herança não permite identificar indivíduos heterozigotos e homozigotos dominantes sem cruzamentos subseqüentes. Ao se observar uma banda RAPD no gel não é possível distinguir se aquele segmento originou-se a partir de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada. Assim sendo, um indivíduo diplóide homozigoto para aquele loco RAPD é considerado como portador de dois alelos RAPD idênticos (AA), a partir dos quais a amplificação ocorre. Por outro lado, um indivíduo heterozigoto (Aa) para o mesmo loco RAPD possui um alelo (A) que é amplificado e outro (a) que não o é, devido a qualquer uma das causas de polimorfismo mencionadas anteriormente. A detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar os dois casos. Por isso, enquanto o genótipo denominado como homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel (fenótipo nulo), os genótipos denominados de homozigoto dominante (AA) e heterozigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, isto é, a presença da banda no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Em um gel de RAPD também podem existir bandas com o mesmo tamanho em pares de bases e as mesmas seqüências nas extremidades onde o *primer* iniciou a amplificação. Tais bandas são chamadas de monomórficas e acabam por encobrir alguns polimorfismos. Uma das formas de se detectar esses polimorfismos adicionais entre bandas monomórficas é a digestão enzimática de vários segmentos individuais reamplificados (Lynch e Milligan, 1994).

Apesar dessas limitações, os marcadores RAPD, como já mencionado acima, apresentam várias vantagens quando comparados com outros marcadores moleculares, entre elas: (1) os experimentos são simples



e rápidos, não sendo necessárias grandes preparações, tais como isolamento de sondas de DNA clonado, *Southern blots*, ou seqüenciamento de nucleotídeos; (2) não requer conhecimento prévio de seqüências específicas para os *primers* podendo ser usada uma série de *primers* universais; (3) não utiliza sondas radioativas; (4) necessita de baixa quantidade de DNA genômico para a análise; (5) permite a visualização de grande quantidade de polimorfismos; e (6) não requer experiência aprofundada em biologia molecular e nem instalações sofisticadas de laboratório (Halward *et al.*, 1992).

I. 3. A utilização da técnica de RAPD em estudos genéticos

Um dos primeiros usos práticos dos marcadores RAPD foi na criação de mapas genéticos de alta densidade e localização de genes de interesse econômico (Reiter *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1990; Michelmore *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991). Entretanto, a área de pesquisa que tem mostrado um maior crescimento na utilização da tecnologia RAPD é a da genética de populações.

Marcadores RAPD têm sido usados para criar *fingerprints* de DNA para o estudo da identidade individual, estimar a variação genética entre populações e as relações taxonômicas em organismos procariotos e eucariotos (Welsh e McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Hu e Quiros, 1991; Welsh *et al.*, 1991; Hadrys *et al.*, 1992; Wilde *et al.*, 1992). Outros estudos mostraram que essa técnica é muito útil para a detecção de polimorfismo genético e identificação de variedades (Hu e Quiros, 1991; Weining e Langridge, 1991; Welsh *et al.*, 1991).

Como demonstrado por Kambhampati *et al.* (1992) e Landry *et al.* (1993) apud Schenell *et al.* (1996), marcadores RAPD podem ser usados para diferenciar populações de insetos. Haymer e McInnis (1994), estudando



Ceratitis capitata, foram hábeis para identificar marcadores RAPD que eram monomórficos em moscas de uma região geográfica e ausentes em moscas de outras regiões.

Um estudo realizado por Cenis e Beitia (1994) com o objetivo de avaliar a aplicação da técnica RAPD na identificação de insetos, mostrou que a técnica em questão é capaz de discriminar diferenças genéticas entre indivíduos de uma população, populações ou clones de uma espécie, e espécies dentro de um gênero. Segundo estes autores, a elevada resolução da técnica somada à sua relativa simplicidade e à possibilidade de estudar um grande número de indivíduos, a converte em uma técnica com grande potencial para estudos de variabilidade genética.

Pascual *et al.* (1997) realizaram um estudo para avaliar a variabilidade genética em populações de *Drosophila azteca* e *D. athabasca*. Para essas populações, a técnica de RAPD revelou uma alta variabilidade tanto entre populações de uma mesma espécie quanto entre indivíduos de uma mesma população. Também foi possível, através dessa técnica, estimar o grau e o tempo de divergência entre as duas espécies de *Drosophila* em estudo.

Vários outros estudos já foram realizados com insetos, entre eles destacam-se os estudos em *Aedes* (Kambhampati *et al.*, 1992; Ballinger-Crabbtree *et al.*, 1992; Apostol *et al.*, 1993, 1994, 1996), *Anopheles* (Favia *et al.*, 1994, Wilkerson *et al.*, 1995a, b), *Ceratitis capitata* (Haymer e McInnis, 1994; Baruffi *et al.*, 1995; Reyes e Ochando, 1998), lepidópteros (Garner e Slavicek, 1996; Deverno *et al.*, 1998), *Apis mellífera* (Hunt e Page, 1994, 1995; Hunt *et al.*, 1998; Suazo *et al.*, 1998) e outros himenópteros (Landry *et al.*, 1993) e em triatomíneos (Garcia *et al.*, 1998).

Além das aplicações citadas acima, os marcadores RAPD também têm sido utilizados em estudos filogenéticos (van de Zande e Bijlsma, 1995; Millan *et al.*, 1996, Marillia e Scoles, 1996) e epidemiológicos



(Garcia *et al.*, 1998), demonstrando também nestas áreas uma boa aplicabilidade.

O poder filogenético da técnica de RAPD em *Drosophila* foi testado por van de Zande e Bijlsma (1995). Neste estudo, os autores compararam as relações filogenéticas obtidas por análise dos dados provenientes de RAPD com a filogenia traçada através de vários outros marcadores, e que é aceita no presente. Estes autores demonstraram que em *Drosophila*, o uso de marcadores RAPD é muito eficiente para a identificação de espécies. Espécies diferentes mostraram padrões RAPD muito diferentes. Entretanto, dentro da mesma espécie, houve um alto grau de similaridade entre as linhagens, mesmo quando se tratavam de linhagens distintas. Dessa forma, a técnica RAPD, segundo esses autores, quando utilizada para avaliar as relações filogenéticas entre diferentes espécies, limita-se à espécies estreitamente relacionadas.

I. 4. O grupo *repleta* de *Drosophila*

Dentre os diversos modelos biológicos que são utilizados para estudos evolutivos destacam-se as moscas do gênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), devido principalmente às suas diversas características biológicas, tais como: ciclo de vida rápido, elevado número de descendentes por geração, presença de cromossomos politênicos (gigantes), entre outras; às várias informações genéticas já disponíveis e pela praticidade laboratorial (Monteiro, 1997).

O grupo *repleta* é formado por 92 espécies descritas, constituindo um dos maiores grupos dentro do gênero *Drosophila* (Vilela, 1983; Rafael e Arcos, 1989; Wasserman, 1992). Originário do continente Americano, possivelmente dos desertos Mexicanos (Patterson e Stone, 1952), este grupo sofreu uma grande radiação evolutiva a partir desses



desertos, seguida de uma segunda radiação importante, ocorrida presumivelmente na área do Chaco Argentino.

As espécies de *Drosophila* do grupo *repleta* ocupam diferentes habitats, mas sem dúvida, a característica mais notável do grupo é a capacidade de muitas espécies utilizarem como nicho trófico os tecidos de cactos em decomposição. Esta adaptação é que tem permitido ao grupo ocupar os desertos e as zonas áridas do Novo Mundo (Ruiz e Fontdevila, 1981).

O grupo *repleta* é composto atualmente por 6 subgrupos: *hydei*, *mercatorum*, *mulleri*, *repleta*, *fasciola* e *inca* (Paterson e Stone, 1952; Wasserman, 1962; Rafael e Arcos, 1989). Cada subgrupo tem sido subdividido, por sua vez, em complexos, ou seja, conjuntos de espécies que compartilham em sua filogenia cromossômica uma ou mais inversões, o que indica sua procedência de um mesmo ancestral. Além disso, cada complexo pode conter um ou mais *clusters* de espécies estreitamente relacionadas entre si.

Dentre as espécies desses subgrupos, somente as do subgrupo *fasciola* são de áreas de matas, enquanto que as outras são de regiões áridas. As do subgrupo *mulleri* utilizam as cactáceas como local de criação, ao passo que as dos subgrupos restantes (*mercatorum*, *repleta* e *hydei*) são generalistas (Pereira *et al.*, 1983).

O subgrupo *mulleri* é o mais numeroso dos seis, com 44 espécies (Wasserman, 1992). Segundo Wasserman, este subgrupo apresenta seis complexos de espécies aparentadas: *meridiana*, *anceps*, *eremophila*, *stalker*, *mulleri* e *martensis*; sendo considerado, por este autor, como o subgrupo mais interessante para estudos evolutivos referentes ao processo de especiação.

De acordo com Wasserman (1954, 1962, 1982), o ancestral do subgrupo *mulleri* consistia de um número de populações distintas, semi-isoladas citologicamente, as quais, por conveniência, foram referidas como



subespécies. Cada subespécie deu origem, aparentemente por meio de especiação por isolamento geográfico, à diversas espécies. A progênie das espécies de cada subespécie ancestral foram agrupadas em seis *clusters* de espécies: *mojavensis*, *longicornis*, *ritae*, *buzzatii*, *martensis* e *mulleri*. Os *clusters mojavensis*, *longicornis* e *ritae* são essencialmente Norte Americanos; os *clusters buzzatii* e *martensis* são primariamente da América do Sul; enquanto que o *cluster mulleri* é representado no Novo Mundo.

I. 5. O *cluster buzzatii*

O complexo *buzzatii*, pertencente ao subgrupo *mulleri*, compreende os *clusters martensis*, *stalker* e *buzzatii*. O *cluster buzzatii*, que é o de interesse neste trabalho, é composto por cinco espécies: *Drosophila buzzatii*, nativa da América do Sul e subcosmopolita (Wasserman, 1962); *D. borborema*, que ocorre no nordeste do Brasil e em Grão-Mongol no estado de Minas Gerais (Vilela e Sene, 1977; Tidon-Sklorz e Sene, 1995c); *D. koepferae*, da Argentina e Bolívia (Fontdevila *et al.*, 1988); *D. serido*, registrada no nordeste, centroeste, sudeste e sul do Brasil (Vilela e Sene, 1977; Sene *et al.*, 1982, 1988; Tosi e Sene, 1989; Silva e Sene, 1991) e *D. seriema*, restrita à cadeia do Espinhaço no nordeste brasileiro (Tidon-Sklorz e Sene, 1995b).

A comparação da morfologia do edeago da espécie *D. buzzatii* com a das espécies de *D. serido* (tipos A, B e D de edeagos), *D. seriema* (tipo C de edeago), *D. koepferae* (tipo E de edeago) e *D. borborema*, mostrou que estas quatro últimas espécies possuem uma grande semelhança morfológica, o que sugere uma ancestralidade comum. Deste modo, estas espécies foram agrupadas por Ruiz *et al.* (1996) em um subgrupo à parte de *D. buzzatii*, o *subcluster serido*.



Além da sua fidelidade ecológica aos cactos, o *cluster buzzatii* apresenta uma ampla distribuição através de diferentes formações vegetais da América do Sul, o que o torna útil para estudos da influência dos ciclos paleoclimáticos do Quaternário, período no qual os domínios de vegetação variaram em extensão e o chaco ligou-se à caatinga. Estes ciclos ocorreram há cerca de 13 a 18 milhões de anos (Ab'Saber, 1977) e foram responsáveis pela expansão e contração da vegetação seca, formando áreas de refúgios e isolando populações. Devido à importância dos ciclos paleoclimáticos na diferenciação de populações tropicais na América do Sul (Ab'Saber, 1977), Sene *et al.* (1982, 1988) propuseram que esses ciclos tenham sido responsáveis pela diferenciação desse *cluster*.

O mapeamento e distribuição geográfica de *D. serido* através de vários marcadores demonstrou que essa espécie é politípica, constituída de várias subespécies. Dentre esses diversos marcadores, a morfologia da genitália é considerada a principal característica para diagnosticar e separar espécies (Vilela, 1983). Para Silva e Sene (1991), uma variação geográfica neste caráter poderia representar o início de um processo de diferenciação interpopulacional, que eventualmente resultaria em especiação.

Dessa forma, as populações de *D. serido* são caracterizadas em cinco tipos diferentes, baseados na diferença da morfologia da genitália do macho (Tipos A, B, C, D e E). As populações com tipo morfológico A de edeago são encontradas no nordeste do Brasil, à leste da Cadeia do Espinhaço e ao longo da costa Atlântica do nordeste até o estado do Rio Grande do Sul. O tipo B de edeago está presente nas populações da parte oeste da caatinga e das regiões centro-sudeste do Brasil. As populações tipo C, que foram elevadas ao nível de espécie por Tidon-Sklorz e Sene (1995b) recebendo o nome de *Drosophila seriema*, são endêmicas da Cadeia do Espinhaço. O tipo morfológico D de edeago é encontrado nas populações das regiões sul e sudeste do Brasil e ao norte da borda leste do chaco Argentino. Finalmente, as populações tipo E, que foram elevadas à categoria de espécie



por Fontdevila *et al.* (1988) com o nome de *Drosophila koepferae*, ocorrem nas encostas dos Andes, na Argentina, Bolívia e Comarapa, na borda oeste do chaco.

Um cladograma hipotético ilustrando a história evolutiva do *cluster* (Tidon-Sklorz, 1995a.; Monteiro, 1997) foi elaborado com base nas inversões cromossômicas (Tosi e Sene, 1989), nos cinco tipos diferentes de edeagos (Silva e Sene, 1991) e nos seis tipos de cariótipos (Baimai *et al.*, 1983). Segundo esses estudos, no final do Plioceno e começo do Pleistoceno, populações ancestrais polimórficas adaptadas a uma variedade de cactos teriam invadido o Brasil chegando até à Argentina. A fixação da inversão 5g nas populações argentinas deu origem à *D. buzzatii*. Dessa forma, dois principais ramos filéticos iniciais se originaram, de um lado *D. buzzatii* e de outro formas ancestrais das demais espécies desse *cluster*, que hoje estão agrupadas formando o *subcluster serido*.

Três inversões diferentes separaram essas formas ancestrais. A inversão 2j⁹ ocorreu em populações do Chaco Argentino, caracterizando *D. koepferae* que posteriormente adquiriu o tipo de edeago e cariótipo específicos. A inversão 2x⁷ ocorreu em populações da região centro-sul e litoral do Brasil, que posteriormente se diferenciaram dando origem à *D. serido* D e *D. serido* A, assim denominadas de acordo com o tipo de edeago apresentado. *Drosophila serido* D apresenta cariótipo específico (met 5). A inversão 2e⁸ é compartilhada por moscas adaptadas ao cacto *Pilosocereus*. Houve uma diferenciação nas populações que possuem essas inversões, verificada pela diferenciação quanto à morfologia do edeago. Essa diferenciação deu origem, nas populações do Brasil-central, à *D. serido* B (edeago tipo B), nas populações do nordeste brasileiro, à *D. seriema* (edeago tipo C) e à *D. borborema* (edeago tipo bo).

Dessa forma, dentro desse *cluster*, temos entidades bem definidas e isoladas que são as espécies já descritas e, por outro lado,



existem populações também diferenciadas em alguns aspectos, mas talvez não o suficiente para o "status" de espécie, como por exemplo *D. serido* que possui as entidades A, B e D. Monteiro (1997) sugeriu que *D. serido* B e *D. serido* D podem ser elevadas à categoria de espécie. O trabalho, descrevendo-as como novas espécies encontra-se no prelo (Tidon-Sklorz, R. comunicação pessoal).

Várias linhagens geográficas de *Drosophila serido*, *D. seriema*, *D. buzzatii* e *D. koepferae* já foram previamente analisadas através de diferentes marcadores clássicos como: cariótipo (Baimai *et al.*, 1983), isolamento reprodutivo (Bizzo, 1983; Madi-Ravazzi, 1988, 1992; Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992; Madi-Ravazzi *et al.*, 1997; Machado, 1998), inversões cromossômicas (Tosi, 1982; Tosi e Sene, 1989), tipos de edeagos (Vilela e Sene, 1977; Silva, 1981; Silva e Sene, 1991), grau de sinapse nos cromossomos politênicos (Madi-Ravazzi, 1988, 1992; Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992; Madi-Ravazzi *et al.*, 1997; Machado, 1998), isolamento sexual (Moraes, 1992), padrão de esterases (Lapenta, 1992, 1998; Lapenta *et al.*, 1995), análise morfométrica (Tidon-Sklorz, 1992; Monteiro, 1997) e cromossomos metafásicos (Kuhn *et al.*, 1996). Recentemente, foi utilizado o DNA mitocondrial (Rossi, *et al.*, 1996; Manfrin, 1997) como marcador molecular. A comparação desses resultados indica que as populações dessas espécies encontram-se em estágios distintos de diferenciação.



I. 6. Objetivos

O presente trabalho propôs analisar linhagens de espécies classificadas como *D. serido* tipo B e tipo D de edeago, *D. seriema*, *D. koepferae* e *D. buzzatii* utilizando RAPD como marcador genético, com os seguintes objetivos:

- a) Implantar e adequar a metodologia de análise RAPD para as espécies de *Drosophila* em estudo;
- b) avaliar o nível de polimorfismo do DNA dentro e entre as linhagens estudadas;
- c) estabelecer as relações de proximidade genética entre as linhagens, utilizando RAPD como marcador genético.

ESPECIES	LINHAGENS	PROCEDÊNCIA
<i>Drosophila serido</i> tipo B	A55F11*	Bela Vista (MS, Brasil)
<i>Drosophila serido</i> tipo D	B31D1*	Puerto Tirol (Chaco, Argentina)
<i>Drosophila seriema</i>	A95F3*	Serra do Cipó (MG, Brasil)
	D72M**	Morro do Chapéu (BA, Brasil)
<i>Drosophila buzzatii</i>	3B*	Cafarnaum (BA, Brasil)
	D69R3**	Localidade s. nome (BA, Brasil)
	D69K2**	Localidade s. nome (BA, Brasil)
<i>Drosophila koepferae</i>	B20D2*	Tapia (Tucuman, Argentina)
	B25D7*	Famatina (La Rioja, Argentina)

As linhagens foram cedidas pelo Depto. Genética da USP de Ribeirão Preto; * linhagens mantidas em laboratório desde 1982, ** linhagens mantidas desde 1990. * Estas linhagens vieram classificadas como *D. serido* tipo B, baseado em dados do presente trabalho e na análise do edeago, foram incluídas em *D. buzzatii*.



II. MATERIAL E MÉTODOS

II. 1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *Drosophila serido*, *D. buzzatii*, *D. koepferae* e *D. seriema* que foram utilizadas no presente trabalho estão relacionadas na Tabela 1 e sua localização geográfica demonstrada na Figura 1. Como grupo externo, foram utilizadas linhagens das espécies *D. mulleri* (coletadas no Texas - USA) e *D. simulans* (coletadas em São José do Rio Preto - SP, Brasil).

Tabela 1- Espécies de *Drosophila* do cluster *buzzatii*, linhagens e procedência geográfica.

ESPÉCIES	LINHAGENS	PROCEDÊNCIA
<i>Drosophila serido</i> tipo B	A55F11*	Bela Vista (MS, Brasil)
<i>Drosophila serido</i> tipo D	B31D1*	Puerto Tirol (Chaco, Argentina)
<i>Drosophila seriema</i>	A95F3*	Serra do Cipó (MG, Brasil)
	D72M**	Morro do Chapéu (BA, Brasil)
<i>Drosophila buzzatii</i>	3B*	Cafarnaum (BA, Brasil)
	D69R5**•	Localidade s. nome (BA, Brasil)
	D69R2**•	Localidade s. nome (BA, Brasil)
<i>Drosophila koepferae</i>	B20D2*	Tapia (Tucuman, Argentina)
	B25D7*	Famatina (La Rioja, Argentina)

As linhagens foram cedidas pelo Depto. Genética da USP de Ribeirão Preto; * linhagens mantidas em laboratório desde 1982, ** linhagens mantidas desde 1990. • Estas linhagens vieram classificadas como *D. serido* tipo B, baseado em dados do presente estudo e na análise do edeago, foram incluídas em *D. buzzatii*.



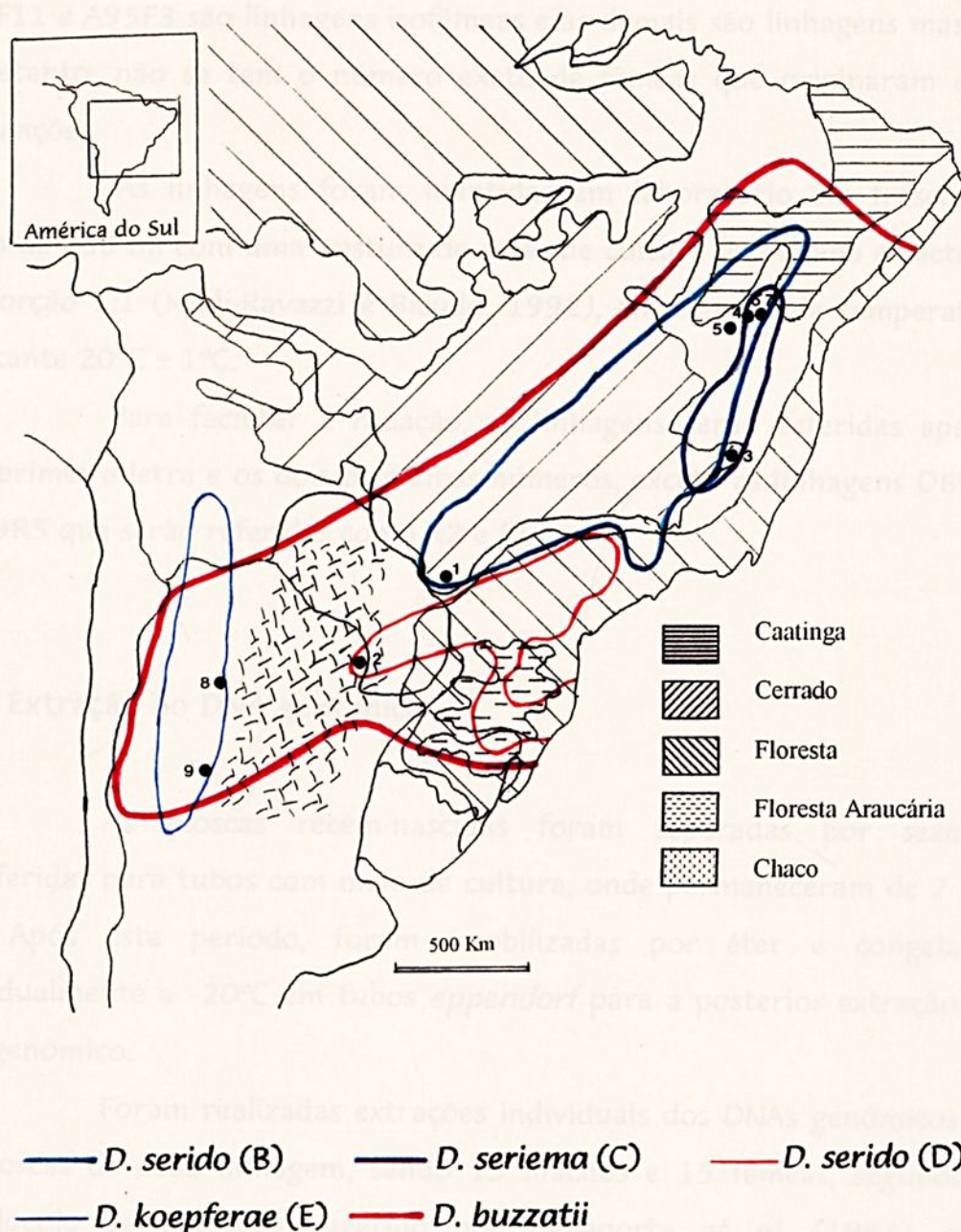


Figura 1. Mapa da vegetação, distribuição das espécies e localização das linhagens analisadas no presente trabalho. 1. A55, 2. B31, 3. A95, 4. D72, 5. 3B, 6. R2, 7. R5, 8. B20, 9. B25. B, C, D, e E = tipos morfológicos de edeago. Extraído de Machado (1998), com modificações.

As informações que vieram do Depto. de Genética da USP de Ribeirão Preto, de onde essas linhagens são procedentes, constam que A55F11 e A95F3 são linhagens isofêmeas e as demais são linhagens massais, entretanto, não se tem o número exato de fêmeas que originaram essas populações.

As linhagens foram mantidas em laboratório em frascos de vidro de 250 ml com uma mistura de meio de cultura de banana e cacto na proporção 1:1 (Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992), em câmara de temperatura constante $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para facilitar a redação, as linhagens serão referidas apenas pela primeira letra e os dois primeiros números, exceto as linhagens D69R2 e D69R5 que serão referidas como R2 e R5.

II. 2. Extração do DNA genômico

As moscas recém-nascidas foram separadas por sexo e transferidas para tubos com meio de cultura, onde permaneceram de 7 a 9 dias. Após este período, foram imobilizadas por éter e congeladas individualmente a -20°C em tubos *ependorf* para a posterior extração do DNA genômico.

Foram realizadas extrações individuais dos DNAs genômicos de 30 moscas de cada linhagem, sendo 15 machos e 15 fêmeas, segundo o protocolo de extração sugerido por Dellaporta *et al.* (1983), com modificações.

Em cada *ependorf* foram adicionados 160 μl de Solução I fria (Tris 10mM, NaCl 600mM, Sacarose 5%, EDTA 10mM, pH = 7,8) e as moscas foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro. A seguir, adicionou-se 200 μl por *ependorf* de solução II (Tris 300mM, SDS 1,25%, Sacarose 5%, EDTA 10mM, pH = 8,0) e agitou-se por inversão várias vezes. Feito isto,



foram incubados a 65°C durante 30 minutos. Após este período, adicionou-se 60µl de acetato de potássio 3M (pH = 5,0) por *eppendorf*, agitou-se por inversão várias vezes e foram colocados por 20 minutos a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, em temperatura ambiente, por 15 minutos a 14.000 rpm. Decorrido este período, o sobrenadante foi transferido para um novo *eppendorf* e as amostras centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol a -20°C. Os *eppendorfs* foram agitados por inversão várias vezes e mantidos 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi então lavado com 500µl de etanol 70% (-20°C) e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os *eppendorfs* colocados para secar em estufa a 37°C por 15 minutos. O DNA foi ressuspendido em 100µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e guardado a -20°C. Durante todo o procedimento de extração, os *eppendorfs* com as amostras permaneceram acondicionados no gelo.

II. 3. Detecção da presença de DNA nas amostras

As amostras de DNA foram submetidas à análise espectrofotométrica para detecção da concentração de DNA e proteínas. O espectrofotômetro detectou altas concentrações de DNA em todas as amostras, tendo estas uma média de 50ng de DNA por µl da solução. Além disso, a razão DNA/proteína mostrou-se adequada para as metodologias que seriam empregadas neste estudo, ou seja, uma quantidade de DNA duas vezes maior que a quantidade de proteína.



II. 4. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados

Foram adquiridos 10 μ g de cada oligonucleotídeo (cadeias simples de 10 bases) liofilizado, mediante requisição ao Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canadá. Foram preparadas soluções de trabalho de 15 μ M de cada *primer* em tampão Tris/EDTA os quais foram mantidos a -20°C. Foi realizado um *screening* inicial com 16 *primers* (51, 54, 60, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 75, 80, 83, 85, 86, 92 e 100), dos quais três (54, 69 e 86) foram escolhidos para a realização deste trabalho por apresentarem repetibilidade e revelarem polimorfismo entre as linhagens. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Seqüência dos oligonucleotídeos sintéticos.

Oligonucleotídeo	Seqüência 5'- 3'	% GC
54	GTC CCA GAG C	70 %
69	GAG GGC AAG A	60 %
86	GGG GGG AAG G	80 %

II. 5. Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico extraído foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo protocolo descrito por Williams *et al.* (1990), com modificações.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μ l contendo: 20mM de tampão (Tris - Hcl pH 8,3; 50mM KCl);



2mM de $MgCl_2$; 0,2mM de primer; 0,2mM de dNTP; 1U de Taq Polimerase (GIBCO BRL) e 50ng de DNA genômico de *Drosophila*. Ao volume final foram acrescentados 40 μ l de óleo mineral.

A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador (MJ Research Minicycler) programado para 45 ciclos, cada um consistindo dos seguintes passos: 30 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 35°C para anelamento dos *primers* e 2 minutos a 72°C para extensão das cadeias de DNA. O primeiro ciclo foi precedido por uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, que permitiu a inativação de possíveis proteases que pudessem interferir na reação enzimática. Após o último ciclo, a temperatura de 72°C foi mantida por 5 minutos permitindo a extensão final das cadeias de DNA recém-sintetizadas.

As amplificações foram feitas independentemente em quatro termocicladores de mesmo modelo, obtendo resultados reproduzíveis. Além disso, para todas as reações foram realizados controles negativos, isto é, sem a presença de DNA.

II. 6. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%. A agarose foi fundida em tampão TAE 1X (Tris-acetato 4mM, EDTA 1mM, pH 8,5) e despejada sobre a placa horizontal. Após a polimerização, a placa foi transferida para a cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão TAE 1X. Em todos os géis foi aplicado na primeira canaleta da esquerda para a direita 1 μ l DNA marcador de peso molecular 1Kb DNA LADDER (GIBCO-BRL), e nas demais canaletas 15 μ l do produto amplificado, incluindo os controles negativos. Em todas as amostras foi previamente adicionado o tampão de aplicação (40% sacarose, 0,05% azul de bromofenol).



A eletroforese seguiu-se aplicando uma voltagem constante de 75V por 2 horas e 15 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (5µl de brometo de etídio/100ml de solução TAE 1X) por 20 minutos, visualizados por fluorescência em um transiluminador equipado com luz UV e fotografados em filme *Polaroid 667*.

II. 7. Análise dos dados

As bandas, geradas através da amplificação do DNA pela técnica de PCR, foram analisadas quanto à sua presença e ausência no gel, tendo como base as seguintes premissas: primeiro, foi assumido que a interpretação do padrão de bandas nos géis pode ser realizada de uma maneira completamente inambígua, isto é, que produtos de diferentes locos não migram na mesma posição em um gel, e que o investigador é totalmente capaz de fazer a correspondência entre bandas de diferentes linhagens tanto no mesmo gel quanto em géis diferentes; segundo, que cada loco pode ser tratado como um sistema de dois alelos, com um dos alelos sendo amplificado pela PCR. O alelo “nulo” tem a sua amplificação impedida devido à perda de um sítio de iniciação ou devido à uma inserção que levou a distância entre os sítios de iniciação a exceder a capacidade da enzima em adicionar nucleotídeos.

As fotografias dos géis foram criteriosamente reproduzidas em papel milimetrado. Os fragmentos foram selecionados e numerados da extremidade negativa para a positiva do gel. Foram consideradas todas as bandas nítidas ou fortemente coradas e todas as bandas fracamente coradas e reproduzidas em três ou mais indivíduos (10%). Não foram consideradas as regiões nas quais não era possível detectar bandas nítidas.



O tamanho de cada um dos fragmentos amplificados foi estimado em pares de bases, cálculo este, baseado na distância entre o fragmento e a banda mais próxima do DNA marcador de peso molecular.

A presença ou ausência dos fragmentos em cada indivíduo foi comparada tendo como base os géis individuais das linhagens e os géis comparativos e a frequência de amplificação de cada fragmento foi calculada. Bandas que não foram amplificadas em apenas dois indivíduos (93,3%) foram consideradas monomórficas.

O potencial para a diferenciação estatística entre diferentes linhagens foi investigado através de análise discriminativa usando os dados de frequência dos vários grupos de fragmentos amplificados. A relação genética das linhagens analisadas foi estimada pela análise da variação entre linhagens utilizando o Índice de Similaridade descrito por Nei e Li (1979).

$$S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y) \quad \text{onde:}$$

n_{xy} = número de bandas comuns entre x e y;

n_x = número de bandas presentes em x;

n_y = número de bandas presentes em y.

Os valores deste índice variam de 0, representando nenhuma banda compartilhada entre as duas linhagens, a 1, representando completa identidade entre as duas linhagens.

Devido ao fato de todos os dados serem discretos (presença ou ausência de um fragmento), a análise baseada em uma distribuição multivariada normal não pôde ser utilizada (Hills e Moritz, 1990). Dessa forma, foi realizada a análise de *cluster*. A análise de *cluster* (análise de aglomerados) agrupa indivíduos (ou variáveis) de acordo com uma medida de similaridade ou, complementarmente, de distância (Mardia *et al.*, 1980).



Dentre os vários métodos de análise de *cluster*, no presente trabalho foi utilizado o de ligação pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*) que utiliza as médias aritméticas entre as distâncias para agrupar as variáveis; e a distância utilizada foi a Euclidiana. A partir desta análise foi traçado um dendograma para melhor visualização dos resultados.

Essas análises foram realizadas para cada *primer* separadamente, e posteriormente, para os dados combinados de todos os *primers* utilizando-se do programa STATISTICA versão 5.0 para Microsoft Windows.

Ao avaliarmos as linhagens de classificação incerta (R2 e R3), verificamos que essas apresentaram um padrão de bandas muito semelhante à linhagem 3B de *D. buzzatii*. Resultados anteriores da morfologia do adegaço (Torres e Madi-Ravazzi, comunicação pessoal), isolamento reprodutivo (Machado, 1978) e esterases (Lapenta, 1998) também corroboram que essas linhagens sejam de *D. buzzatii*. Assim, na análise dos resultados e na discussão essas linhagens foram agrupadas.



III. RESULTADOS

III. 1. Padrão de bandas de RAPD nas linhagens estudadas

O DNA genômico individual de moscas aleatoriamente amostradas de linhagens de *Drosophila* do *cluster buzzatii* foi amplificado por PCR, utilizando *primers* decaméricos aleatórios.

Não foram observadas bandas específicas de machos ou de fêmeas nos padrões de amplificação com os três *primers* utilizados.

Em todas as linhagens observamos que alguns fragmentos foram mais amplificados que outros, ou seja, houve uma grande variação na intensidade das bandas amplificadas. Essas variações, segundo Goodwin e Annis (1991), podem ser o resultado da competição entre os segmentos de DNA e os *primers*. Esses autores observaram que quando bandas menores foram amplificadas em maiores quantidades, outras bandas de DNA reduziram na intensidade. Como a reprodutibilidade de diferenças quantitativas podem não ser consistentes (Heun e Helentjaris, 1993), somente a presença e ausência de bandas foram analisadas neste estudo.

Ao avaliarmos as linhagens de classificação incerta (R2 e R5), verificamos que essas apresentaram um padrão de bandas muito semelhante à linhagem 3B de *D. buzzatii*. Resultados anteriores da morfologia do edeago (Torres e Madi-Ravazzi, comunicação pessoal), isolamento reprodutivo (Machado, 1998) e esterases (Lapenta, 1998) também corroboram que essas linhagens sejam de *D. buzzatii*. Assim, na análise dos resultados e na discussão essas linhagens foram agrupadas.



III. 1. Padrão de bandas de RAPD nas linhagens estudadas

Considerando-se os três *primers* em conjunto, foram produzidos nas 11 linhagens estudadas 99 fragmentos diferentes. Os padrões RAPD individuais apresentaram de cinco a 12 bandas, que variaram de aproximadamente 290 a 5090 pares de bases de comprimento.

Fragmentos superiores a 2.000 pb foram amplificados em pequeno número pelos três *primers* utilizados: cinco com o *primer* 54, sete com o 69 e quatro com o 86. Também foram considerados produtos de amplificação os fragmentos superiores a 4.000 pb, amplificados pelo *primer* 54, nas linhagens A55, B20 e B25, por terem sido encontrados em 100% dos indivíduos analisados.

a) *Primer* 54

A Figura 2 mostra o esquema representativo e a Figura 3 o gel comparativo do padrão de bandas obtido com o *primer* 54 para cada uma das linhagens estudadas. No total foram obtidos 29 fragmentos variando entre aproximadamente 499 e 5090 pares de bases. Destes, apenas o fragmento 18 foi comum a todas as linhagens, exceto para *D. mulleri*.

Utilizando-se esse *primer*, as linhagens de *D. mulleri* e *D. simulans* amplificaram, respectivamente, nove e sete fragmentos que variaram de aproximadamente 500 a 2200 pares de bases.

Comparando as linhagens incluídas na espécie *D. buzzatii*, foram verificadas algumas diferenças entre a presença e a ausência de alguns fragmentos. As bandas 15 e 21 foram específicas das linhagens dessa espécie (Figura 4). A banda 8 foi encontrada somente em R2, e as bandas 2 e 20



não foram amplificadas em R5. Além disso, a banda 2, que esteve presente em 3B e R2, não ocorreu em nenhuma outra linhagem estudada. A linhagem 3B foi a única que apresentou a banda 14 e não mostrou as bandas 11 e 12.

A linhagem B31 de *D. serido* tipo D apresentou cinco bandas sendo a 19 exclusiva dessa linhagem (Figura 5).

As linhagens D72 e A95 de *D. seriema* diferiram entre si em apenas dois fragmentos (27 e 28) presentes em D72, e apresentaram a banda 26 como exclusiva da espécie (Figura 5).

Com exceção dos fragmentos 12, 27 e 28, todos os fragmentos presentes na linhagem A55 de *D. serido* tipo B foram comuns às linhagens de *D. koepferae* (B20 e B25). Em adição, a banda 1 foi amplificada somente em A55, B20 e B25 (Figura 6).

Comparando-se os padrões de bandas obtidos nas linhagens de *D. koepferae* observou-se que B25 diferiu de B20 por apresentar a banda 22. As demais bandas foram comuns às duas linhagens e a banda 23 foi específica para as linhagens dessa espécie (Figura 6).

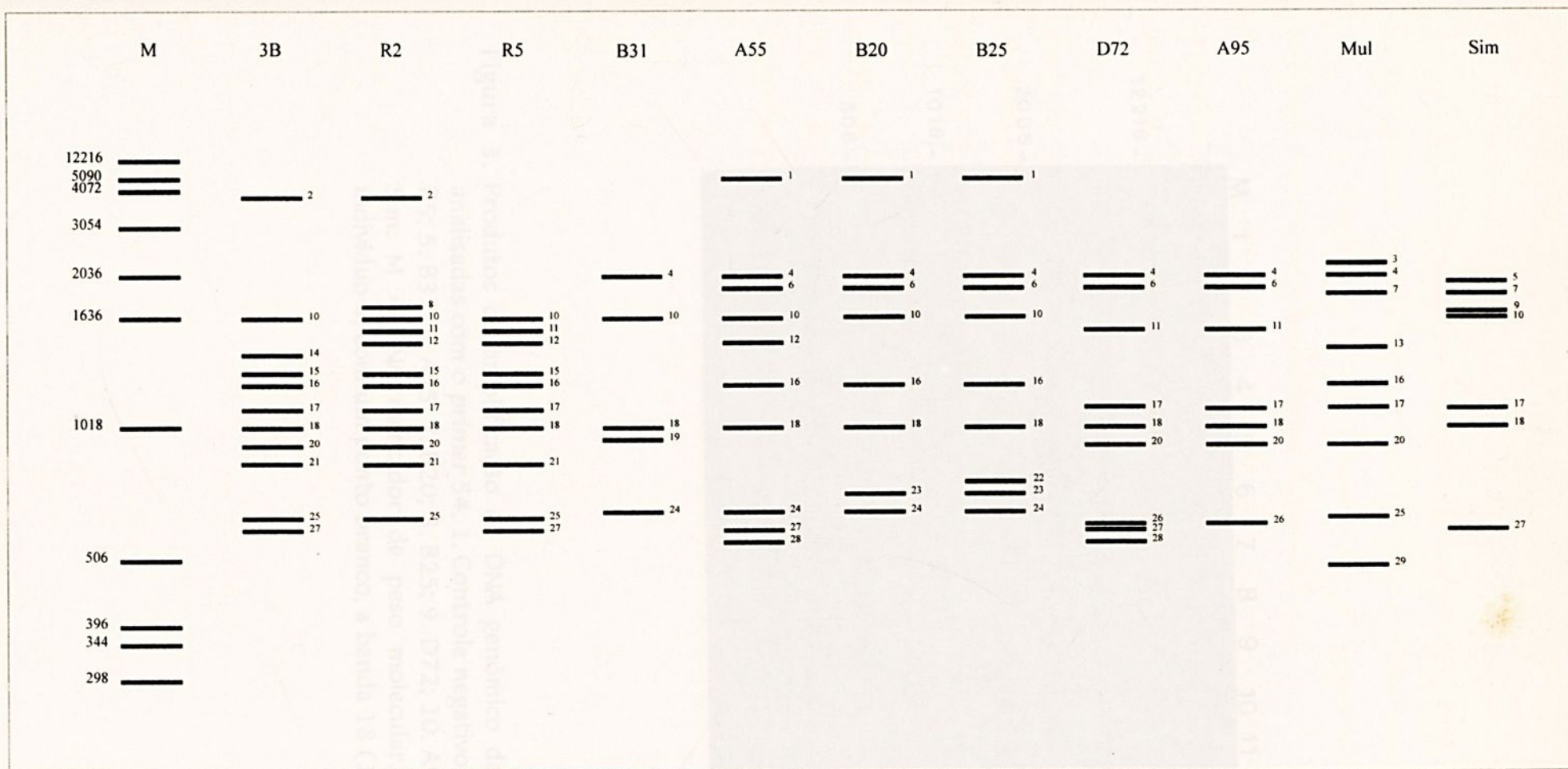


Figura 2. Padrão de bandas das linhagens estudadas com o *primer* 54. M = DNA marcador de peso molecular. A numeração das bandas está representada à direita.



Figura 3. Produtos de amplificação do DNA genômico das 11 linhagens analisadas com o *primer* 54. 1. Controle negativo; 2. 3B; 3. R2; 4. R5; 5. B31; 6. A55; 7. B20; 8. B25; 9. D72; 10. A95; 11. Mul; 12. Sim. M = DNA marcador de peso molecular. Assinalada no indivíduo 4, com um ponto branco, a banda 18 (1018 pb).

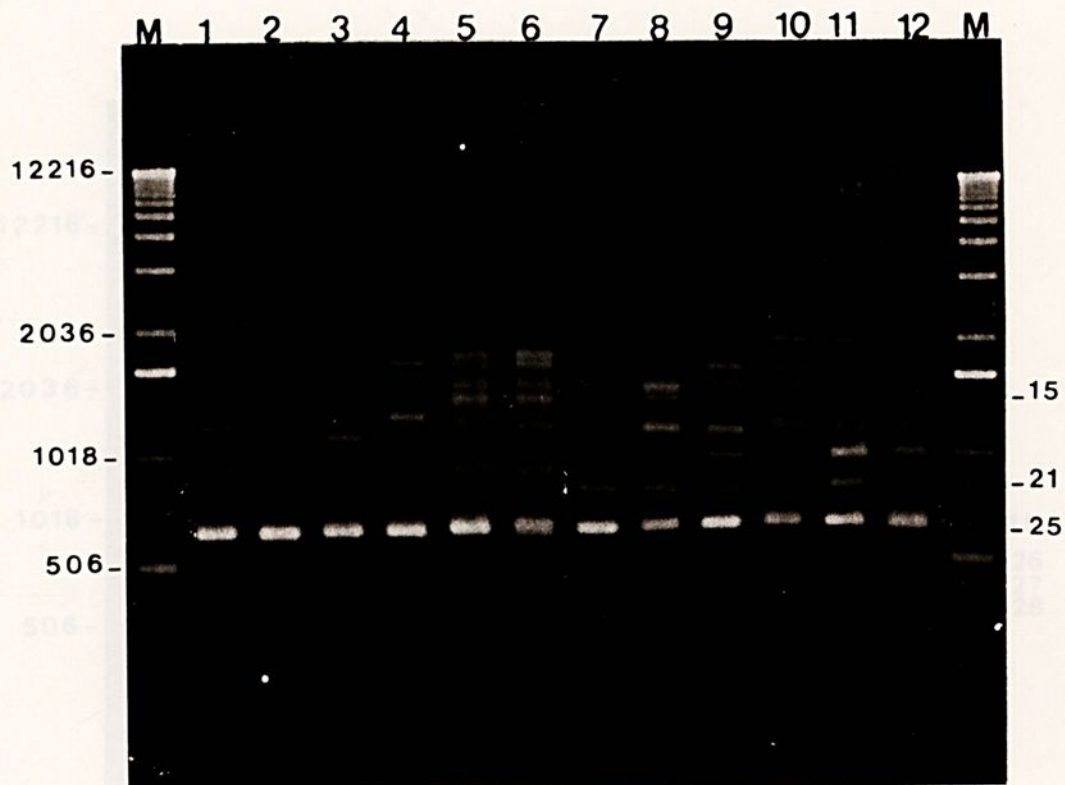


Figura 4. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens 3B (1-4), R2 (5-8) e R5 (9-12) incluídas em *D. buzzatii* com o *primer* 54. M = DNA marcador de peso molecular; bandas 15 e 21, exclusivas das linhagens incluídas nessa espécie; banda 25, monomórfica nas três linhagens.

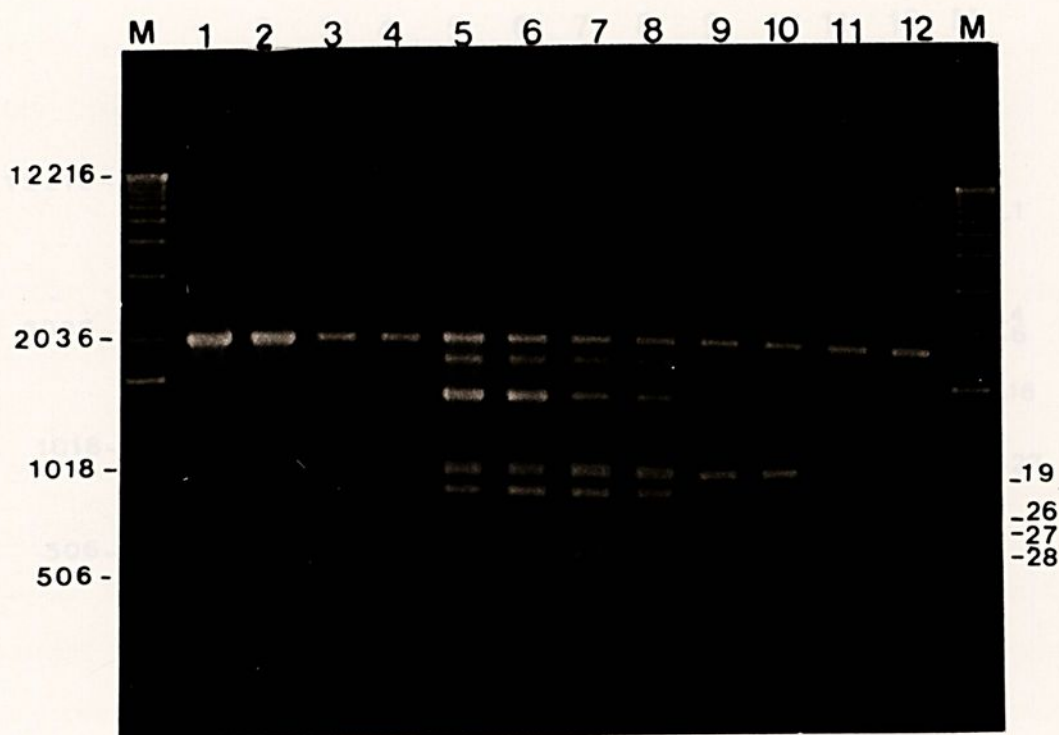


Figura 5. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens B31 (1-4) de *D. serido* tipo D, D72 (5-8) e A95 (9-12) de *D. seriema* com o *primer* 54. M = DNA marcador de peso molecular; banda 19, exclusiva de B31; banda 26, exclusiva de D72 e A95; bandas 27 e 28, presentes em D72 e ausentes em A95.

b) *Primer 69*

A Figura 7 mostra o esquema representativo e a Figura 8 o gel comparativo do padrão de bandas obtido com o *primer 69* para as linhagens estudadas. No total foram obtidos 37 fragmentos, variando entre aproximadamente 12216 e 506 pb.

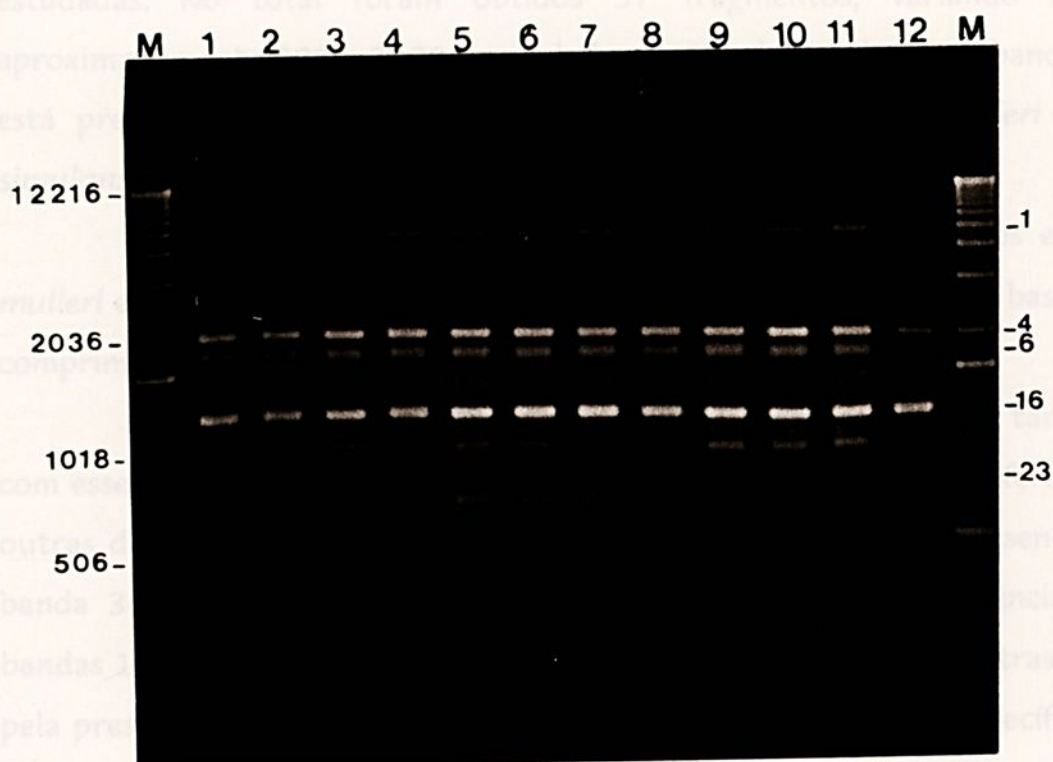


Figura 6. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens A55 (1-4) de *D. serido* tipo B, B20 (5-8) e B25 (9-12) de *D. koepferae* com o *primer 54*. M = DNA marcador de peso molecular; banda 1, exclusiva das três linhagens; banda 23, exclusiva de *D. koepferae*; bandas 4, 6 e 16, monomórficas nas três linhagens.

b) *Primer 69*

A Figura 7 mostra o esquema representativo e a Figura 8 o gel comparativo do padrão de bandas obtido com o *primer 69* para as linhagens estudadas. No total foram obtidos 37 fragmentos, variando entre aproximadamente 300 e 2900 pares de bases. Foi observado que a banda 17 está presente em todas as linhagens, com exceção de *D. mulleri* e *D. simulans*.

Com esse *primer* foram amplificados nove fragmentos em *D. mulleri* e 7 em *D. simulans*, que variaram de 519 a 2936 pares de bases de comprimento.

As linhagens incluídas como *D. buzzatii* apresentaram, também com esse *primer*, padrões de bandas semelhantes. A linhagem 3B diferiu das outras duas principalmente pela ausência da banda 10 e pela presença da banda 34 que foi linhagem-específica, e diferiu de R2 pela ausência das bandas 10, 19 e 30 e presença da 34. A linhagem R2 diferiu das outras duas pela presença das bandas 30 e 36, sendo essa última linhagem-específica. A linhagem R5 diferiu das outras pela presença da banda 8. Os fragmentos 15 e 31 foram comuns a essas três linhagens e específicos de *D. buzzatii* (Figura 9).

Dos nove fragmentos amplificados na linhagem B31 de *D. serido* tipo D, as bandas 32, 33 e 37 foram específicas da mesma (Figura 10).

A linhagem D72 diferiu de A95 por apresentar a banda 6, 13 e 35 e por não apresentar a banda 24 (Figura 10).

Todas as bandas amplificadas na linhagem A55 de *D. serido* tipo B também foram amplificadas nas linhagens de *D. koepferae* (Figura 11).

A linhagem B20 diferiu de B25 por apresentar as bandas 3, 7 e 28 e pela ausência das bandas 12 e 23.



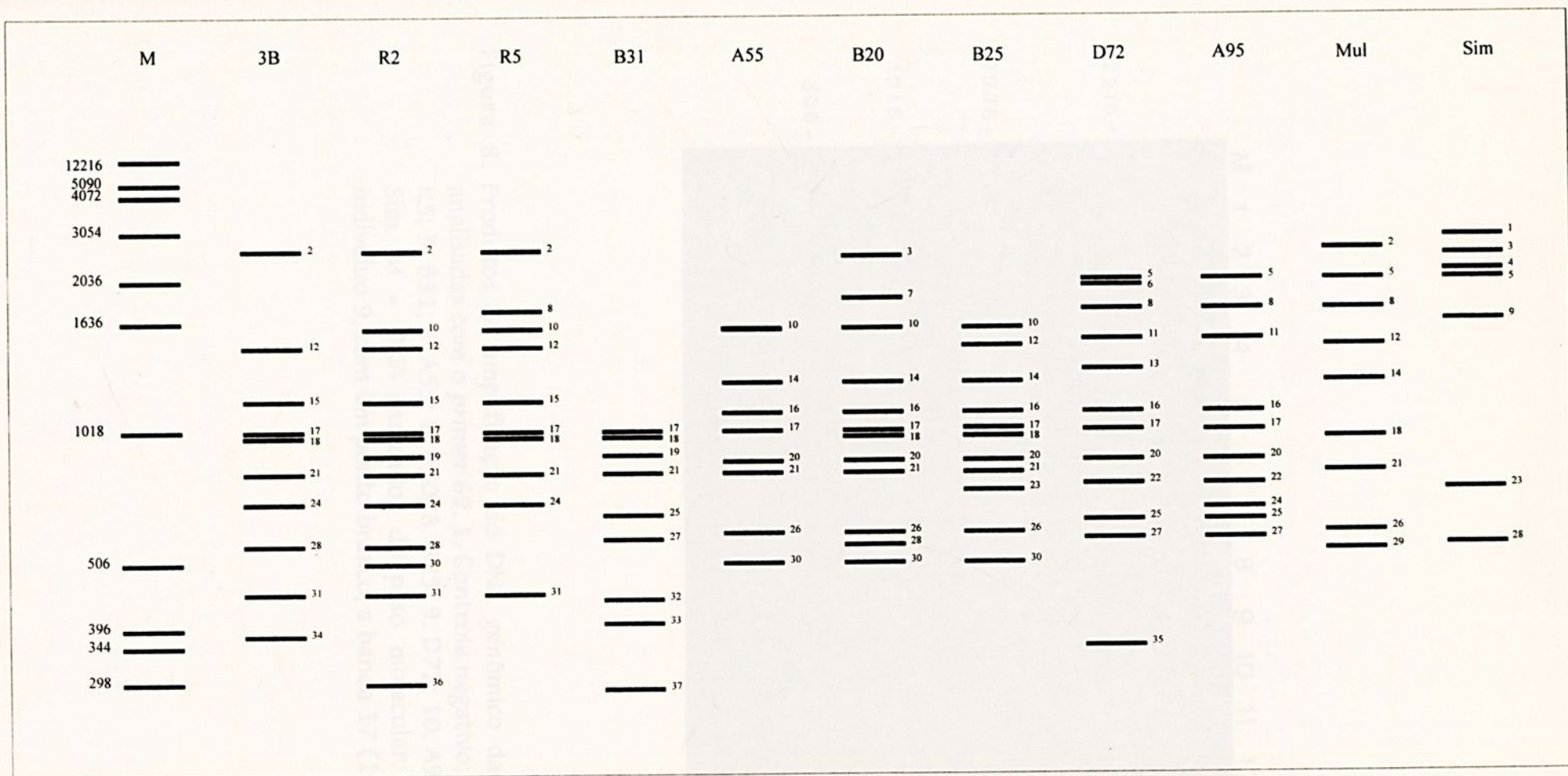


Figura 7. Padrão de bandas das linhagens estudadas com o *primer* 69. M = DNA marcador de peso molecular. A numeração das bandas está representada à direita.

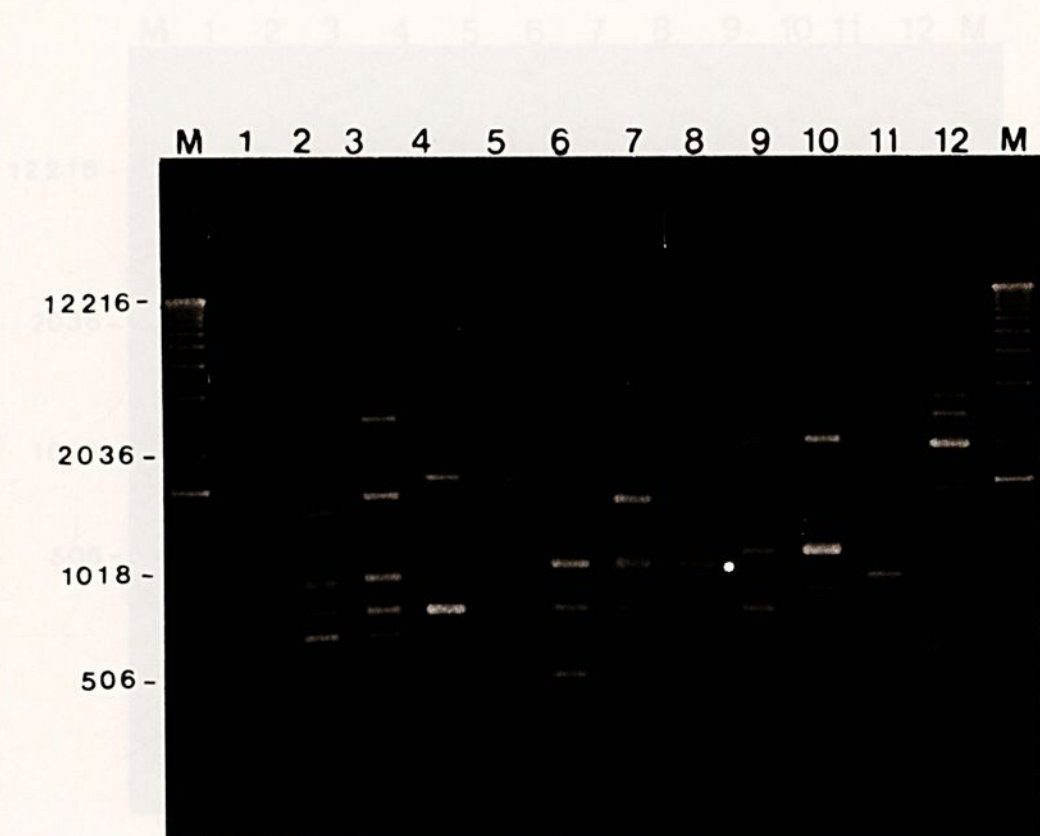


Figura 8. Produtos de amplificação do DNA genômico das 11 linhagens analisadas com o *primer* 69. 1. Controle negativo; 2. 3B; 3. R2; 4. R5; 5. B31; 6. A55; 7. B20; 8. B25; 9. D72; 10. A95; 11. Mul; 12. Sim. M = DNA marcador de peso molecular. Assinalada no indivíduo 9, com um ponto branco, a banda 17 (1018 pb).

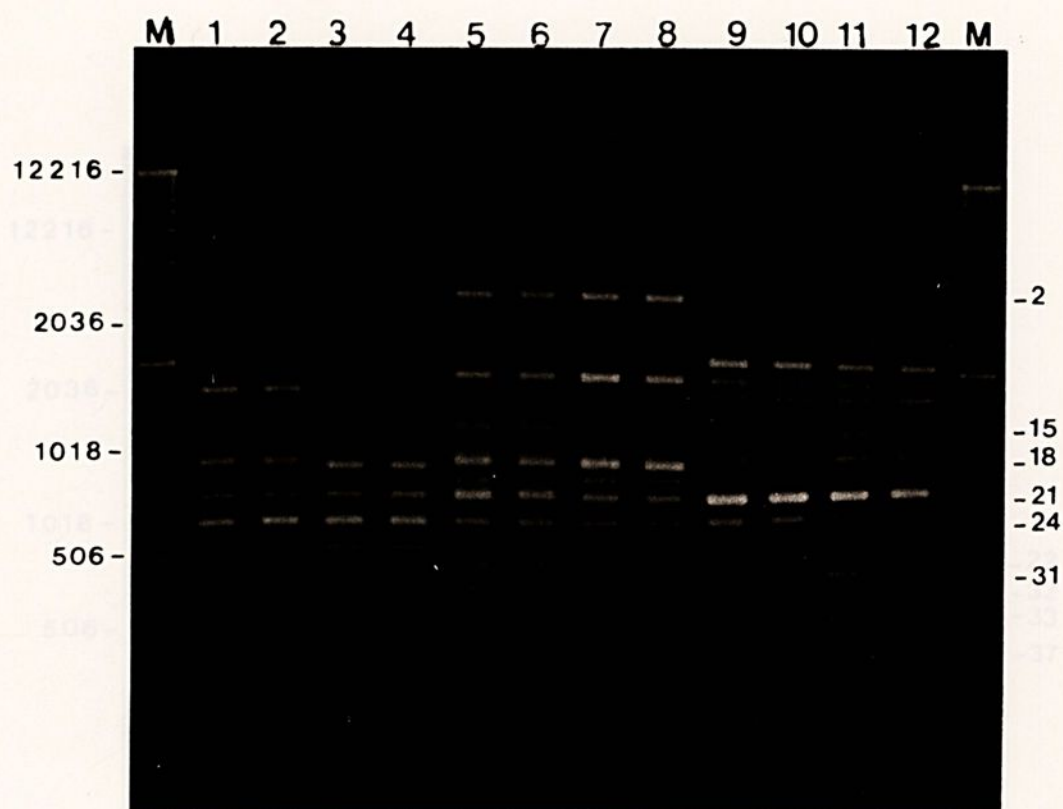


Figura 9. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens 3B (1-4), R2 (5-8) e R5 (9-12) incluídas em *D. buzzatii* com o *primer* 69. M = DNA marcador de peso molecular; bandas 15 e 31, exclusivas das linhagens incluídas nessa espécie; banda 2, monomórfica em R2 e R5; bandas 18, 21 e 24, monomórficas nas três linhagens.

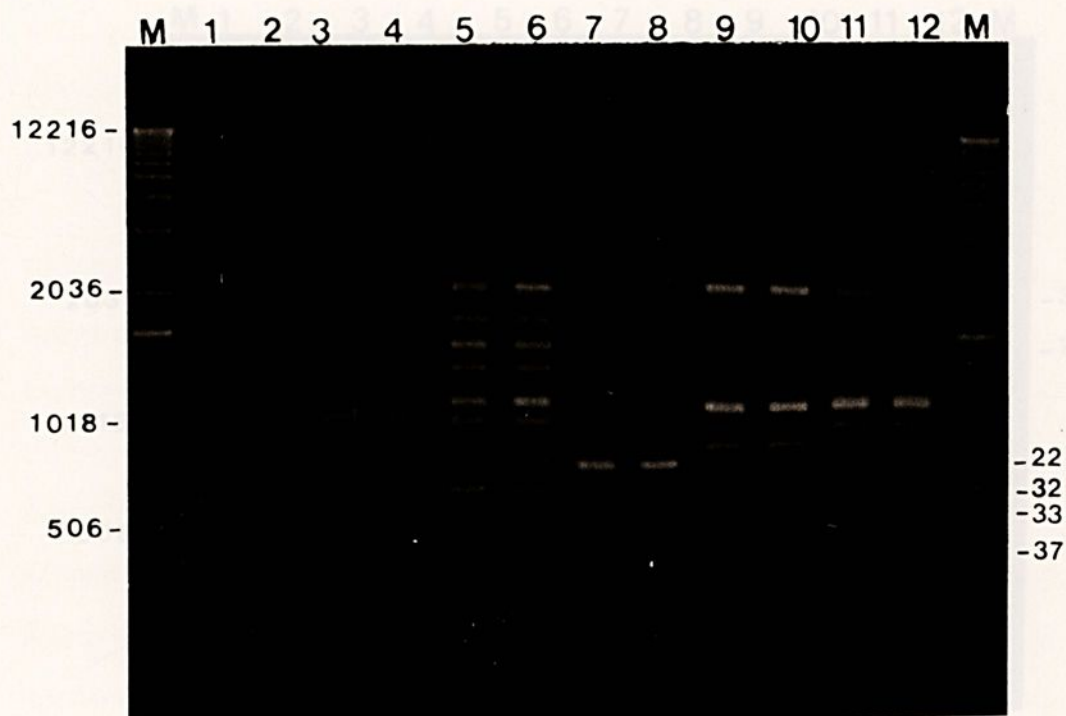


Figura 10. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens B31 (1-4) de *D. serido* tipo D, D72 (5-8) e A95 (9-12) de *D. seriema* com o *primer* 69. M = DNA marcador de peso molecular; bandas 32, 33 e 37 exclusivas de B31; banda 22, monomórfica em D72 e A95.

C) Primer 86

A Figura 12 mostra o esquema representativo e a Figura 13 o gel comparativo do padrão de bandas obtido com o primer 86 nas linhagens estudadas.

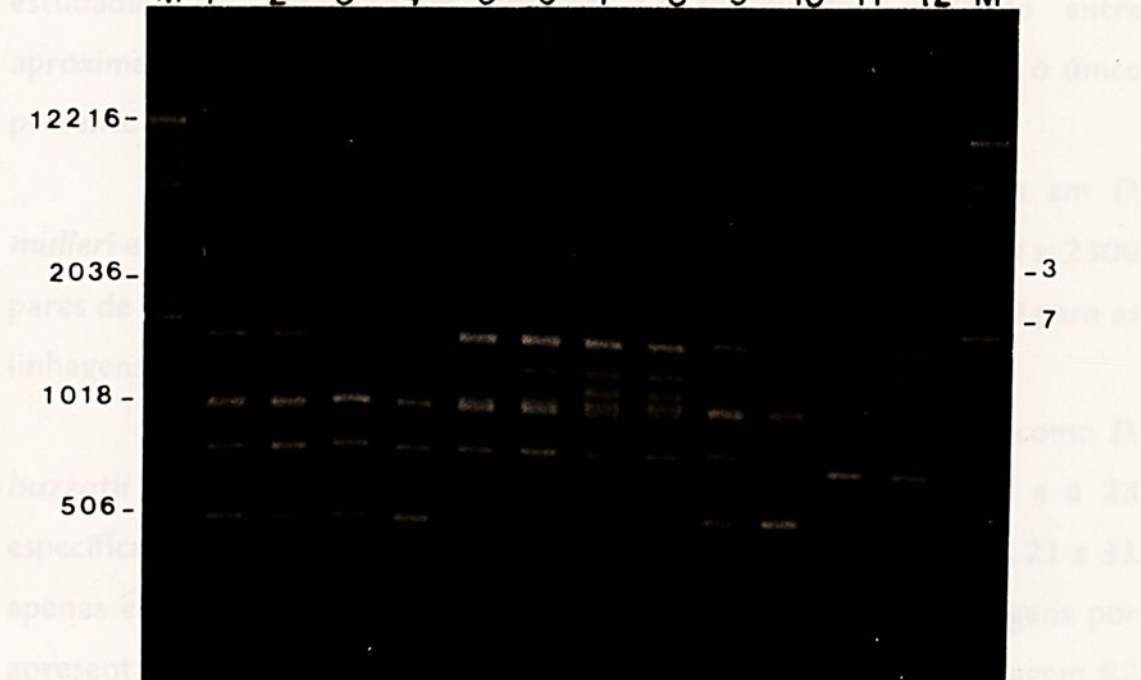


Figura 11. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens A55 (1-4) de *D. serido* tipo B, B20 (5-8) e B25 (9-12) de *D. koepferae* o primer 69. M = DNA marcador de peso molecular; bandas 3 e 7, exclusivas de B20.

Com esse primer, a linhagem B31 de *D. serido* tipo D, amplificou cinco fragmentos, sendo que o fragmento 28 foi linhagem-

Dos oito fragmentos amplificados em A55 (*D. serido* tipo B), apenas um (fragmento 16) foi exclusivo dessa linhagem (Figura 17).

A linhagem B20 diferiu de B25 por apresentar as bandas 5 e 11 e pela ausência da banda 9 (Figura 17).

c) *Primer 86*

A Figura 12 mostra o esquema representativo e a Figura 13 o gel comparativo do padrão de bandas obtido com o *primer* 86 nas linhagens estudadas. No total foram obtidos 33 fragmentos, variando entre aproximadamente 290 e 2400 pares de bases. O fragmento 18 foi o único presente em todas as linhagens.

Com esse *primer* foram amplificados 11 fragmentos em *D. mulleri* e 12 em *D. simulans*, variando entre aproximadamente 760 e 2300 pares de bases de comprimento. A Figura 14 mostra o padrão RAPD para as linhagens de *D. mulleri* e *D. simulans* com os três *primers*.

A banda 26 foi específica para as linhagens incluídas como *D. buzzatii* (Figura 15). As bandas 1 e 33 foram exclusivas de 3B e a 23 específica de R2. A banda 7 ocorreu apenas em R2 e R5 e as bandas 21 e 31 apenas em 3B e R2. A linhagem 3B diferiu das outras duas linhagens por apresentar as bandas 1, 4 e 24 e pela ausência da banda 7. A linhagem R2 diferiu das outras duas linhagens pela presença da banda 23, e R5 diferiu das outras duas linhagens pela ausência das bandas 21 e 31.

Com esse *primer*, a linhagem B31 de *D. serido* tipo D, amplificou cinco fragmentos, sendo que o fragmento 28 foi linhagem-específico (Figura 16).

As linhagens de *D. seriema* apresentaram os fragmentos 6 e 27 como espécie-específicos (Figura 16). E ainda, D72 diferiu de A95 pela presença das bandas 8, 10 e 13 e pela ausência das bandas 11, 12 e 22.

Dos oito fragmentos amplificados em A55 (*D. serido* tipo B), apenas um (fragmento 16) foi exclusivo dessa linhagem (Figura 17).

A linhagem B20 diferiu de B25 por apresentar as bandas 5 e 11 e pela ausência da banda 9 (Figura 17).



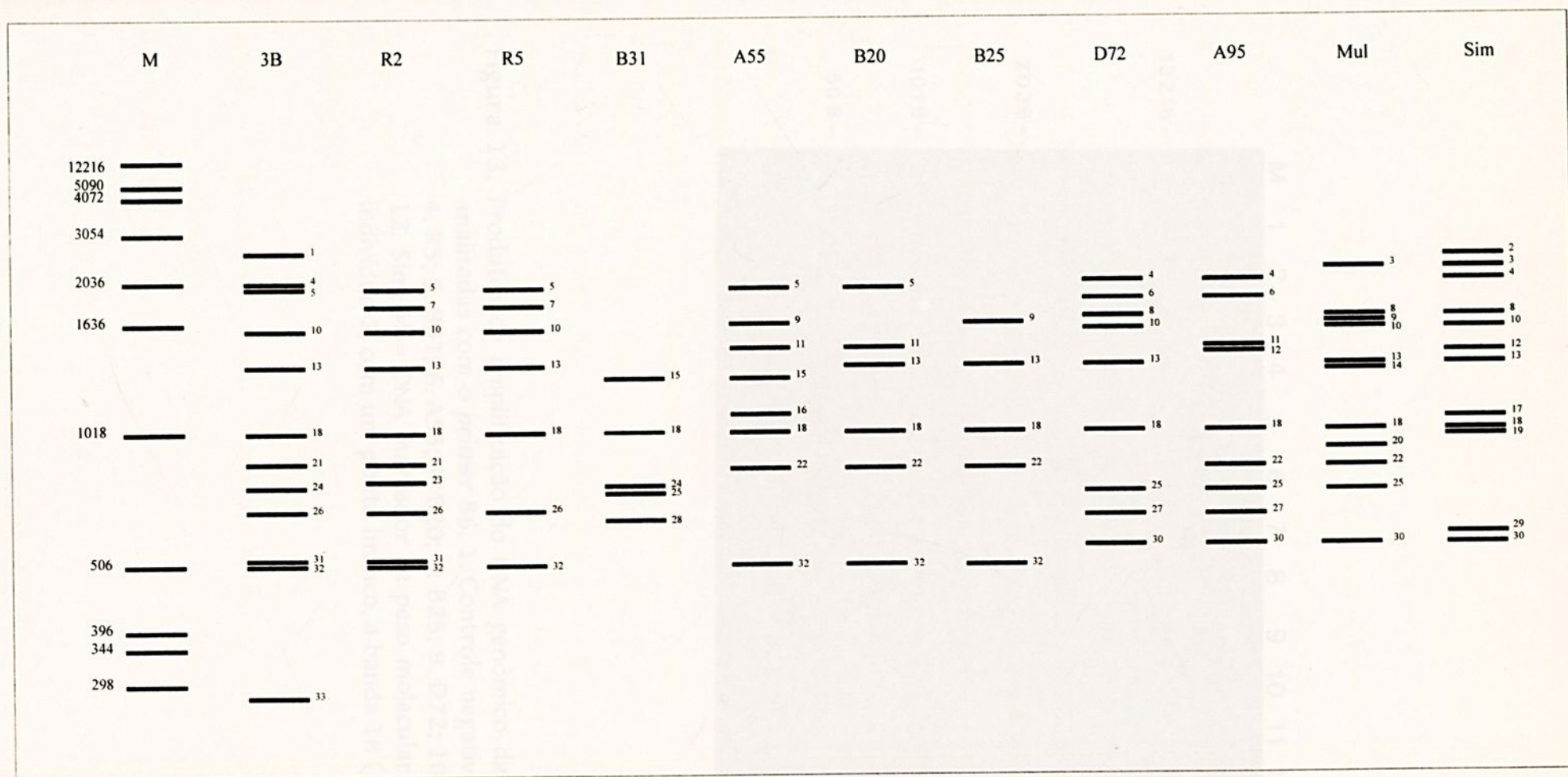


Figura 12. Padrão de bandas das linhagens estudadas com o *primer* 86. M = DNA marcador de peso molecular. A numeração das bandas está representada à direita.

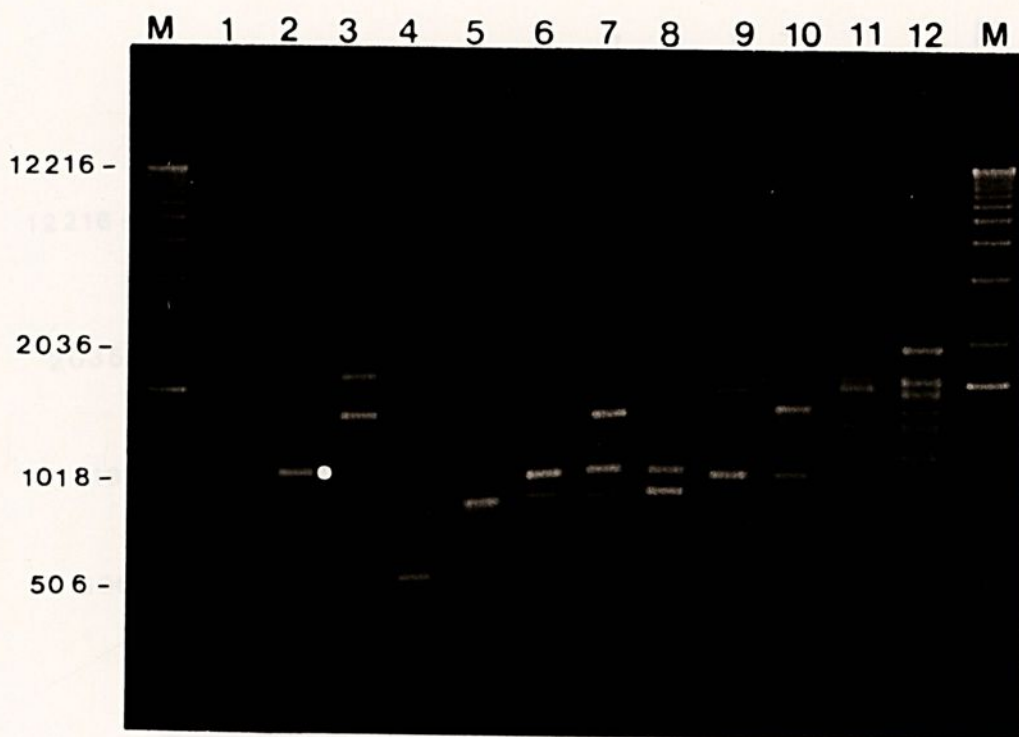


Figura 13. Produtos de amplificação do DNA genômico das 11 linhagens analisadas com o *primer* 86. 1. Controle negativo; 2. 3B; 3. R2; 4. R5; 5. B31; 6. A55; 7. B20; 8. B25; 9. D72; 10. A95; 11. Mul; 12. Sim. M = DNA marcador de peso molecular. Assinalada no indivíduo 2, com um ponto branco, a banda 18 (1018 pb).



Figura 14. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens de *D. mulleri* (1, 2, 5, 6, 9, 10) e *D. simulans* (3, 4, 7, 8, 11, 12) com os primers 54 (1-4), 69 (5-8) e 86 (9-12). M = DNA marcador de peso molecular.

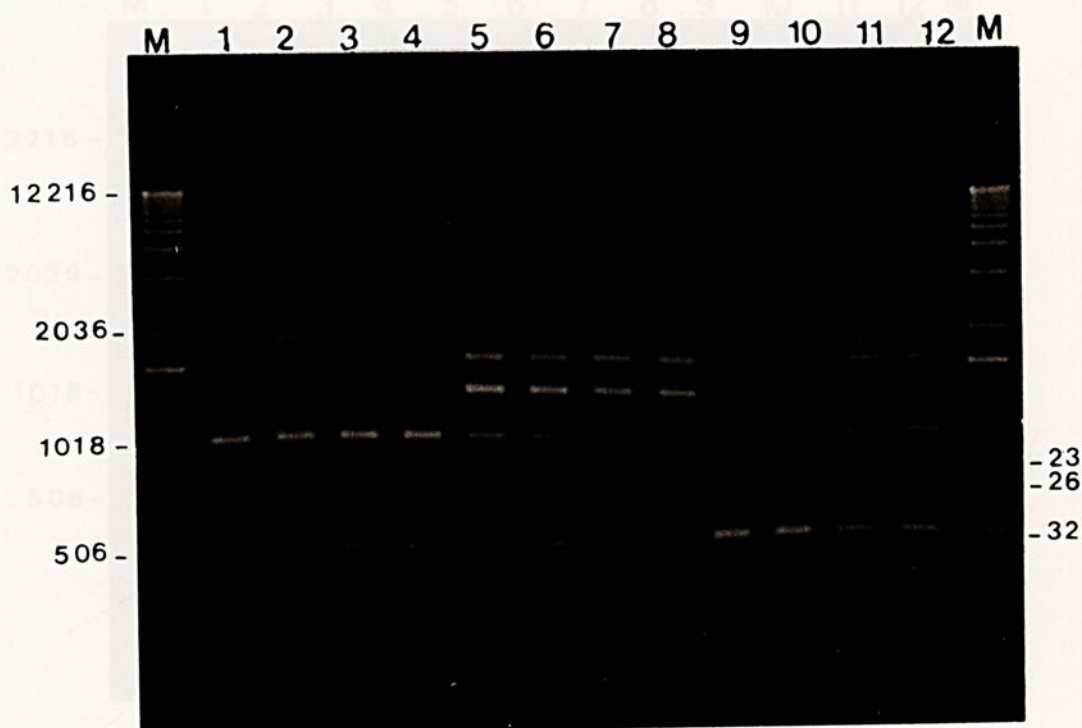


Figura 15. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens 3B (1-4), R2 (5-8) e R5 (9-12) incluídas em *D. buzzatii* com o *primer* 86. M = DNA marcador de peso molecular; banda 26, exclusiva das linhagens incluídas nessa espécie; banda 32, monomórfica nas três linhagens; banda 23, exclusiva de R2.

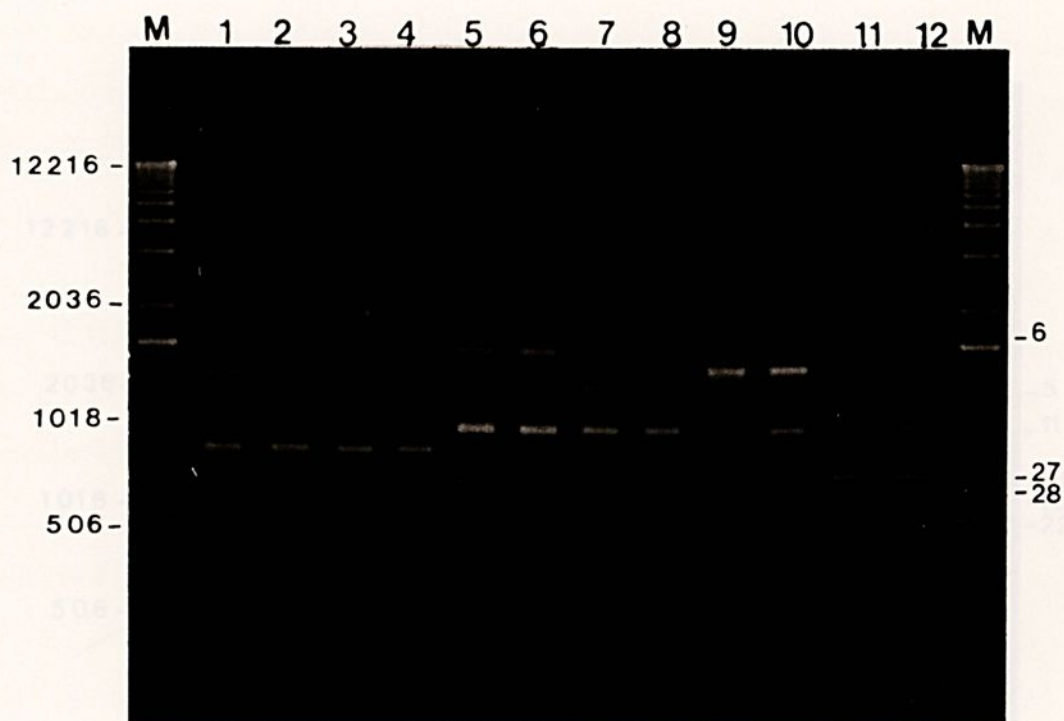


Figura 16. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens B31 (1-4) de *D. serido* tipo D, D72 (5-8) e A95 (9-12) de *D. seriema* com o *primer* 86. M = DNA marcador de peso molecular; banda 28, específica de B31; bandas 6 e 27, exclusivas de *D. seriema*.

III. 2. Polimorfismos de DNA quanto ao padrão RAPD

a) Primer 54

A Tabela 3 indica a frequência dos fragmentos amplificadas nas linhagens estudadas. A banda 18, que foi amplificada em todas as linhagens, foi considerada como padrão.

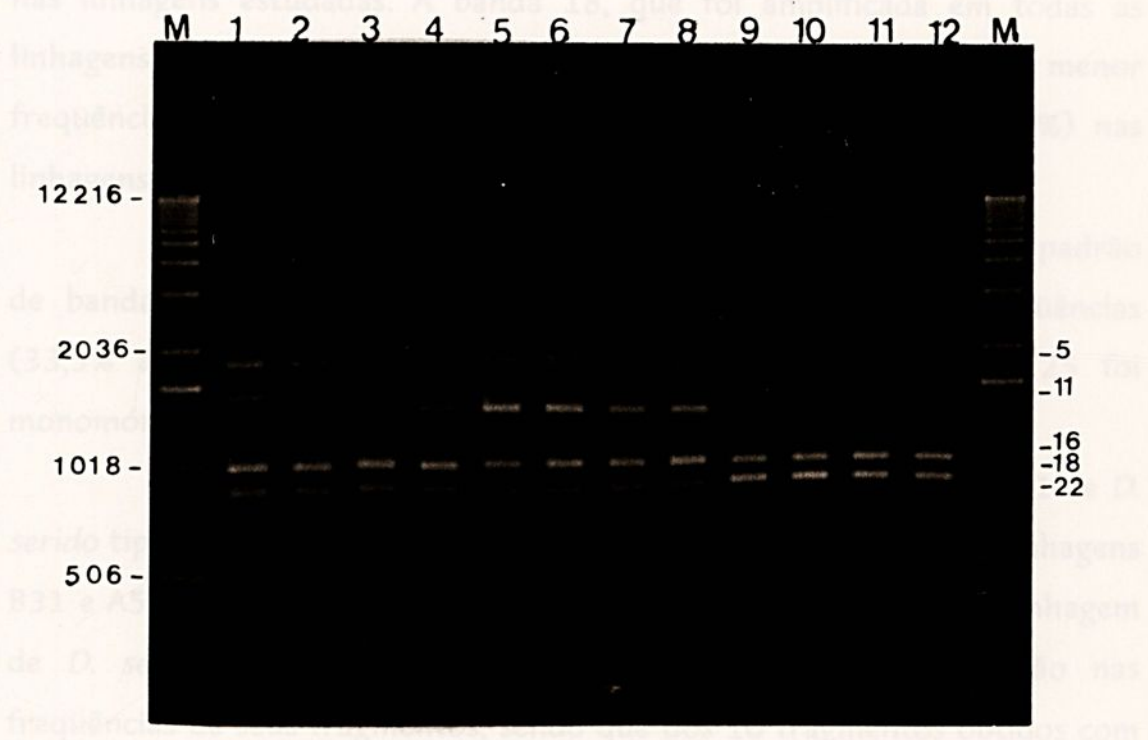


Figura 17. Produtos de amplificação do DNA genômico das linhagens A55 (1-4) de *D. serido* tipo B, B20 (5-8) e B25 (9-12) de *D. koeperae* com o *primer* 86. M = DNA marcador de peso molecular; banda 16, exclusiva de A55; bandas 5 e 11, presentes em B20 e ausentes em B25; bandas 18 e 22, monomórfica nas três linhagens estudadas.

III. 2. Polimorfismos de DNA quanto ao padrão RAPD

a) *Primer 54*

A Tabela 3 indica a frequência dos fragmentos amplificados nas linhagens estudadas. A banda 18, que foi amplificada em todas as linhagens, apresentou uma variação de 40% a 100%, sendo que a menor frequência (40%) foi observada na linhagem 3B e a maior (100%) nas linhagens B31, A55, D72 e A95.

As linhagens agrupadas em *D. buzzatii* apresentaram um padrão de bandas semelhantes, mas que variaram muito em suas frequências (33,3% a 100%). Neste grupo de linhagens, somente a banda 25 foi monomórfica para as três linhagens.

Todos os cinco fragmentos amplificados na linhagem B31 de *D. serido* tipo D foram monomórficos. Das quatro bandas comuns às linhagens B31 e A55, três foram monomórficas para ambas (4, 18 e 24). A linhagem de *D. serido* tipo B (A55) entretanto, mostrou alguma variação nas frequências de seus fragmentos, sendo que dos 10 fragmentos obtidos com esse *primer*, apenas três foram polimórficos. A linhagem A55 apresentou as bandas monomórficas 1, 4, 6, 16, e 24 em comum com as linhagens B20 e B25 de *D. koepferae*. Os fragmentos 4 e 24 também foram monomórficos em outras linhagens que os amplificaram (B31 e A95).

Comparando-se as frequências dos fragmentos obtidos para as linhagens de *D. koepferae* observou-se uma variação maior em B25 do que em B20. Dos oito fragmentos obtidos em B20, apenas 2 foram polimórficos, com frequências que variaram de 50% a 76,7% enquanto que, dos nove obtidos em B25, quatro foram polimórficos com variação de 53,3% a 73,3%.

Das sete bandas que foram comuns às linhagens de *D. seriema*, foram polimórficas para D72 as bandas 4, 6, 17 e 26, com frequências que



Tabela 3. Frequência das 29 bandas observadas nas linhagens estudadas utilizando o *primer* 54. *= Tamanho aproximado em pares de bases.

Nº	Tamanho*	3B	D69R2	D69R5	B31D1	A55F11	B20D2	B25D7	D72M	A95F3	Mul	Sim
1	5090	-	-	-	-	100	100	100	-	-	-	-
2	3870	73,3	46,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
4	2036	-	-	-	100	100	100	100	90	100	56,7	-
5	1970	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	76,7
6	1900	-	-	-	-	100	100	93,3	90	100	-	-
7	1866	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100
8	1722	-	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7
10	1636	100	50	50	100	86,7	100	73,3	-	-	-	100
11	1558	-	93,3	90	-	-	-	-	100	46,7	-	-
12	1487	-	100	100	-	100	-	-	-	-	-	-
13	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
14	1422	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	1340	90	83,3	80	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1283	56,7	90	83,3	-	100	100	100	-	-	100	-
17	1190	100	83,3	100	-	-	-	-	30	30	20	50
18	1018	40	56,7	53,3	100	100	76,7	73,3	100	100	-	66,7
19	985	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
20	968	50	46,7	-	-	-	-	-	100	60	90	-
21	922	20	66,7	100	-	-	-	-	-	-	-	-
22	881	-	-	-	-	-	-	53,3	-	-	-	-
23	856	-	-	-	-	-	50	53,3	-	-	-	-
24	824	-	-	-	100	100	100	100	-	-	-	-
25	809	100	100	100	-	-	-	-	-	-	86,7	-
26	798	-	-	-	-	-	-	-	23,3	20	-	-
27	787	33,3	-	86,7	-	80	-	-	16,7	-	-	83,3
28	767	-	-	-	-	23,3	-	-	20	-	-	-
29	499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93,3	-



variaram desde 23,3% a 90%; e para A95 as bandas 11, 17, 20 e 26, com frequências que variaram de 20% a 60%. As bandas 11, 18 e 20 foram monomórficas em D72 e as bandas 4, 6 e 18 em A95. Duas bandas com frequência de 16,7% (banda 27) e 20% (banda 28) foram exclusivas de D72.

b) *Primer 69*

A Tabela 4 mostra a frequência dos fragmentos obtidos com o *primer 69* para as linhagens estudadas. A banda 17, que está presente em todas as linhagens, com exceção de *D. mulleri* e *D. simulans*, varia desde a frequência de 50 % em R2 e R5 até 100% em B31, A55, B20, B25 e A95.

Observou-se que das oito bandas compartilhadas pelas linhagens incluídas no grupo de *D. buzzatii*, foram monomórficas as bandas 18, 21 e 24. Dos 10 fragmentos obtidos com esse *primer* para a linhagem 3B, três foram monomórficos (18, 21 e 24) e sete polimórficos, com frequências que variaram de 20% a 90%. Das 13 bandas geradas com esse *primer* na linhagem R2, nove foram monomórficas (2, 10, 15, 18, 19, 21, 24, 30 e 31) e somente quatro foram polimórficas, com frequências que variaram de 36,7% a 90%. A linhagem R5 mostrou um número menor (10) de fragmentos amplificados que R2 (13), sendo que seis foram monomórficos (2, 8, 10, 18, 21 e 24) e quatro polimórficos. Alguns fragmentos compartilhados pelas três linhagens variaram acentuadamente em suas frequências, como por exemplo, os fragmentos 2, 12 e 15.

É interessante notar que enquanto algumas bandas que foram específicas para 3B (banda 34) ou para R2 (banda 36), mostraram uma baixa frequência, 20% e 36,7% respectivamente, outras, como as bandas 19 e 30, exclusivas de R2, e a banda 8 de R5 foram monomórficas.



Tabela 4. Frequência das 37 bandas observadas nas linhagens estudadas utilizando o *primer* 69. *= Tamanho aproximado em pares de bases.

Nº	Tamanho *	3B	D69R2	D69R5	B31D1	A55F11	B20D2	B25D7	D72M	A95F3	Mul	Sim
1	2936	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
2	2727	30	100	100	-	-	-	-	-	-	36,7	-
3	2316	-	-	-	-	-	83,3	-	-	-	-	90
4	2100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90
5	2036	-	-	-	-	-	-	-	60	100	50	100
6	1970	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-
7	1866	-	-	-	-	-	53,3	-	-	-	-	-
8	1768	-	-	100	-	-	-	-	50	73,3	40	-
9	1636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3
10	1596	-	100	100	-	73,3	100	70	-	-	-	-
11	1522	-	-	-	-	-	-	-	70	66,7	-	-
12	1487	63,3	40	80	-	-	-	60	-	-	100	-
13	1363	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	-
14	1308	-	-	-	-	60	100	86,7	-	-	100	-
15	1235	56,7	93,3	76,7	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1190	-	-	-	-	66,7	100	66,7	83,3	100	-	-
17	1018	63,3	50	50	100	100	100	100	90	100	-	-
18	1000	100	100	100	100	-	100	86,7	-	-	100	-
19	952	-	100	-	93,3	-	-	-	-	-	-	-
20	937	-	-	-	-	43,3	93,3	36,7	66,7	100	-	-
21	908	93,3	100	100	93,3	100	90	90	-	-	66,7	-
22	881	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	-
23	868	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	93,3
24	843	100	100	100	-	-	-	-	-	100	-	-
25	809	-	-	-	100	-	-	-	100	76,7	-	-
26	787	-	-	-	-	40	80	50	-	-	50	-
27	777	-	-	-	100	-	-	-	100	63,3	-	-
28	767	86,7	90	-	-	-	66,7	-	-	-	-	100
29	519	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,7	-
30	506	-	93,3	-	-	66,7	93,3	80	-	-	-	-
31	476	90	100	73,3	-	-	-	-	-	-	-	-
32	470	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
33	396	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
34	390	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	344	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-
36	298	-	36,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	295	-	-	-	90	-	-	-	-	-	-	-

A linhagem B31 de *D. serido* tipo D apresentou nove fragmentos, sendo que oito deles foram monomórficos, exceto o fragmento 37 que mostrou uma frequência de 90%. A linhagem A55 apresentou duas bandas monomórficas (17 e 21) e as outras seis variaram em frequência de 40% a 73,3%.

Analisando separadamente cada uma das linhagens de *D. koepferae*, verificamos que B20 apresentou sete bandas monomórficas (10, 14, 16, 17, 18, 20 e 30) e cinco polimórficas (3, 7, 21, 26 e 28), enquanto B25 mostrou apenas um fragmento monomórfico (17), o mesmo que foi amplificado em B20, A55 e B31, e 10 polimórficos com frequências que variam de 36,7% a 90%.

As linhagens de *D. seriema* também diferiram quanto ao número e tipo de fragmentos monomórficos e polimórficos. Na linhagem D72 foram observados três fragmentos monomórficos (22, 25 e 27), e na linhagem A95, seiss fragmentos (5, 16, 17, 20, 22 e 24). Foram encontrados nove fragmentos polimórficos na linhagem D72 e quatro em A95 que variaram de 50% a 90% em suas frequências. Das neve bandas compartilhadas por essas linhagens, apenas a banda 22 foi monomórfica. A única banda que ocorreu em A95 e não em D72 (banda 24) foi monomórfica, enquanto as exclusivas de D72 (bandas 6, 13 e 35) foram polimórficas, com frequências de 50%, 80% e 60%, respectivamente.

c) Primer 86

A Tabela 5 mostra a frequência dos fragmentos obtidos com o *primer* 86 para as linhagens estudadas. O fragmento 18 foi compartilhado por todas as linhagens, com frequências que variaram de 50% a 90% em B31 e R2, e 100% nas demais.



Das bandas compartilhadas pelas linhagens incluídas como *D. buzzatii*, somente a banda 32 foi monomórfica para todas. Dos 29 fragmentos amplificados, foram monomórficos: cinco em 3B (5, 13, 18, 32 e 33), dois em R2 (7 e 32) e dois em R5 (18 e 32); e polimórficos: sete em 3B (1, 4, 10, 21, 24, 26 e 31), oito em R2 (5, 10, 13, 18, 21, 23, 26 e 31) e cinco em R5 (5, 7, 10, 13 e 26). As frequências variaram de 30% a 56,7% em 3B, de 30% a 90% em R2 e de 43,3% a 80% em R5. Das quatro bandas que estiveram presentes em 3B, mas ausentes em R2 e R5, apenas uma foi monomórfica (banda 33), as outras três (bandas 1, 4 e 24) mostraram uma frequência de 50%. A banda 23, exclusiva de R2, apresentou uma frequência de 70%.

Das cinco bandas amplificadas em B31, apenas uma foi polimórfica (banda 18), e a banda 28, que foi exclusiva dessa linhagem, foi monomórfica. Dos oito fragmentos amplificados em A55, apenas três foram polimórficos (9, 15 e 16) com frequências de 43,3%, 90% e 46,7%, respectivamente. Desses, o fragmento 16 foi exclusivo dessa linhagem.

As bandas 18 e 22 compartilhadas pelas linhagens de *D. koepferae* foram monomórficas. Dos seis fragmentos amplificados na linhagem B20, apenas dois foram polimórficos (11 e 32), o mesmo ocorrendo para os cinco amplificados em B25 (9 e 13).

Dos seis fragmentos compartilhados pelas linhagens de *D. seriema*, apenas um (18) foi monomórfico. A linhagem D72 amplificou nove fragmentos, sendo que dois deles foram monomórficos (13 e 18) e sete polimórficos. A linhagem A95 também amplificou nove fragmentos, sendo que dois foram monomórficos (11 e 18) e sete polimórficos. As bandas 6 e 27, exclusivas das linhagens dessa espécie, apresentaram pouca variação em suas frequências (70% - 80% e 40% - 50%, respectivamente).



Tabela 5. Frequência das 33 bandas observadas nas linhagens estudadas utilizando o *primer* 86. *= Tamanho aproximado em pares de bases.

Nº	Tamanho *	3B	D69R2	D69R5	B31D1	A55F11	B20D2	B25D7	D72M	A95F3	Mul	Sim
1	2400	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2317	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3
3	2167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	76,7
4	2036	50	-	-	-	-	-	-	50	60	-	93,3
5	1970	100	80	70	-	93,3	100	-	-	-	-	-
6	1866	-	-	-	-	-	-	-	70	80	-	-
7	1810	-	100	80	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1678	-	-	-	-	-	-	-	66,7	-	100	90
9	1636	-	-	-	-	43,3	-	86,7	-	-	50	-
10	1596	30	46,7	43,3	-	-	-	-	63,3	-	40	90
11	1487	-	-	-	-	93,3	86,7	-	-	100	-	-
12	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	50
13	1392	100	66,7	66,7	-	-	100	90	93,3	-	100	50
14	1363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3	-
15	1340	-	-	-	100	90	-	-	-	-	-	-
16	1190	-	-	-	-	46,7	-	-	-	-	-	-
17	1158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86,7
18	1018	100	90	100	50	100	100	100	100	100	100	100
19	985	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
20	968	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-
21	937	56,7	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	922	-	-	-	-	100	100	100	-	36,7	80	-
23	895	-	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	881	50	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
25	868	-	-	-	100	-	-	-	40	50	93,3	-
26	831	46,7	73,3	73,3	-	-	-	-	-	-	-	-
27	824	-	-	-	-	-	-	-	40	50	-	-
28	809	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
29	787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
30	767	-	-	-	-	-	-	-	40	50	86,7	100
31	512	50	43,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	506	100	93,3	100	-	100	50	100	-	-	-	-
33	290	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

d) Avaliação com todos os *primers*

Dos 99 fragmentos amplificados pelos três *primers* nas 11 linhagens estudadas, 17 foram exclusivamente monomórficos em todas as linhagens em que estavam presentes.

Os gráficos da Figura 18 mostram as frequências de bandas monomórficas e polimórficas em cada uma das linhagens estudadas com os três *primers* analisados. Para o *primer* 54, observamos que as linhagens B31, B20 e A55 apresentaram um maior grau de monomorfismo (100%, 75% e 70%, respectivamente). As linhagens com maior grau de polimorfismo foram R2 (75%), 3B (72,7%) e Sim (71%). Com o *primer* 69, as linhagens que apresentaram um maior grau de polimorfismo foram B25 (90,9%), A55 (75%), D72 (75%), 3B (70%) e Mul (67%). O *primer* 86 evidenciou um maior grau monomorfismo nas linhagens B31 (80%), B20 (66,7%) e B25 (60%). Todas as demais linhagens apresentaram alto grau de polimorfismo com exceção de 3B que apresentou praticamente o mesmo número de bandas monomórficas e polimórficas.

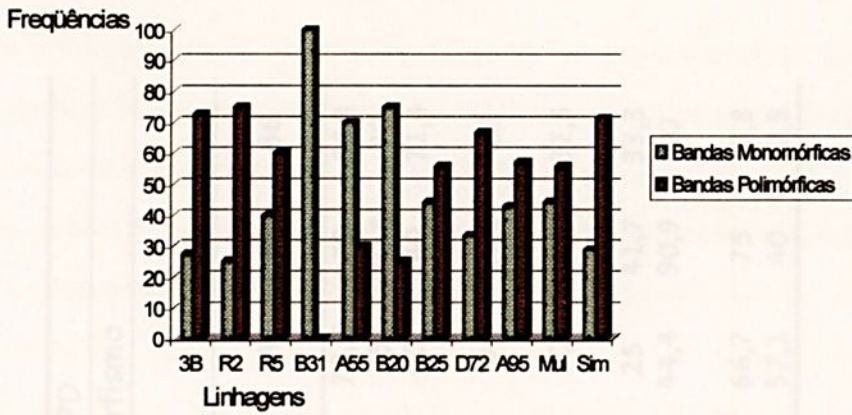
Na avaliação da quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por RAPD nos diferentes *primers* utilizados (Tabela 6), verificamos uma variação de 30,8% a 72,7% nas linhagens incluídas em *D. buzzatii*, sendo que o maior coeficiente de variação (CV), nesse grupo, foi obtido para o *primer* 69 (CV = 43,68%), seguido pelo *primer* 86 (CV = 15,64) e pelo *primer* 54 (CV = 11,67%).

A porcentagem de polimorfismo RAPD na linhagem de *D. serido* tipo D variou entre 0% e 20% e na de *D. serido* tipo B entre 30% e 75% para os diferentes *primers*.

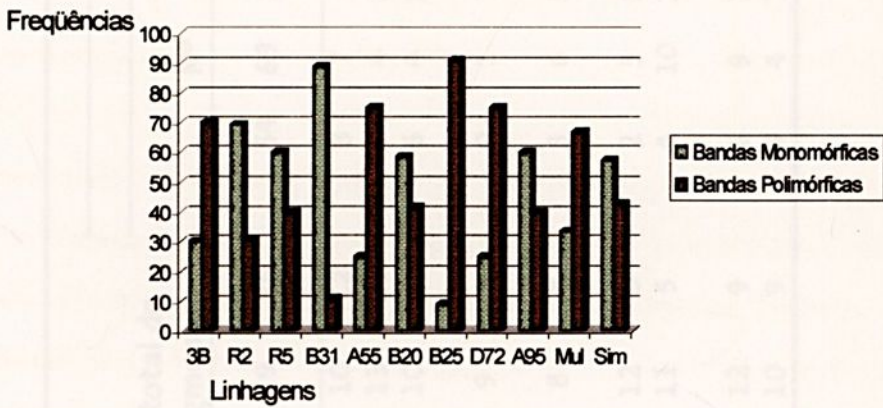
Na comparação das linhagens de *D. koepferae* observou-se uma variação na porcentagem de polimorfismo de RAPD de 33,3% a 90,9%, sendo que os maiores coeficientes e variação foram obtidos com os *primers* 69



Primer 54



Primer 69



Primer 86

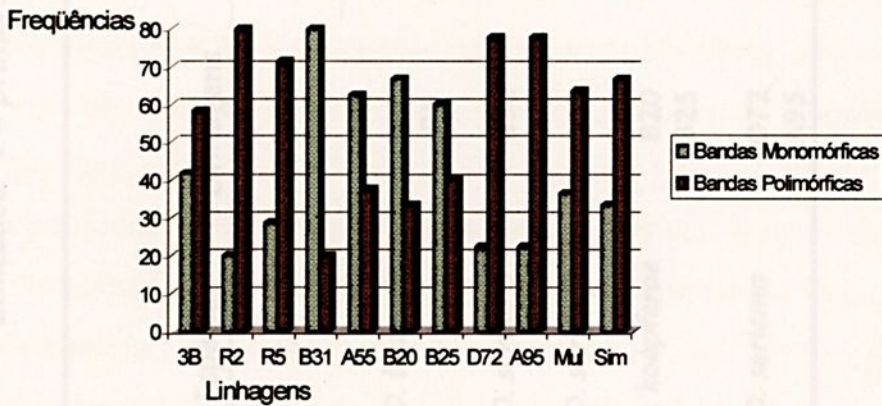


Figura 18. Gráficos comparativos entre as frequências de bandas monomórficas e polimórficas nas linhagens estudadas com os três primers. A. primer 54, B. primer 69 e C. primer 86.

Tabela 6. Análise do número e porcentagem de polimorfismo RAPD nas linhagens e nos 3 *primers* utilizados. * = *primers* 54, 69 e 86

Espécies	Linhagens	RAPD								
		Nº total de Fragmentos			Polimorfismo					
					Nº			%		
		54	69	86	54	69	86	54	69	86
<i>D. buzzatii</i>	3B	11	10	12	8	7	7	72,7	70	58,3
	R2	12	13	10	9	4	8	75	30,8	80
	R5	10	10	7	6	4	5	60	40	71,4
<i>D. serido D</i>	B31	5	9	5	0	1	1	0	11,1	20
<i>D. serido B</i>	A55	10	8	8	3	6	3	30	75	37,5
<i>D. koepferae</i>	B20	8	12	6	2	5	2	25	41,7	33,3
	B25	9	11	5	4	10	2	44,4	90,9	40
<i>D. seriema</i>	D72	9	12	9	6	9	7	66,7	75	77,8
	A95	7	10	9	4	4	7	57,1	40	77,8

(CV = 52,47%) e com o *primer* 54 (CV = 39,48%). O menor coeficiente de variação foi de 12,93% obtido com o *primer* 86.

As linhagens de *D. seriema* apresentaram uma variação de 40% a 77,8% na quantidade de polimorfismo de RAPD, e o maior coeficiente de variação foi obtido com o *primer* 69 (CV = 43,04%), seguido pelo *primer* 54 (CV = 10,97%). Não houve variação na porcentagem de polimorfismo nas linhagens dessa espécie com o *primer* 86 (CV = 0).

III. 3. Similaridade Genética

a) *Primer* 54

Com base na matriz de dados de presença e ausência de fragmentos amplificados, considerando as 29 bandas amplificadas pelo *primer* 54 nas 11 linhagens estudadas, foram calculados os Índices de Similaridade de Nei e Li (Tabela 7). Os valores de similaridade variaram entre 0,210 e 0,941. As linhagens de *D. buzzatii* mostraram-se próximas umas das outras, com índices de 0,818 entre R2 e R5; 0,783 entre R2 e 3B; e 0,762 entre R5 e 3B. A linhagem R5 apresentou uma similaridade mais elevada com as linhagens B31 e A55 (IS = 0,533 e 0,500 respectivamente). As linhagens B31 e A55, pertencentes à *D. serido* tipo D e tipo B, respectivamente, apresentaram um índice relativamente baixo entre si (IS = 0,533). Por outro lado, A55 assemelhou-se muito à B25 (IS = 0,737). Por este índice, as linhagens de *D. koepferae* (B20 e B25) mostraram-se muito próximas uma da outra (IS = 0,941), e o mesmo ocorreu com as linhagens de *D. seriema* (D72 e A95) que apresentaram uma similaridade de 0,875.



Tabela 7. Índice de Similaridade de Nei e Li, calculado para o *primer* 54, das linhagens das espécies: *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo D e B (B31 e A55, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim).

	3B	R2	R5	B31	A55	B20	B25	D72	A95	Mul	Sim
3B	1										
D69R2	0,783	1									
D69R5	0,762	0,818	1								
B31D1	0,250	0,235	0,533	1							
A55F11	0,381	0,364	0,500	0,533	1						
B20D2	0,316	0,300	0,333	0,615	0,222	1					
B25D7	0,300	0,286	0,316	0,571	0,737	0,941	1				
D72M	0,400	0,381	0,421	0,286	0,526	0,353	0,333	1			
A95F3	0,222	0,421	0,353	0,333	0,353	0,400	0,375	0,875	1		
Mul	0,400	0,381	0,316	0,143	0,210	0,235	0,222	0,333	0,375	1	
Sim	0,444	0,316	0,471	0,333	0,353	0,267	0,250	0,375	0,286	0,250	1

b) *Primer 69*

Através do índice de similaridade mostrado na Tabela 8, nota-se que novamente as linhagens de *D. buzzatii* mostraram-se muito próximas umas das outras com índices de 0,783 entre 3B e R2, 0,800 entre 3B e R5, e 0,783 entre R2 e R5. A linhagem B31 mostrou-se distante de todas as outras linhagens com índices variando entre 0,235 e 0,316. Com este *primer*, A55 também assemelhou-se com as linhagens de *D. koepferae* (IS= 0,800 entre A55 e B20 e IS= 0,842 entre A55 e B25), sendo esta similaridade maior do que entre as próprias linhagens B20 e B25 (IS= 0,783). As linhagens de *D. seriema* apresentaram uma semelhança de 0,818.

c) *Primer 86*

Observa-se na Tabela 9 que, com este *primer*, a maioria das linhagens mostrou-se mais distantes do que com os dois outros *primers*. As linhagens de *D. buzzatii* apresentaram índices de 0,727 entre 3B e R2, 0,631 entre 3B e R5, e 0,823 entre R2 e R5. A linhagem B31 mostrou-se distante de todas as outras linhagens com índices variando entre 0,118 e 0,308. Com este *primer*, A55 também assemelhou-se com as linhagens de *D. koepferae* (IS= 0,714 entre A55 e B20 e IS= 0,615 entre A55 e B25), sendo esta similaridade novamente maior do que entre as próprias linhagens B20 e B25 (IS= 0,364). As linhagens de *D. seriema* apresentaram uma semelhança de 0,667.



Tabela 8. Índice de Similaridade de Nei e Li, calculado para o *primer* 69, das linhagens das espécies: *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo D e B (B31 e A55, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim).

	3B	R2	R5	B31	A55	B20	B25	D72	A95	Mul	Sim
3B	1										
D69R2	0,783	1									
D69R5	0,800	0,783	1								
B31D1	0,316	0,364	0,316	1							
A55F11	0,222	0,381	0,333	0,235	1						
B20D2	0,364	0,480	0,364	0,286	0,800	1					
B25D7	0,381	0,500	0,476	0,300	0,842	0,783	1				
D72M	0,011	0,080	0,182	0,286	0,300	0,250	0,261	1			
A95F3	0,200	0,174	0,200	0,316	0,333	0,273	0,286	0,818	1		
Mul	0,421	0,364	0,526	0,222	0,353	0,381	0,500	0,190	0,210	1	
Sim	0,118	0,100	0,000	0,000	0,000	0,105	0,111	0,105	0,118	0,125	1

Tabela 9. Índice de Similaridade de Nei e Li, calculado para o *primer* 86, das linhagens das espécies: *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo D e B (B31 e A55, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim).

	3B	R2	R5	B31	A55	B20	B25	D72	A95	Mul	Sim
3B	1										
D69R2	0,727	1									
D69R5	0,631	0,823	1								
B31D1	0,235	0,133	0,167	1							
A55F11	0,300	0,333	0,400	0,308	1						
B20D2	0,444	0,500	0,615	0,182	0,714	1					
B25D7	0,353	0,400	0,500	0,200	0,615	0,364	1				
D72M	0,381	0,316	0,375	0,286	0,118	0,267	0,286	1			
A95F3	0,190	0,105	0,125	0,286	0,353	0,400	0,286	0,667	1		
Mul	0,261	0,286	0,333	0,250	0,316	0,353	0,500	0,600	0,400	1	
Sim	0,333	0,273	0,316	0,118	0,100	0,222	0,235	0,571	0,381	0,435	1

d) Avaliação com todos os *primers*

A Tabela 10 mostra o índice de similaridade calculado para as 11 linhagens estudadas com os três *primers* em conjunto. Pode-se notar que as linhagens de *D. buzzatii* permaneceram muito próximas entre si, com índices de 0,765 entre 3B e R2; 0,733 entre 3B e R5; e 0,645 entre R2 e R5. A linhagem B31 mostrou-se distante de todas as outras linhagens com índices variando entre 0,133 e 0,355. A linhagem A55 permaneceu assemelhando-se com as linhagens de *D. koepferae* (IS= 0,769 entre A55 e B20 e IS= 0,745 entre A55 e B25), permanecendo maior do que entre as próprias linhagens B20 e B25 (IS= 0,549). As linhagens de *D. seriema* apresentaram uma semelhança de 0,607.

Tabela 10. Índice de similaridade de 481-481, calculado para os três primers (R2, R5 e B31) para as linhagens A55, B20 e B25, respectivamente, e D. seriema (Sim).

	3B	R2	R5	B31
3B	1			
A55	0,765			
B20	0,733	0,645		
B25	0,269	0,259	0,343	
D. seriema	0,101	0,361	0,475	0,133
B31	0,373	0,426	0,435	1
A55	0,385	0,400	0,424	0,149
B20	0,286	0,246	0,238	0,149
B25	0,203	0,239	0,216	0,141
Sim	0,365	0,446	0,463	0,154
Sim	0,304	0,289	0,284	0,133

Tabela 10. Índice de Similaridade de Nei e Li, calculado para os três *primers*, das linhagens das espécies: *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo D e B (B31 e A55, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim).

	3B	R2	R5	B31	A55	B20	B25	D72	A95	Mul	Sim
3B	1										
D69R2	0,765	1									
D69R5	0,733	0,645	1								
B31D1	0,269	0,259	0,348	1							
A55F11	0,305	0,361	0,415	0,355	1						
B20D2	0,373	0,426	0,415	0,355	0,769	1					
B25D7	0,345	0,400	0,423	0,364	0,745	0,549	1				
D72M	0,286	0,246	0,316	0,286	0,321	0,286	0,291	1			
A95F3	0,203	0,229	0,226	0,311	0,346	0,346	0,314	0,607	1		
Mul	0,355	0,344	0,393	0,208	0,291	0,327	0,407	0,373	0,327	1	
Sim	0,305	0,229	0,264	0,133	0,154	0,192	0,196	0,357	0,269	0,291	1

III. 4. Análise de Agrupamento

A análise de agrupamento, segundo o método UPGMA, possibilitou a construção de um dendograma que reúne as linhagens em diferentes níveis; quanto menor o nível, maior o grau de proximidade entre elas. Na descrição desses resultados optamos pelo valor numérico da distância igual a 2,5 para a avaliação dos grupos formados.

a) Primer 54

O dendograma mostrado na Figura 19 dividiu as 11 linhagens em cinco grupos, três maiores e dois menores, no valor numérico de distância igual a 2,5. O grupo 1 representado pelas linhagens de *D. buzzatii*, o grupo 2 as linhagens de *D. koepferae* juntamente com as linhagens de *D. serido*, o 3 as de *D. seriema* e os outros dois grupos, cada um com uma das linhagens do grupo externo, *Drosophila mulleri* e *D. simulans*.

b) Primer 69

O dendograma da Figura 20 dividiu as 11 linhagens em cinco grupos, três maiores e dois menores, no valor numérico de distância igual a 2,5. O grupo 1 representado pelas linhagens de *D. buzzatii*, o grupo 2 as linhagens de *D. koepferae* juntamente com a linhagem A55 de *D. serido* tipo B e a linhagem de *D. mulleri*, o 3 a linhagem B31 de *D. serido* tipo D, o 4 as linhagens de *D. seriema* e o outro grupo, as linhagem de *D. simulans*.



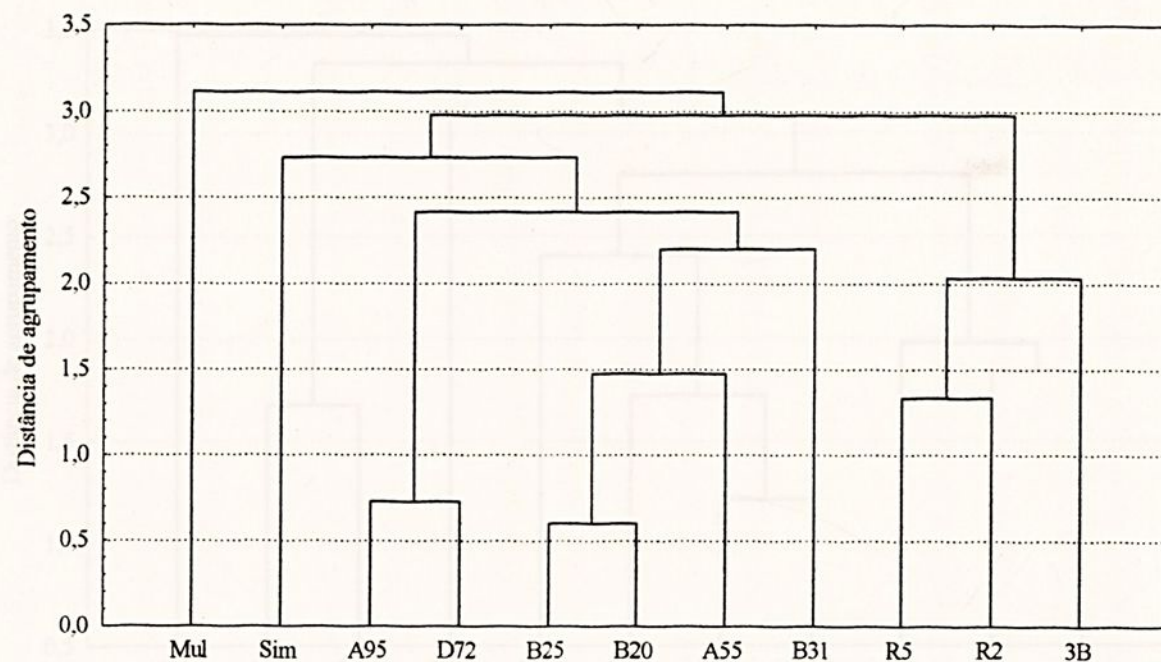


Figura 19. Dendrograma agrupado pelo método UPGMA com base na distância Euclidiana entre as linhagens de *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo B e D (A55 e B31, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim), estudadas com o *primer* 54.

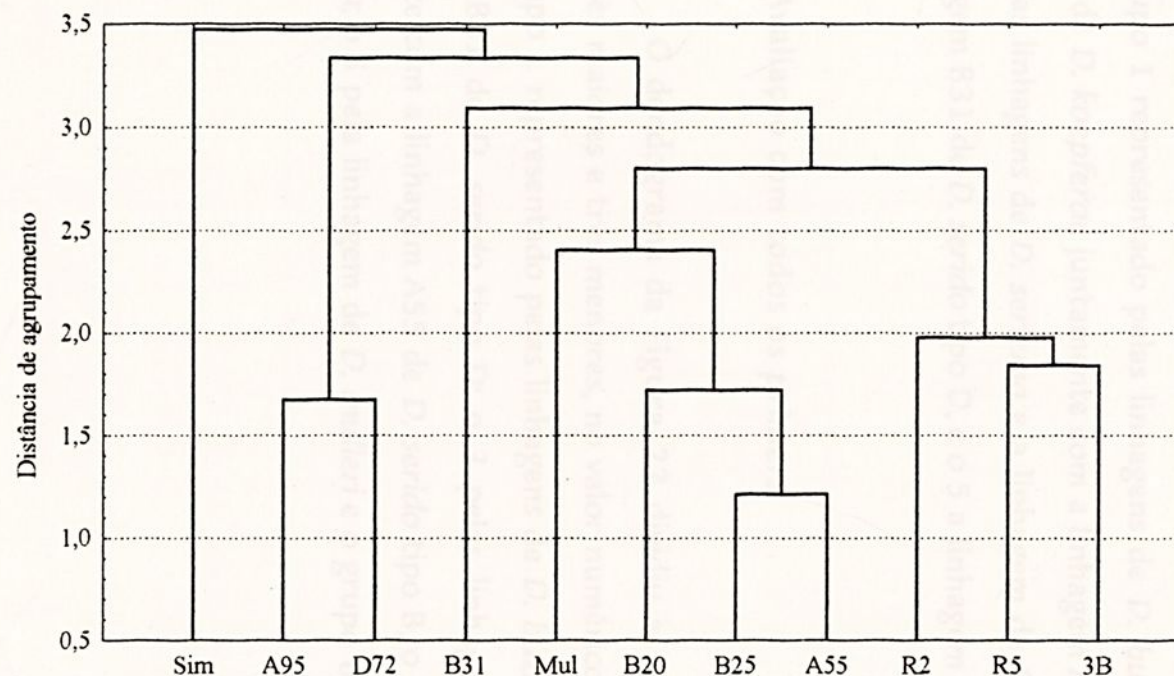


Figura 20. Dendrograma agrupado pelo método UPGMA com base na distância Euclidiana entre as linhagens de *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo B e D (A55 e B31, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim), estudadas com o primer 69.

c) Primer 86

O dendograma da Figura 21 dividiu as 11 linhagens em cinco grupos, três maiores e dois menores, no valor numérico de distância igual a 2,5. O grupo 1 representado pelas linhagens de *D. buzzatii*, o grupo 2 as linhagens de *D. koepferae* juntamente com a linhagem A55 de *D. serido* tipo B, o 3 pelas linhagens de *D. seriema* e a linhagem de *D. mulleri*, o grupo 4 pela linhagem B31 de *D. serido* tipo D, e o 5 a linhagem de *D. simulans*.

d) Avaliação com todos os primers

O dendograma da Figura 22 dividiu as 11 linhagens em seis grupos, três maiores e três menores, no valor numérico de distância igual a 2,5. O grupo 1 representado pelas linhagens de *D. buzzatii*, o grupo 2 pela linhagem B31 de *D. serido* tipo D; o 3 pelas linhagens de *D. koepferae* juntamente com a linhagem A55 de *D. serido* tipo B, o 4 pelas linhagens de *D. seriema*; o 5 pela linhagem de *D. mulleri* e o grupo 6 pela linhagem de *D. simulans*.



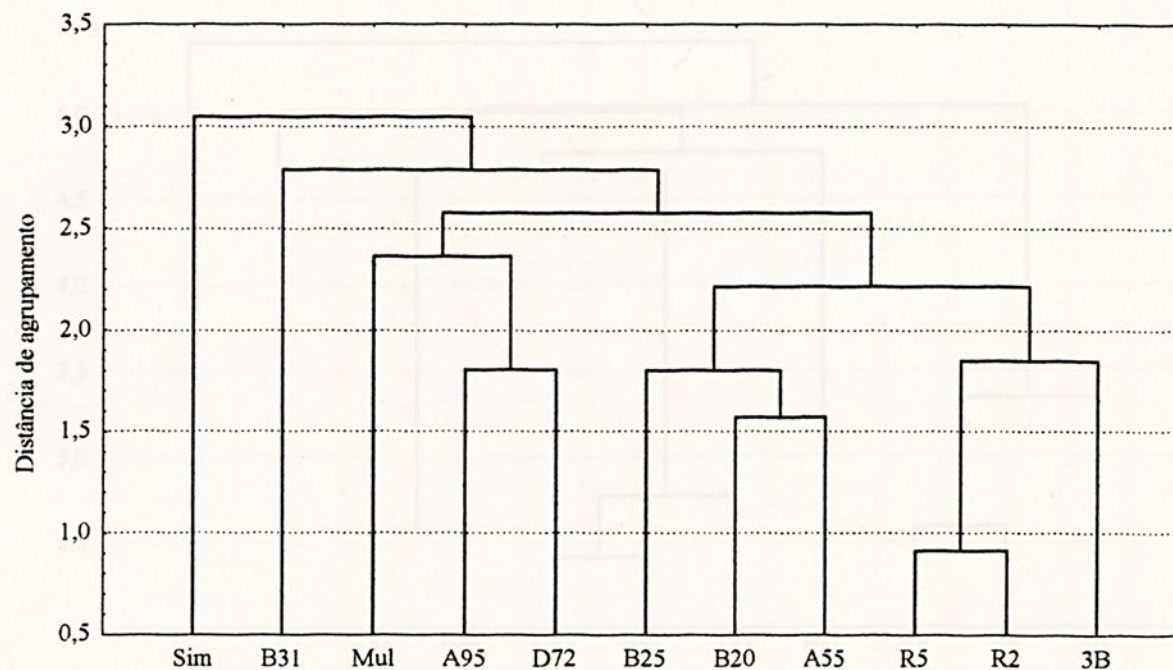


Figura 21. Dendrograma agrupado pelo método UPGMA com base na distância Euclidiana entre as linhagens de *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo B e D (A55 e B31, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim), estudadas com o primer 86.

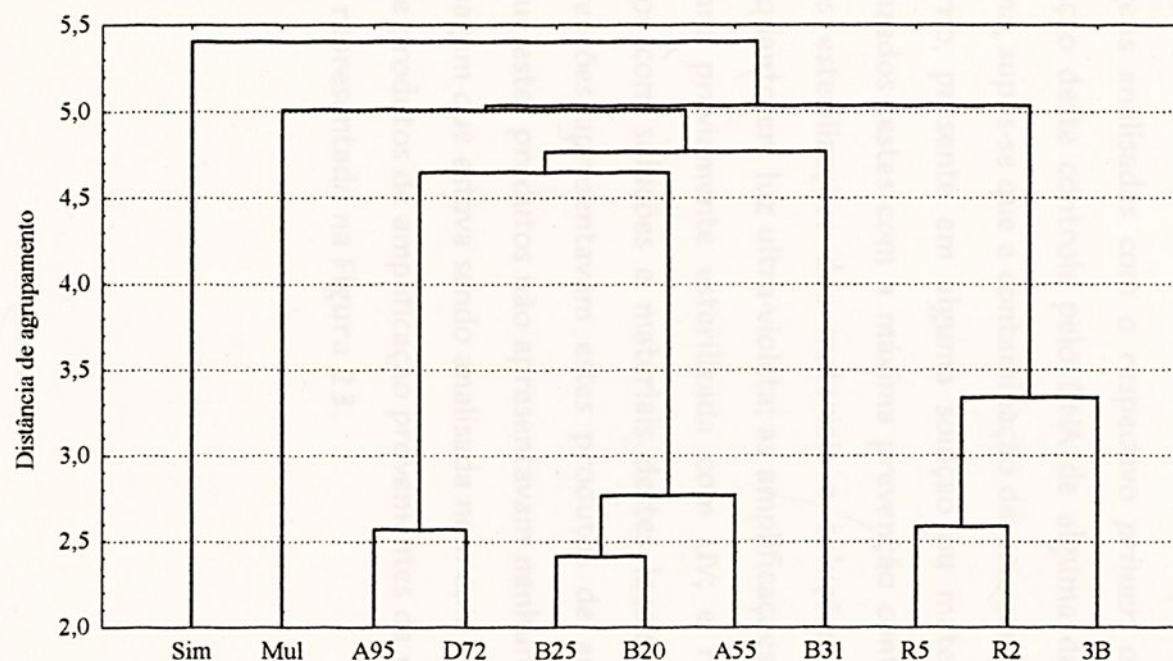


Figura 22. Dendrograma agrupado pelo método UPGMA com base na distância Euclidiana entre as linhagens de *D. buzzatii* (3B, R2 e R5), *D. serido* tipo B e D (A55 e B31, respectivamente), *D. koepferae* (B20 e B25), *D. seriema* (D72 e A95), *D. mulleri* (Mul) e *D. simulans* (Sim), estudadas com os três primers.

III. 5. Presença de DNA amplificado não-específico

Foi verificado em algumas reações de amplificação produtos de amplificação no controle negativo (sem DNA). Entretanto, esses fragmentos não corresponderam em tamanho com aqueles amplificados pelos indivíduos das linhagens analisadas com o respectivo *primer*, o que indicava a não contaminação deste controle pelo DNA de alguma das moscas analisadas. Desta forma, supôs-se que a contaminação deveria ser proveniente de algum DNA externo, presente em alguma solução ou material utilizado. Foram então realizados testes com a máxima prevenção contra contaminação, ou seja, novas esterilizações dos materiais e soluções utilizados tanto em autoclave quanto em luz ultra-violeta; as amplificações foram realizadas em uma câmara previamente esterilizada com UV; e realizadas em outros laboratórios com soluções e materiais destes locais. Da mesma maneira, algumas reações apresentavam estes produtos de amplificação. Notou-se também que estes produtos não apresentavam nenhuma repetibilidade nem com a linhagem que estava sendo analisada nem com o *primer* utilizado. Um exemplo de produtos de amplificação provenientes de reações controle (sem DNA) está representado na Figura 23.

Figura 23. Exemplos de produtos de amplificação inespecíficos com os *primer* 54, 69 e 86.



IV. DISCUSSÃO

O entendimento da evolução das espécies requer a descrição da variação dentro e entre as populações e habilidade para distinguir as causas potenciais da distribuição da variação observada.

Dada a ampla diferenciação encontrada nos diferentes marcadores genéticos estudados nas populações das espécies incluídas no *cluster buzzatii* de *Drosophila*, os resultados obtidos são consistentes do seu processo de especiação, o presente trabalho foi desenvolvido principalmente com a finalidade de avaliar o potencial da técnica de RAPD para as espécies desse grupo.

Tendo em vista que as espécies do grupo *repleta* são reconhecidas basicamente por caracteres morfológicos e cromossômicos politémicos e pela morfologia dos cromossomos, a descoberta de um novo marcador que auxilie na identificação de espécies é de grande importância. A técnica de RAPD, além disso, os dados de RAPD permitem que se façam inferências sobre as distâncias genéticas e as comparem com os dados obtidos por outros marcadores.

A técnica RAPD tem provado ser inestimável na identificação de grande número de polimorfismos genéticos em várias espécies de insetos. Vários milhões de combinações de primers com 10 nucleotídeos de comprimento foram testadas para serem adequadas para o uso em estudos de inseto (Cenis e Bailly, 1994).

A amplificação do DNA genômico de nove linhagens de espécies do *cluster buzzatii* e mais as linhagens de *D. nulleri* e *D. simulans* produziram um total de 99 bandas RAPD que variaram de 290 a 5.090 pares de bases de comprimento. Um fragmento com mais de 4.000 pb foi encontrado nas linhagens A55, B20 e B25, com o primer 54. Embora

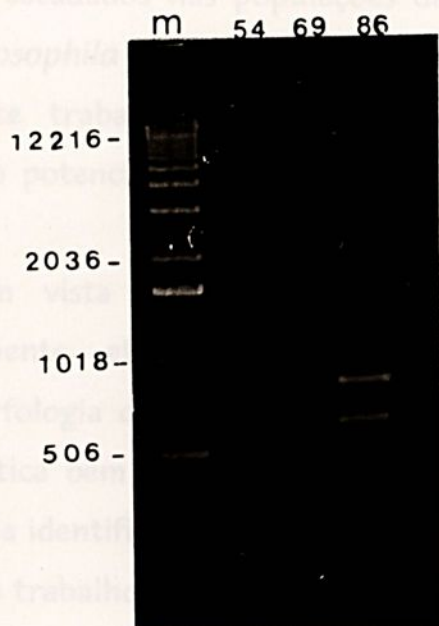


Figura 23. Exemplos de produtos de amplificação inespecíficos com os primers 54, 69 e 86.

IV. DISCUSSÃO

O entendimento da evolução das espécies requer a descrição da variação dentro e entre as populações e habilidade para distinguir as causas potenciais da distribuição da variação observada.

Dada a ampla diferenciação encontrada nos diferentes marcadores genéticos estudados nas populações das espécies incluídas no *cluster buzzatii* de *Drosophila* e os aspectos intrigantes do seu processo de especiação, o presente trabalho foi elaborado principalmente com a finalidade de avaliar o potencial taxonômico da técnica de RAPD para as espécies desse grupo.

Tendo em vista que as espécies do grupo repleta são reconhecidas basicamente através das inversões dos cromossomos politênicos e pela morfologia do edeago, que requerem conhecimentos de citogenética e sistemática bem experimentados, a descoberta de um novo marcador que auxilie na identificação das espécies de modo prático e rápido, certamente facilitará o trabalho dos pesquisadores. Além disso, os dados de RAPD permitem que se façam inferências sobre as distâncias genéticas e as comparem com os dados obtidos por outros marcadores.

A técnica RAPD tem provado ser inestimável na identificação de grande número de polimorfismos genéticos em várias espécies de insetos. Vários milhões de combinações de *primers* com 10 nucleotídeos de comprimento são possíveis, o que sugere que um *primer* pode ser apropriado para reconhecer qualquer hierarquia taxonômica ou grupo de inseto (Cenis e Beitia, 1994).

A amplificação do DNA genômico de nove linhagens de espécies do *cluster buzzatii* e mais as linhagens de *D. mulleri* e *D. simulans* produziram um total de 99 bandas RAPD que variaram de 290 a 5.090 pares de bases de comprimento. Um fragmento com mais de 4.000 pb foi encontrado nas linhagens A55, B20 e B25, com o *primer* 54. Embora



fragmentos dessa ordem de magnitude tenham sido relatados com baixa frequência na literatura, no presente estudo eles foram considerados como produtos de amplificação pela sua presença em 100% dos indivíduos analisados. Entretanto, o significado dessas bandas precisa ser melhor avaliado por outras técnicas, como por exemplo, enzimas de restrição.

Cada *primer* produziu um padrão característico de bandas RAPD, e a presença de fragmentos de DNA linhagem- específicos e espécie- específicos permitiu reconhecer as diferentes linhagens e espécies.

Estudos envolvendo esterases realizados por Lapenta (1998), nessas mesmas linhagens, também possibilitaram o reconhecimento das linhagens pelo padrão de bandas esterásicas.

Os dados do presente trabalho corroboram os dados obtidos por Lapenta (*op cit.*) para as linhagens D69R2 e D69R5. Essa autora verificou que essas linhagens se assemelhavam mais ao padrão esterásico de *D. buzzatii* do que com as outras linhagens da espécie *D. serido* tipo B, na qual eram incluídas. Isto ocorreu também com o padrão RAPD obtido para essas linhagens, reforçando o potencial discriminativo dessa técnica no reconhecimento de linhagens e espécies.

Outro resultado intrigante foi observado entre as linhagens A55, B20 e B25; a primeira classificada como *D. serido* tipo B (com ocorrência no Brasil) e as outras duas como *D. koepferae* da Argentina. Essas linhagens mostraram um padrão de RAPD muito semelhante. O fato dos resultados obtidos com as outras linhagens terem correspondido com a classificação inferida por outros marcadores, faz com que discutamos a possibilidade desses *primers* não terem sido discriminativos neste caso. É interessante destacar também, que A55 é a linhagem geograficamente mais próxima (Mato Grosso do Sul) do Chaco Argentino, local de onde provém B20 e B25. Além disso, embora todo o cuidado praticado na manipulação dos estoques de laboratório, não podemos descartar a possibilidade da



contaminação do estoque de A55. Entretanto, esses resultados necessitam ser avaliados em maiores detalhes.

No presente estudo, diferentes linhagens do *cluster buzzatii* variaram quanto ao grau de polimorfismo em suas bandas de RAPD. O polimorfismo mais alto foi encontrado nas linhagens incluídas em *D. buzzatii*, seguido das de *D. seriema*. As linhagens de *D. koepferae*, *D. serido* tipo B e tipo D foram menos polimórficas, exceto a linhagem A55 de *D. serido* tipo B e B25 de *D. koepferae* com o *primer* 69. A linhagem B31 de *D. serido* tipo D, ao contrário das demais, apresentou um número elevado de bandas monomórficas com todos os *primers* analisados, variando de 80% a 100%. Entretanto, segundo Williams *et al.* (1990) e Baruffi *et al.* (1995), bandas relatadas como sendo monomórficas devem ocultar heterogeneidade genética devido à dominância dos marcadores RAPD.

O nível de polimorfismo observado em RAPD para essas espécies e linhagens do *cluster buzzatii* foi superior ao observado por Lapenta (1998) em esterases. O trabalho desenvolvido por essa pesquisadora levou ao reconhecimento de 20 tipos esterásicos, provavelmente determinados por 19 locos.

O polimorfismo encontrado entre diferentes linhagens pode ser atribuído aos seguintes fatores: a) alterações nas seqüências de bases das regiões complementares aos *primers*, que impeçam a formação do complexo *primer* - DNA molde e, conseqüentemente, a ocorrência da amplificação; b) inserções de seqüências entre os sítios de iniciação que aumentam o tamanho do segmento molde acima do limite da PCR (4Kb), impedindo que a amplificação ocorra; c) inserções entre os sítios de iniciação, dentro do limite da PCR, que permitem a amplificação mas produzem uma banda de peso molecular maior; d) deleções entre os sítios de iniciação que permitem a amplificação, mas produzem uma banda de peso molecular menor (Ribeiro, 1995).



A avaliação do polimorfismo de DNA obtida através das bandas de RAPD pode mostrar uma variabilidade maior que marcadores cromossômicos ou enzimáticos, e isto ocorreu nas linhagens das espécies incluídas em *D. buzzatii* e *D. seriema*. As linhagens dessas duas espécies apresentaram um alto nível de polimorfismo RAPD, em contraste com uma certa homogeneidade obtida com outros marcadores em linhagens brasileiras dessas espécies.

Uma perda ou ausência de variabilidade cromossômica foi observada nas populações Brasileiras de *D. buzzatii* (Wasserman, 1954; Barker *et al.*, 1985; Figueiredo e Sene, 1992) e *D. seriema* (Ruiz *et al.*, 1996). A perda da variabilidade cromossômica é uma característica comum entre as espécies de *Drosophila* que se dispersaram em direção às bordas da sua área de distribuição (Carson, 1965).

Através de dados da literatura, acredita-se que o Chaco Argentino provavelmente seja o centro de origem de *D. buzzatii* (Carson e Wasserman, 1965) e a sua dispersão pelo mundo ocorreu junto com uma de suas plantas hospedeiras, a espécie de cacto *Opuntia ficus indica* (Sene *et al.*, 1982; Barker *et al.*, 1985), esta é considerada a hipótese de colonização passiva.

Figueiredo e Sene (1992) entretanto, defendem a hipótese da colonização ativa, na qual a espécie *D. buzzatii* teria se dispersado naturalmente da sua área de distribuição para o Brasil. Presume-se, ainda, que as áreas do Sul do Brasil tenham sido colonizadas antes das áreas do nordeste e, portanto, mantido alguma variabilidade cromossômica da área de origem.

Além das inversões cromossômicas, observou-se homogeneidade também em relação às placas metafásicas (Baimai *et al.*, 1983), aloenzimas (Barker *et al.*, 1985) e DNA mitocondrial (Rossi *et al.*, 1996, Manfrin, 1997).



A ausência de variantes no DNA mitocondrial em populações de *D. buzzatii* introduzidas na Europa e Austrália foi explicada por Rossi *et al.* (1996) como colonização recente, efeito do fundador seguido de periódicos gargalos sofridos pela população e migração. Além disso, segundo esses autores, há a possibilidade da existência de algum tipo de seleção a favor dos haplótipos mais freqüentes (I e II). Esses mesmos mecanismos foram usados por Manfrin (1997) para explicar a ausência de variantes genéticas nas populações do Brasil.

O mesmo ocorreu com as linhagens pertencentes à *D. seriema*. Kuhn *et al.* (1996) também encontraram uma variabilidade interlinhagem muito pequena quanto ao cariótipo e inversões cromossômicas e sugeriram que o conjunto de populações que compõem *D. seriema*, seja praticamente monomórfico. Já Manfrin (1997) encontrou divergência, quanto ao estudo do DNA mitocondrial, entre diferentes populações desta espécie. A autora sugeriu, entre outros processos, que essa divergência pode ser explicada pela dinâmica de populações, como a ausência de fluxo gênico. Ainda segundo essa autora, *D. seriema* não possui uma origem monofilética. O estudo de Machado (1998) também mostrou uma grande variação na análise dos parâmetros reprodutivos entre linhagens desta espécie e de *D. buzzatii*.

Na espécie cosmopolita *D. melanogaster*, muitos estudos sugerem que o fluxo gênico dentro e entre os continentes é extensivo e que a variação gênica nuclear é mais encontrada dentro do que entre as populações. Entretanto, Begun e Aquadro (1993) apresentaram evidências que ao nível de seqüência de DNA, as populações de *D. melanogaster* da África são duas vezes mais variáveis do que populações dos Estados Unidos, e que muitas variantes não são compartilhadas entre as duas regiões geográficas.

Embora exista a hipótese que *D. melanogaster* deixou a África para colonizar as regiões temperadas em um passado de milhões de anos,



dados recentes não suportam a hipótese de que a perda da variabilidade genética acompanhou a colonização.

Ainda, segundo Begun e Aquadro (1993), a grande diferença de sítios de restrição polimórficos observados entre as populações de *D. melanogaster* de Zimbabwe e do USA pode ser melhor explicada por mutação e deriva do que por seleção. Existem ao menos duas (não mutualmente exclusivas) explicações potenciais para o contraste entre os dados de DNA e de aloenzimas. Primeiro, a estrutura da população Africana é particularmente diferente da estrutura da população da América do Norte principalmente pela presença de alelos raros nas populações de Zimbabwe que estão ausentes nas populações Americanas e pela presença de um nível superior (de até seis vezes) de heterozigosidade para muitos locus nessas populações. Segundo, os autores não descartam a possibilidade de que sítios de restrição e variação aloenzimática possam ser substancialmente diferentes na dinâmica evolutiva, o que pode também ser verdadeiro para os padrões de RAPD e os outros marcadores analisados nas espécies do *cluster buzzatii*.

Os dados apresentados de RAPD para as linhagens de *D. buzzatii* e *D. seriema* são a primeira boa evidência de que existe uma vasta reserva de polimorfismo nuclear desconhecido segregando nessas populações, que não havia sido detectado por outros marcadores estudados anteriormente.

Através da análise dos resultados obtidos com os três *primers* em conjunto, foi observado que quanto maior o número de marcadores analisados, maior a eficácia da técnica em discriminar diferentes espécies e linhagens geográficas. A importância de se basear as análises na combinação de diferentes *primers*, produzindo coletivamente um grande número de bandas foi discutida por Megnegneau *et al.* (1993). Segundo estes autores, bandas similares em diferentes linhagens podem ser causadas por fragmentos diferentes de DNA de mesmo tamanho. Utilizando-se um grande



número de bandas, erros ocasionais de interpretação não afetarão as conclusões gerais. Dessa forma, este trabalho também sugere que estudos com objetivo de avaliar o grau de relação genética entre diferentes linhagens ou espécies de um dado organismo, devam utilizar o maior número de *primers* possíveis, visando minimizar os erros e aumentar a eficácia da técnica.

A extensão de quais marcadores foram compartilhados entre diferentes linhagens se reflete quantitativamente no cálculo do índice de similaridade. Observa-se que, no grupo das linhagens pertencentes à *D. buzzatii* os valores de IS foram semelhantes, indicando a proximidade entre essas linhagens.

A linhagem B31 de *D. serido* tipo D apresentou um IS muito baixo em relação a todas as outras linhagens analisadas no presente estudo. Outros resultados, como por exemplo a morfologia do edeago (Silva e Sene, 1991; Monteiro, 1997), tipo de cariótipo (Baimai *et al.*, 1983), esterases (Lapenta, 1992; Lapenta *et al.*, 1995) e isolamento reprodutivo (Madi-Ravazzi, 1988, 1992; Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992; Madi-Ravazzi *et al.*, 1997; Machado, 1998) também indicam diferenciação de B31 e A55 em relação às outras linhagens de *D. serido*. Segundo a classificação de Tidon-Sklorz (1992) e Monteiro (1997), B31 estaria incluída no grupo de *D. serido* do tipo D e a linhagem A55, no grupo de *D. serido* tipo B. Embora os tipos B e D sejam encontrados na região centro-sul do Brasil, não existe simpatria entre ambos. *D. serido* tipo B sempre foi encontrada no topo de morros, associada ao cacto *Pilosocereus machrisii*, enquanto *D. serido* tipo D ocorre no vale dos rios, associada ao cacto *Cereus hildemannianus* (Monteiro, 1997). Além disso, Monteiro (1997) sugeriu que *D. serido* B e *D. serido* D podem ser elevadas à categoria de espécie.

Como já mencionado, a linhagem A55 de *D. serido* B apresentou uma grande similaridade com as linhagens de *D. koepferae*, sendo essa similaridade maior do que a entre as próprias linhagens de *D. koepferae*.



Essas últimas, por sua vez, apresentaram diferentes IS conforme o *primer* utilizado, mostrando-se mais ou menos similares entre si. Lapenta (1998) não observou níveis altos de similaridade quanto às esterases entre essas linhagens.

Os dados obtidos por Manfrin (1997) quanto ao DNA mitocondrial sugerem que *D. koepferae* é uma linhagem evolutiva distinta daquela formada pelas espécies de *D. seriema* e *D. serido*. Entretanto, caso não se confirme que houve contaminação dos estoques de A55, B20 e B25, no presente trabalho, os índices de similaridade apresentados entre essas linhagens para RAPD são sugestivos de uma proximidade genética maior entre linhagens do Chaco Argentino e do cerrado Brasileiro, ainda não demonstrada por outros marcadores para as mesmas linhagens.

Manfrin (*op cit.*) ainda menciona o fato da impossibilidade de se definir as relações evolutivas entre *D. koepferae* e as outras espécies do subcluster *serido* com os dados disponíveis até o momento.

D. koepferae possui o tipo E de edeago que está associado à inversão 2j⁹ e tipo metafásico 6. Suas populações ocorrem desde a Serra de San Luis (Argentina) até Comarapa (Bolívia) na borda oeste do Chaco.

D. serido tipo B possui o tipo B de edeago que está associado à inversão 2e⁸ e ao tipo metafásico I. Suas populações são encontradas na parte oeste da caatinga e nas regiões centro-sul do Brasil. Essas populações são encontradas em afloramentos rochosos, com distribuição disjunta, vegetação característica de cerrado e campo rupestre e associadas à espécie de cactos *Pilosocereus machrisis*. A análise morfométrica dos edeagos desses isolados discriminou cada uma dessas populações, sugerindo ausência de fluxo gênico entre elas (Monteiro, 1997).

Segundo Manfrin (1997), *D. koepferae* poderia ser considerada o grupo irmão de *D. buzzatii*. Entretanto, quando comparadas com outras espécies do *cluster*, elas compartilham apenas o padrão de tergitos e uma



coloração externa mais clara (Fontdevila *et al.*, 1988; Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992).

O significado da proximidade genética observada quanto ao padrão de RAPD entre as linhagens de *D. serido* tipo B e *D. koepferae* precisa ser melhor explorado, principalmente pela avaliação de um número maior de populações dos referidos locais onde as linhagens estudadas foram coletadas. Tendo em vista que a maioria dos estudos realizados nessas espécies foram feitos com um número pequeno de linhagens, é necessária uma nova amostragem das populações dessas regiões para um estudo mais detalhado, o qual poderá esclarecer essa lacuna de informações que existe entre as relações evolutivas das espécies *D. koepferae* e as do *subcluster serido*.

As linhagens de *D. seriema* mostraram-se bastante similares com dois *primers* (54 e 69) e menos similares com o outro (86) e na análise geral. O fato das linhagens de *D. seriema* apresentarem diferentes respostas a diferentes marcadores vem sendo discutido em outros trabalhos, principalmente em relação à linhagem A95 (Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992; Madi-Ravazzi *et al.*, 1997; Lapenta, 1998). Lapenta (1992) e Lapenta *et al.* (1995) encontraram inclusive maior similaridade entre A95 e uma linhagem de *D. buzzatii*. Isso pode refletir uma diferenciação maior de A95 em relação às demais linhagens de *D. seriema*. Para a confirmação desse achado deve-se ampliar o número de amostras de linhagens dessa espécie.

As espécies *D. mulleri* e *D. simulans*, utilizadas como grupo externo neste estudo, apresentaram índices um pouco elevados quando comparadas com algumas linhagens estudadas. Segundo Kazan *et al.* (1993), estes índices podem ser improcedentes, uma vez que fragmentos de tamanho similar partilhados por dois indivíduos proximamente relacionados provavelmente sejam alélicos, isto pode não ser verdade quando comparamos grupos taxonômicos superiores (gêneros por exemplo), os quais mostram grande diferenciação devido aos fragmentos de igual



tamanho serem derivados coincidentemente de regiões genômicas não-alélicas. Este problema pode ser solucionado através do uso de enzimas de restrição ou hibridação destes fragmentos entre si.

Estudando linhagens de *Drosophila*, van de Zande e Bijlsma (1995), mostraram que fragmentos amplificados de mesmo tamanho não são similares entre espécies pertencentes a diferentes subgrupos, porém similares entre as espécies do mesmo subgrupo. Por exemplo: as duas sondas de fragmentos de DNA amplificado de *Drosophila melanogaster*, construídas por estes autores, hibridizaram com o fragmento amplificado correspondente (fragmento de mesmo tamanho, amplificado pelo mesmo *primer*) com todas as espécies do subgrupo *melanogaster*. As mesmas sondas não hibridizaram com nenhum outro fragmento amplificado (de tamanho similar ou não da sonda) de outras espécies que não pertenciam ao subgrupo *melanogaster*.

No presente trabalho, considerando a análise de *cluster*, observa-se que a linhagem de *D. simulans*, utilizada como grupo externo, é a mais diferenciada. O grupo das linhagens 3B, R2 e R5, classificadas como *D. buzzatii*, apresenta-se em um nível mais abaixo. Observa-se, porém que há diferentes graus de similaridade entre elas, 3B mantendo-se mais diferenciada em relação às outras duas. O nível seguinte, é composto pela linhagem de *D. mulleri*, a segunda linhagem utilizada como grupo externo. Como já discutido anteriormente, esta posição pode não ser consistente devido à presença de fragmentos de tamanho similar mas de sequência diferente. O próximo nível é composto por um ramo que divide-se em dois, diferenciando a linhagem B31 de *D. serido* tipo D das linhagens A55 de *D. serido* tipo B, B20 e B25 de *D. koepferae* e D72 e A95 de *D. seriema*. A outra porção desta ramificação diferencia as linhagens de *D. seriema* das linhagens de *D. koepferae*, juntamente com a linhagem A55 de *D. serido* tipo B. Observa-se neste último grupo que a linhagem A55 apresenta-se mais



diferenciada e que as linhagens de *D. koepferae* apresentam-se mais similares.

Em uma análise comparativa, utilizando o cladograma elaborado por Tidon-Sklorz (1992) e Tidon-Sklorz e Sene (1995a) e alterado por Ruiz *et al.* (1996), com base principalmente na morfologia do edeago (Silva e Sene, 1991; Tidon-Sklorz, 1992), na presença de inversões cromossômicas (Tosi e Sene, 1989) nos diferentes cariótipos (Baimai *et al.*, 1983), no isolamento reprodutivo (Madi-Ravazzi 1988, 1992; Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992; Madi-Ravazzi *et al.*, 1997) e no padrão de esterases (Lapenta, 1992, 1998; Lapenta *et al.*, 1995), podemos observar que os padrões RAPD confirmam as relações de similaridade entre linhagens da mesma espécie, aproximando, entretanto, em primeiro nível A55 (*D. serido* tipo B) com as linhagens de *D. koepferae*.

O trabalho de Machado (1998) mostrou que dentre as diferentes espécies que compõem o complexo *buzzatii*, as linhagens de *D. buzzatii* foram as que apresentaram o maior grau de isolamento reprodutivo em relação às demais espécies deste complexo. Vários autores corroboram este achado, o que sugere um alto grau de divergência genética desta espécie em relação as demais espécies do *cluster*.

Além das diferenças quanto à formação dos grupos, já descritas, este estudo encontrou outras diferenças na proximidade entre as espécies estudadas. *D. serido* tipo D está bem diferenciada das demais espécies do *cluster* e *D. serido* tipo B encontra-se na mesma ramificação que deu origem à *D. koepferae*, ao contrário do encontrado na literatura, que estaria no mesmo ramo que *D. seriema* (Manfrin, 1997).

Aceita-se que duas populações que estão isoladas geograficamente uma da outra provavelmente divergirão no tempo. Com base nesse pressuposto, os dados apresentados no presente estudo corroboram a hipótese de que, em termos de reavaliação da sistemática do



complexo, as linhagens B31 e A55, hoje classificadas como *D. serido*, na verdade possam constituir cada uma delas uma nova espécie.

Devemos ressaltar que no início do nosso trabalho as linhagens R2 e R5 estavam classificadas como *Drosophila serido* de tipo B de edeago. No decorrer da análise dos resultados deste trabalho e de outros estudos realizados em nosso laboratório (Lapenta, 1998; Machado, 1998), foi verificado que estas linhagens diferiam significativamente de outras linhagens classificadas neste mesmo grupo, e estavam mais próximas da linhagem 3B de *D. buzzatii* do que de qualquer outra. Após uma reavaliação do tipo de edeago de R2 e R5 verificou-se que estes são específicos de linhagens de *D. buzzatii*. Como já foi mencionado em Material e Métodos, estas linhagens são provenientes do Depto. de Genética da USP de Ribeirão Preto e já vieram classificadas. Assim, queremos ressaltar a confiabilidade das técnicas utilizadas, inclusive a do presente trabalho, para discriminar linhagens de espécies diferentes.

Em algumas reações de amplificação foi verificada a presença de produtos de amplificação no controle negativo (sem DNA) e que não correspondiam em tamanho com nenhum fragmento das amostras amplificadas.

Artefatos com produtos de amplificação de DNA não específico em reações de controle negativo também foram observados por Williams *et al.* (1990) na descrição da técnica, e posteriormente por Lanham *et al.* (1992), Tingey e Del Tufo (1993) e Pan *et al.* (1997). Segundo Pan *et al.* (1997), esses fragmentos inespecíficos seriam derivados do *primer* e formados sem um DNA molde, uma vez que a reação do controle negativo contém todos os componentes, exceto DNA. Esses autores realizaram experimentos omitindo alguns componentes da reação e observaram os resultados. Apenas quando o DNA molde e o *primer* foram omitidos da reação, ou quando somente o *primer* foi omitido, nenhum produto de amplificação foi observado. Os autores suspeitam que esses produtos de DNA



polimórfico inespecífico, sejam amplificados a partir de DNAs contaminantes dos kits de *primers* ou da DNA polimerase. As causas da amplificação de *primer*-derivados ainda é desconhecida, sabe-se apenas que a sua presença não é devida ao anelamento aleatório, uma vez que eles são relativamente grandes, variando de 100 a 2000 pb; muitos são resistentes ao calor e recompõem sua estrutura de cadeia-dupla quando resfriados gradualmente à temperatura ambiente após terem sido aquecidos em água fervente por 10 minutos; não são hibridizados por *Southern blot* com nenhum produto de amplificação proveniente das amostras com DNA molde. Além disso, quando existe a presença de um DNA molde na reação, nenhum desses produtos foi identificado, o que sugere que o DNA molde inibe de alguma maneira a amplificação desses produtos inespecíficos.

O polimorfismo revelado pela amplificação com *primers* aleatórios é imenso e, para o nosso conhecimento, este foi o primeiro relato da quantidade da variabilidade genética dentro e entre linhagens de *Drosophila* do *cluster buzzatii* usando marcadores RAPD.

Os resultados apresentados demonstram que o método de RAPD (Williams *et al.*, 1990) é uma técnica eficiente e de alta resolução para documentar a variabilidade dentro e entre populações tais como as de *Drosophila*. Os três *primers* utilizados identificaram regiões do DNA que são variáveis intra e interlinhagens e regiões conservadas. Estes segmentos de DNA que são freqüentemente variáveis no tamanho entre os indivíduos ou populações podem servir como marcadores genéticos polimórficos e também para diferenciar populações de áreas geográficas distintas. Além disso, os fragmentos amplificados podem ser usados posteriormente como sondas, tanto para averiguação da homologia dos fragmentos amplificados com o mesmo tamanho, como para hibridizar com seus respectivos locos no genoma da mosca, para que este possa ser eventualmente mapeado e caracterizado.



V- RESUMO E CONCLUSÕES

Dada a ampla diferenciação encontrada nos diferentes marcadores genéticos estudados nas populações das espécies incluídas no *cluster buzzatii* de *Drosophila* e os aspectos intrigantes do seu processo de especiação, o presente trabalho foi elaborado principalmente com a finalidade de avaliar o potencial taxonômico da técnica de RAPD para as espécies desse grupo.

Foi realizada a amplificação do DNA genômico com três *primers* em três linhagens de *Drosophila buzzatii*, duas de *D. seriema*, duas de *D. koepferae*, uma linhagem de *D. serido* tipo B e uma de *D. serido* tipo D. Foram utilizadas como grupo externo uma linhagem de *D. mulleri* e uma de *D. simulans*. No total foram produzidas 99 bandas RAPD que variaram de 290 a 5090 pares de bases de comprimento.

Devido à presença de fragmentos de DNA linhagem-específicos e espécie-específicos, gerados pelos diferentes *primers*, foi produzido um padrão característico de bandas RAPD que permitiu reconhecer as diferentes linhagens e espécies.

O maior coeficiente de variação foi obtido nas linhagens incluídas em *D. buzzatii* seguido das de *D. seriema*. As linhagens de *D. koepferae*, *D. serido* tipo B e tipo D foram menos polimórficas, exceto a linhagem A55 de *D. serido* tipo B e B25 de *D. koepferae* com o *primer* 69. A linhagem B31 de *D. serido* tipo D, ao contrário das demais, apresentou um número elevado de bandas monomórficas com todos os *primers* analisados.

Os dados de RAPD apresentados para as linhagens de *D. buzzatii* e *D. seriema* são a primeira evidência de que existe uma vasta reserva de polimorfismo nuclear desconhecido segregando nessas populações. O nível de polimorfismo RAPD encontrado nas linhagens



estudadas foi superior ao observado em estudos de esterases para essas mesmas linhagens.

A análise do Índice de Similaridade e a análise de *Cluster* confirmam as relações de proximidade obtidas por outros marcadores para essas linhagens, reforçando a diferenciação das linhagens de *D. serido* tipo B e tipo D em relação às demais espécies do *cluster*. Entretanto, aproximou a linhagem A55 (*D. serido* tipo B), do cerrado Brasileiro, com linhagens de *D. koepferae* do Chaco Argentino. Esse achado não havia sido observado com nenhum outro marcador.

A técnica de RAPD mostrou-se eficiente e de alta resolução para revelar novos polimorfismos não detectados por outros marcadores, documentar a variabilidade dentro e entre populações e para a classificação taxonômica.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The great differentiation found with the use of different genetic markers in the populations of the *Drosophila* species included in the *buzzatii* cluster and the intriguing aspects of its speciation process, led to the present study, elaborated mainly with the purpose of evaluating the taxonomic potential of the RAPD assay for those species.

The amplification of the genomic DNA with three different oligonucleotide primers was done in three strains of *D. buzzatii*, two of *D. seriema*, two of *D. koepferae*, one of *D. serido* type B and one of *D. serido* type D. As outgroups, one strain of *D. mulleri* and one of *D. simulans* were used. In total, 99 RAPD bands that varied from 290 to 5090 pb were produced.

Strain-specific and species-specific DNA fragments generated by the different primers produced a characteristic pattern of RAPD bands that allowed to recognize the different strains and species.

The largest coefficient of variation was obtained in the *D. buzzatii* strains followed by *D. seriema* strains. *D. koepferae* and *D. serido* types B and D strains were less polymorphic, except the strain A55 of *D. serido* type B and B25 of *D. koepferae* for the primer 69. The strain B31 of *D. serido* type D, unlike the others, presented a high number of monomorphic bands for all the primers used.

The present RAPD data for the strains of *D. buzzatii* and *D. seriema* are the first evidence for the existence of a vast stock of unknown nuclear polymorphism segregating in those populations. The level of RAPD polymorphism found in the strains studied was remarkably higher than that observed in studies of esterases performed in the same strains.

The Similarity Index and the Cluster Analysis confirmed the relationships obtained using other markers in the same strains, reinforcing the idea of a differentiation between the strains of *D. serido* types B and D



and the other species in the *cluster*. However, the strain A55 (*D. serido* type B) from Brazilian cerrado showed to be closer to *D. koepferae* of the Argentinean Chaco. This finding was not observed with any other marker.

The RAPD assay showed high resolution and efficiency to reveal new polymorphisms not detected by other genetic markers, to document the variability within and among populations and also for taxonomic purposes.

using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor. Appl. Genet.*, v.86, p.991-1000, 1993.

APOSTOL, B. L., BLACK IV, W. C., REITER, P., MILLER, B. R. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at the oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.51, n.1, p.89-97, 1994.

APOSTOL, B. L., BLACK IV, W. C., REITER, P., MILLER, B. R. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, v.76, p.325-334, 1996.

BAJMAL, V., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. P. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus - breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v.60, p.81-92, 1983.

BALLINGER-CRABTREE, M. E., BLACK IV, W. C., MILLER, B. R. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.47, n.6, p.893-901, 1992.

BARKER, J. S. F., SENE, F. M., EAST, P. D., PEREIRA, M. A. Q. R. Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. *Genetica*, v. 67, p. 161-170, 1985.

BARUFFI, L., DAMIANI, G., GUGLIELMINO, C. R., BRANDI, C., MALACRIDA, A. R., GASPERI, G. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata* comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, v.74, p.423-437, 1995.

BECKMANN, J. S., SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, v.8, p.920-932, 1990.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. In: *Paleoclimas*, v.3, p.1-19, 1977.
- APOSTOL, B. L., BLACK IV, W. C., MILLER, B. R., REITER, P., BEATY, B. J. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor. Appl. Genet.*, v.86, p.991-1000, 1993.
- APOSTOL, B. L., BLACK IV, W. C., REITER, P., MILLER, B. R. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at the oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.51, n.1, p.89-97, 1994.
- APOSTOL, B. L., BLACK IV, W. C., REITER, P., MILLER, B. R. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, v.76, p.325-334, 1996.
- BAIMAI, V., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. P. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus - breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v.60, p.81-92, 1983.
- BALLINGER-CRABTREE, M. E., BLACK IV, W. C., MILLER, B. R. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.47, n.6, p.893-901, 1992.
- BARKER, J. S. F., SENE, F. M., EAST, P. D., PEREIRA, M. A. Q. R. Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. *Genetica*, v. 67, p. 161-170, 1985.
- BARUFFI, L., DAMIANI, G., GUGLIELMINO, C. R., BRANDI, C., MALACRIDA, A. R. GASPERI, G. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, v.74, p.425-437, 1995.
- BECKMANN, J. S., SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, v.8, p.930-932, 1990.



- BEGUN, D. J., AQUADRO, C. F. African and North American populations of *Drosophila melanogaster* are very different at the DNA level. *Nature*, v. 365, p. 548-550, 1993.
- BIZZO, N. M. V. *Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em Drosophila serido*. São Paulo, 1983. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- BRAUNER, S., CRAWFORD, D. J., STUESSY, T. F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *Am. Jour. Bot.*, v.79, n.12, p.1436-1439, 1992.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAN, B. J., GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, v.9, p.553-557, 1991.
- CARSON, H. L. Chromosomal polymorphism in geographically widespread species of *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Sympos. Quant. Biol.*, v. 20, p. 276-287, 1965.
- CARSON, H. L., WASSERMAN, M. A widespread chromosomal polymorphism in a widespread species of *Drosophila buzzatii*. *Am. Nat.*, v. 99, p. 111-115, 1965.
- CENIS, J. L., BEITIA, F. Aplicación de la tecnica RAPD-PCR (ADN polimorfo amplificado al azar) a la identificación de insectos. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, v.9, n.2, p.289-297, 1994.
- CROWHURST, R. N., HAWTHORNE, B. T., RIKKERINK, E. H. A., TEMPLETON, M. D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *Cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics*, v.20, p.391-396, 1991.
- DELLAPORTA, S.; WOOD, L. J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DEVERNO, L. L., SMITH, G. A., HARRISON, K. J. Randomly amplified polymorphic DNA evidence of introgression in two closely related sympatric species of coniferophagous *Choristoneura* (Lepdoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.91, n.3, p.248-259, 1998.
- FAVIA, G., DEMOPOULOS, G., DELLA-TORRE, A., TOURÉ, Y. T., COLUZZI, M., LOUIS, C. Polymorphisms detected by random PCR distinguish between



different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.10315-1-319, 1994.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2º ed. Brasília; EMBRAPA-CENARGEN, 220pp, 1996.

FIGUEIREDO, V. L. C., SENE, F. M. Chromosome variability in Brazilian populations of *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 52, n. 4, p. 555-561, 1992.

FONTDEVILA, A., PLA, S. HASSON, E., WASSERMAN, M., SANCHEZ, A., NAVEIRA, H., RUIZ, A. *Drosophila keopferae*: A new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) Superspecies Taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.81, n.3, p.380-385, 1988.

GARCIA, A. L., CARRASCO, H. J., SCHOFIELD, C. J., STOTHARD, J. R., FRAME, I. A., VALENTE, S. A. S., MILES, M. A. Random amplified polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: *Ruduviiidae*). *J. Med. Entomol.*, v.35, n.1, p.38-45, 1998.

GARNER, K. J., SLAVICEK, J. M., Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Mol. Biol.*, v.5, n.2, p.81-91, 1996.

GOODWIN, P.H., ANNIS, S.L. Rapid Identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Appl. Env. Microb.*, v. 57, n. 9, p. 2482-2486, 1991.

GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v.39, p.439-446, 1974.

HADRYIS, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, v. 1, p. 55-64, 1992.

HALWARD, T. M., STALKER, H. T., LA RUE, E. A., KOCHERT, G. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol. Biol.*, v.18, p.315-325, 1992.



- HAYMER, D. S., McINNIS, D. O. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, v.37, p.244-248, 1994.
- HEUN, M., HELENTJARIS, T. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.*, v. 85, p. 961-968, 1993.
- HILLS, D. M., MORITZ, C. *Molecular Systematics*. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 1990, 588p.
- HOY, M. A. *Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications*. Academic Press, California, 1994, 546p.
- HU, J., QUIROS, C. F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.*, v.10, p.505-511, 1991.
- HUNT, G. J., PAGE JR, R. E. Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol. Gen. Genet.*, v.244, p.512-518, 1994.
- HUNT, G. J., PAGE JR, R. E. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*, v.139, p.1371-1382, 1995.
- HUNT, G. J., GUZMÁN-NOVOA, E., FONDRK, M. K., PAGE JR, R. E. Quantitative trait loci for honey bee stinging behavior and body size. *Genetics*, v.148, n.3, p.1203-1213, 1998.
- KAMBHAMPATI, S., BLACK IV, W. C., RAI, K. S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.*, v.29, n.6, p.939-945, 1992.
- KAZAN, K, MANNERS, J. M., CAMERON, D. F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, v. 85, p. 882-888, 1993.
- KUHN, G. C. S., RUIZ, A., ALVES, M. A. R., SENE, F. M. The metaphase and polytene chromosomes of *Drosophila seriema* (repleta group; mulleri subgroup). *Rev. Bras. Genet.*, v.19, n.2, p.209-216, 1996.
- LANDRY, B. S., DEXTRAZE, L., BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species. (Hymenoptera: Mymaridae and



Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome*, v.36, p.580-587, 1993.

LANHAM, P. G., FENNELL, S., MOSS, J. P., POWELL, W. Detection of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic DNAs. *Genome*, v. 35, p. 885-889, 1992.

LAPENTA, A. S. *Padrão de esterases na superespécie Drosophila serido e em D. buzzatii*. São José do Rio Preto, 1992. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

LAPENTA, A. S. *Caracterização de espécies de Drosophila do "cluster" buzzatii, com base nos padrões de esterases*. São José do Rio Preto, 1998. 104p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

LAPENTA, A. S., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R., MANZATO, J. A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, v.84, p.13-29, 1995.

LITT, M., LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v.44, p.398-401, 1989.

LYNCH, M., MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, v.3, p.91-99, 1994.

MACHADO, L. P. B. *Parâmetros reprodutivos e grau de assinapse nos cromossomos politênicos de espécies de Drosophila do cluster buzzatii*. São José do Rio Preto, 1998, 89p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

MADI-RAVAZZI, L. *Aspectos citogenéticos, reprodutivos e especiação em Drosophila serido*. São José do Rio Preto, 1988, 106p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

MADI-RAVAZZI, L. *Estudo da diferenciação entre isolinhagens da superespécie Drosophila serido, com base em aspectos reprodutivos e citogenéticos*. São José do Rio Preto, 1992, 133p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.



- MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H. E. M. C. Differentiation of *Drosophila serido* (isofemale line A95F3) and *D. koepferae* (isofemale line B20D2) reproductive isolation, development time and polytene chromosome banding patterns. *Rev. Bras. Gen.*, v.15, p.831-851, 1992.
- MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H. E. M. C., MANZATO, J. A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. *Cytobios*, v.89, p.21-30, 1997.
- MANFRIN, M. H. *Filogenia do "cluster" buzzatii (Diptera, Drosophilidae), inferida a partir do DNA mitocondrial, com ênfase nas populações brasileiras do "subcluster" serido*. Ribeirão Preto, 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- MARDIA, K. V., KENT, J. T., BIBBY, J. M. Multivariate analysis. *Acad. Press.*, NY, 1980.
- MARILLIA, E. F., SCOLES, G. J. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome*, v.39, p.646-654, 1996.
- MARTIN, G. B., WILLIAMS, J. G., TANKSLEY, S. D. Rapid identification of markers near a *Pseudomonas* resistance gene in tomato using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.80, p.2336-2340, 1991.
- MEGNEGNEAU, P., DEBETS, F., HOEKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.*, v.23, p.323-329, 1993.
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I., KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MILLAN, T., OSUNA, F., COBOS, S., TORRES, A. M. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.*, v.92, p.273-277, 1996.
- MONTEIRO, S. G. *Morfometria multivariada de populações naturais de Drosophila serido*. Ribeirão Preto, 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.



- MORAES, M. A. M. *Isolamento sexual entre populações da superespécie Drosophila serido (Diptera, Drosophilidae)*. São Paulo, 1992. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzimol.*, v.55, p.335-350, 1987.
- NEI, M., LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.76, p.5269-5273, 1979.
- PAN, Y. B., BURNER, D. M., EHRLICH, K. C., GRISHAM, M. P., WEI, Q. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *BioTechniques*, v. 22, p. 1071-1077, 1997.
- PASCUAL, M., BALANYA, J., LATORRE, A., SERRA, L. Analysis of the variability of *Drosophila azteca* and *D. athabasca* populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v. 35, p. 159-164, 1997.
- PATTERSON, J. T., STONE, W. S. *Evolution in the genus Drosophila*. Mac Millan Co., New York, 1952.
- PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R., SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites in some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Ciênc. e Cult.*, v.35, n.9, p.1313-1319, 1983.
- RAFAEL, V., ARCOS, G. Subgrupo *inca*, un nuevo subgrupo del grupo *repleta* con descripción de *Drosophila huancavilcae* N. SP. (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica*, v.3, p.233-243, 1989.
- REITER, R. S., WILLIAMS, J. G. K., FELDMANN, K. A., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V., SCOLNIK, P. A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, p.1477-1481, 1992.
- REYES, A., OCHANDO, M. D. Use of molecular markers for detecting the geographical origin of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 91, n.2, p.222-227, 1998.



- RIBEIRO, L. A. *Variabilidade genética por RAPD em fungos endófitos do gênero Penicillium, provenientes de Zea mays L.* Curitiba, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.
- ROSSI, M. S., BARRIO, E. LATORRE, A., QUEZADA-DÍAZ, J. E., HASSON, E., MOYA, A., FONTDEVILA, A. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXX. Mitochondrial DNA polymorphism in original and colonizing populations. *Mol. Biol. Evol.*, v. 13, p. 314-323, 1996.
- RUIZ, A., FONTDEVILA, A. Ecología y evolución del grupo *mulleri* de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta Cient. Venezolana*, v.32, p.338-345, 1981.
- RUIZ, A., CANSIAN, A., ALVES, M. R., SENE, F. M. Alteração na filogenia cromossômica do subcluster *D. serido*. *Rev. Bras. Gen.*, v.19, n.3 (suppl.), 269p. (B-298), 1996.
- SAIKI, R. K., GELFAND, H. D., STOEFFEL, S., SHCARF, S. J., HIGUCHI, G., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.
- SCHNELL, R. J., MADEIRA, P. M., HENNESSEY, M. K., SHARP, J. L. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.89, n.1, p.122-128, 1996.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* species in South America. In: J.S.F. Barker and W. T. Starmer (eds.) *Ecological Genetics and Evolution: the cactus-yeast Drosophila model system*. Academic Press, Sydney, Australia, p. 97-106, 1982.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Science*, v.42, n.1-2, p.81-88, 1988.
- SILVA, A. F. G. Sistemática de *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Ciê. e Cult.*, v.33, p.684, 1981.
- SILVA, A. F. G., SENE, F. M. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Ent.*, v.35, p.455-468, 1991.



- SUAZO, A., MCTIERNAN, R., HALL, H. G. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera*) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Heredity*, v.89, n.1, p.32-36, 1998.
- TIDON-SKLORZ, R. *Identificação da fauna de Drosophila (Diptera, Drosophilidae) da Cadeia do Espinhaço, e análise morfométrica das populações da espécie politípica D. serido*. Ribeirão Preto, 1992. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evolución Biológica*, v.8, n.9, p.71-85, 1995a.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. *Drosophila seriema* n. sp.: A new member of the *D. serido* (Diptera, Drosophilidae) Superspecies Taxon. *Ann. Ent. Soc. Am.*, v.88, n.2, p.139-142, 1995b.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Fauna of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the northern area of the "Cadeia do Espinhaço", States of Minas Gerais and Bahia, Brazil: Biogeographical and ecological aspects. *Inheringia, Sér. Zool.*, v.78, p.85-94, 1995c.
- TINGEY, S. V., del TUFO, J. P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.*, v. 101, p. 349-352, 1993.
- TOSI, D. *Análise das inversões cromossômicas de D. serido*. São Paulo, 1982. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- TOSI, D., SENE, F. M. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Gen.*, v.12, p.729-745, 1989.
- van HEUSDEN A. W., BACHMANN, K. Genotype relationships in *Microseris-Elegans* (Asteraceae, Lectuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Plant. Syst. Evol.*, v.179, p.221-233, 1992.
- van de ZANDE, L., BIJLSMA, R. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *J. Evol. Biol.*, v.8, p.645-656, 1995.
- VILELA, C. R. A revision of *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae) *Rev. Bras. Ent.*, v.27, p.1-114, 1983.



- VILELA, C. R., SENE, F. M. Two new neotropical species group (Diptera, Drosophilidae) *Rev. Bras. Ent.*, v.30, n.20, p.295-299, 1977.
- WASSERMAN, M. Cytological studies of the repleta group. *Univ. Texas Publ.*, v.5422, p.130-152, 1954.
- WASSERMAN, M. Cytological studies of the repleta group of the genus *Drosophila*. V The *mulleri* group. *Univ. Texas Publ.*, v.6205, p.85-118, 1962.
- WASSERMAN, M. Evolution of the repleta group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3b. Academic Press, Ashburner, M., Carson, H. L., Tompson, J. N., London, p.61-139, 1982.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: Krimbas, C.B. e Powell, J.R. (eds). *Drosophila inversion polymorphism*. CRC Press, Boca Ratón, Fla; p.455-552, 1992.
- WEINING, S., LANGRIDGE, P. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.*, v.82, p.209-216, 1991.
- WELSH, J., McCLEALLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Ac. Res.*, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WELSH, J., HONEYCUTT, R. J., McCLELLAND, M., SOBRAL, B.W.S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.*, v.18, p.6531-6535, 1991.
- WILDE, J. WAUGH, R., POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* v.83, p.871-877, 1992.
- WILKERSON, R. C., GAFFIGAN, T. V., LIMA, J. B. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.90, n.6, p.721-732, 1995a.
- WILKERSON, R. C., PARSONS, T. J., KLEIN, T. A., GAFFIGAN, T. V., BERGO, E., CONSOLIM, J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.32, n.5, p.697-704, 1995b.



WILLIAMS, J. K. G., KUBELIK, A. R., LITVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.*, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. *Meth. Enzymol.*, v.218, p.704-740, 1993.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application nº. 0534858 A1, 1993.



