

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Evolução cromossômica da superespécie
Drosophila paulistorum e ecologia
de populações marginais**

Ana Cristina Lauer Garcia

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiiesky
Co- Orientadora: Dra. Cláudia Rohde

Porto Alegre, Março de 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Ao meu amor Martín, por estar sempre
ao meu lado e por tornar a minha vida
mais feliz.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dra. Vera Lúcia Valente. Vera, é sempre com enorme carinho e profunda gratidão que me recordo do dia em que me recebeste para fazer parte do teu grupo de pesquisa. Na época eu estava começando meu curso de graduação em Ciências Biológicas na UFRGS e mal sabia quem eram as “drosófilas” e muito menos qual era a sua importância de estudo. Logo o teu jeito apaixonado de fazer pesquisa me contagiou, o tempo foi passando, concluí minha graduação, meu mestrado e agora, finalmente meu doutorado, sempre sob a tua tutela. Hoje entendo bem a frase do professor Dr. A. R. Cordeiro quando ele se refere as drosófilas como as “cinderelas da genética”. Obrigada Vera, por me fazer crescer como pessoa durante todos esses anos de convívio, pela tua intuição visionária, teu incentivo incansável, enfim, pelos teus ensinamentos de vida.

À minha querida co-orientadora, Dra. Cláudia Rohde. Cláudia, trabalhar contigo é uma honra em todos os sentidos, é a garantia do trabalho maduro, da crítica correta, do elogio sincero, do caminhar contínuo, da orientação humana e amiga. Obrigada por seres uma pessoa tão especial na minha vida e por teres trabalhado sempre junto. Deixo expresso meu desejo de que nossa parceria nunca acabe e que eu possa continuar crescendo sempre espelhada no teu modelo de profissionalismo e competência.

Ao meu nobre amigo e batalhador incansável, Dr. Victor Hugo Valiati. Obrigada Victor por nossa parceria ter dado tão certo e por nos entendermos tão bem, agradeço por teres partilhado teus conhecimentos comigo durante nossas incansáveis discussões científicas ao

longo de tantos sábados, domingos, feriados e também ao longo de alguns dias de semana.

Que nós continuemos a dar certo!

Ao meu amor Martín Montes, minha alegria maior, minha certeza de apoio. Obrigada por desfrutar comigo das minhas alegrias e por nunca me deixar cair perante as minhas dificuldades. Agradeço a enorme ajuda técnica e sentimental para a conclusão desse trabalho. Obrigado por tudo que tens feito por minha causa, desde aprender a repicar mosquinhas até a parte mais cansativa do trabalho de campo onde me ajudaste a colocar as iscas nos pontos de coleta e a processar o material no laboratório. Agradeço o esforço sem medidas, o carinho com que sempre me trazias chimarrão e bolachinhas quando eu precisava de “energia” para continuar a trabalhar. A tua enorme paciência quando nem mesma eu me agüentava, por procurares soluções para os meus problemas, pela palavra sempre amiga, por dares sentido a minha vida e por me fazeres tão feliz ao teu lado. Por tudo isso as palavras mais simples parecem serem agora as melhores: te amo!

Ao meu amigo Marco Gottschalk, que se destaca por ser um grande colega de laboratório em duplo sentido: físico e de trabalho propriamente dito. Obrigada pela identificação dos drosofilídeos coletados e pela enorme colaboração na parte ecológica dessa Tese. Foi um grande privilégio poder contar contigo.

Às alunas de Iniciação científica Grazia Fagundes Audino e Juliana Kreling, obrigada pelo precioso auxílio em muitos momentos desse trabalho.

A minha colega Lizandra Robe, uma pessoa a quem admiro muito por sua maturidade profissional e extrema competência científica. Obrigada Liz por me ajudar em algumas das minhas análises.

Às colegas Maríndia Deprá e Juliana Cordeiro, obrigada pelas inúmeras vezes em que vocês gentilmente me cederam meios de cultura para que eu pudesse repicar meus estoques. Valeu pela força!

Ao pessoal do laboratório de *Drosophila* da UFRGS: Adriana, Cláudia, Fabiano, Grazia, Hermes, Jonas, Juliana, Lizandra, Luis, Marco, Marícia, Maríndia, Monica Ronaldo, Rosane, Sabrina, pelo convívio de todos os dias.

A Berê e companhia LTDA (Marcelo, Dani, Jane e Helena) obrigada pelo apoio técnico e também por me permitirem dar tanta risada (as histórias que conheço já dariam outra Tese!) Obrigada pelo carinho com que sempre me trataram e por serem pessoas tão legais.

Ao Luciano pelo processamento do material fotográfico.

Aos meus pais, Casimiro García Fernández e Sonia Lauer Garcia, a quem agradeço não só os genes que me deram, mas também o fato de terem buscado com que seus filhos os expressassem com liberdade e responsabilidade. Também sou grata a grande filosofia de vida que me ensinaram “o viver sendo para o outro” e o “viver em função dos filhos”. Pai e mãe,

obrigada pelo amor incondicional e por me influenciarem positivamente pelo gosto em estudar a vida e os mecanismos envolvidos na sua complexidade.

Aos meus irmãos Ricardo, Sofia e Carlos Frederico por torcerem pela minha felicidade.

À professora Dra. Helga Winge pela atenção com que sempre me recebeu em sua sala e por disponibilizar a sua residência para as coletas de drosofilídeos.

Aos coordenadores do Parque Gabriel Knijnik, Jardim Botânico e Parque Farroupilha pela disponibilidade desses locais para estudo.

Aos pesquisadores Margaret Kidwell, Joana Silva, Lee Ehrman, Yong Kyu Kim, Marlúcia Martins, Carlos Vilela, Hermes Medeiros, Beatriz Goñi, Daniela De Toni, Marco Gottschalk, Hermes Schmmitz e André Schnorr, por cederem gentilmente algumas das linhagens utilizadas no presente estudo.

Ao Elmo e a Ellen pela disponibilidade para solucionar problemas e dúvidas.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. Importância dos cromossomos politênicos em estudos evolutivos.....	1
2. O subgrupo da <i>Drosophila willistoni</i>	12
2.1 Aspectos taxonômicos e históricos.....	12
2.2 Importância do estudo das espécies crípticas.....	16
2.3 Distribuição geográfica.....	18
2.4 Identificação das espécies.....	22
3. A superespécie <i>Drosophila paulistorum</i>	24
3.1 Aspectos gerais.....	24
3.2 Aspectos cromossômicos.....	30
3.2.1 Polimorfismo cromossômico dentro das semi-espécies.....	31
3.2.2 Polimorfismo cromossômico entre as semi-espécies.....	35
3.3 Relações evolutivas entre as semi-espécies de <i>D. paulistorum</i>	36
3.4 Aspectos ecológicos.....	37
3.5 Populações ecológica e geograficamente marginais.....	39
3.6 Polimorfismo cromossômico em populações marginais.....	41
OBJETIVOS	45

CAPÍTULO II

A Photomap of polytene chromosomes and inversion polymorphism in Andean-Brazilian semispecies of <i>Drosophila paulistorum</i>	46
--	----

CAPÍTULO III

Evolução cromossômica dos autossomos das semi-espécies de *Drosophila paulistorum*:
elementos B, C e E de Muller.....72

CAPÍTULO IV

Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group.

I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B)90

CAPÍTULO V

Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through
electrophoretical mobility of Acid phosphatase-1.....103

CAPÍTULO VI

Vinte anos de colonização do ambiente urbano de Porto Alegre, Sul do Brasil, pela *Drosophila
paulistorum* (Diptera, Drosophilidae).....120

CAPÍTULO VII

First evidence of *Drosophila malerkotliana* in the extreme South of Brazil (Porto
Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil).....151

CAPÍTULO VIII

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....155

RESUMO e *ABSTRACT*.....162

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....168

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. Importância dos cromossomos politênicos em estudos evolutivos

Entre as vantagens da escolha da *Drosophila* como um organismo modelo para estudos de citogenética e evolução cromossômica destaca-se a presença, nesse díptero, dos chamados cromossomos politênicos. Esses cromossomos gigantes, como são também chamados, foram visualizados pela primeira vez em 1881 por E. G. Balbiani que observou que os núcleos de algumas células secretoras do mosquito *Chironomus* pareciam estar preenchidos por uma estrutura distintamente longa, larga e em forma de fita com tumefações e bandas transversas, a qual ele denominou de “cordas nucleares”. Balbiani (1890) voltou a ver a mesma estrutura em macronúcleos de uma espécie de protozoário. Embora muitos outros registros tenham sido feitos acerca destas “cordas nucleares”, o seu reconhecimento como estruturas cromossômicas aconteceu somente 30 anos após a sua primeira descrição (revisão em Sorsa 1988).

Estudos realizados principalmente a partir da década de 50, propiciaram importantes achados a respeito dos cromossomos politênicos. Foi verificado, por exemplo, que eles consistem de um arranjo linear e independente de unidades gênicas, sendo formados em núcleos interfásicos como produtos de sucessivos ciclos de replicação, sem a conseqüente

separação das cromátides filhas (endomitose ou endoploidia). Dessa forma, esses cromossomos resultam em uma grande estrutura, que apresenta um bandamento natural, formado pela sinapse precisa dos cromômeros paralelos das cromátides politenizadas. Para cada espécie de *Drosophila*, o padrão de bandas ao longo do comprimento dos cromossomos politênicos é único, sendo possível, também, distinguir cada um dos diferentes cromossomos, que têm uma seqüência das bandas e de regiões marcadoras típicas. O padrão de distribuição dessas bandas pode ser comparado às organizações apresentadas pelas etiquetas de “código de barras”, presentes em produtos comerciais (revisão em Ashburner 1976).

Na espécie *Drosophila melanogaster*, os cromossomos politênicos são formados após 10 ciclos de replicação, que geram 1024 ($=2^{10}$) filamentos por par cromossômico, por núcleo diplóide (Swift 1962), oferecendo uma resolução sem igual, quando comparados aos cromossomos mitóticos da mesma espécie. Isto reflete, claramente, as vantagens que os cromossomos politênicos representam para o estudo de pequenos detalhes da organização estrutural do genoma. A abundância de marcas estruturais relevantes e constantes faz desses cromossomos uma excelente ferramenta para estudos citológicos de evolução.

Painter (1933) foi o primeiro pesquisador a desenvolver uma técnica para a obtenção de preparados de cromossomos politênicos, a partir da glândula salivar de larvas de *D. melanogaster*. Ele demonstrou que as bandas desses cromossomos seguem precisamente a seqüência de genes mutantes, conhecidos através da técnica tradicional de mapeamento gênico em *Drosophila*. A alta qualidade dos preparados cromossômicos do tecido da glândula salivar larval, obtido mais tarde por Tan (1935) e Koller (1936), permitiu, pela primeira vez, a identificação de alças de inversões em heterozigotos de *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* e em seus híbridos. Quase ao mesmo tempo, Pataü (1935) observou que as espécies crípticas *D.*

melanogaster e *D. simulans* diferem uma da outra, em seu cariótipo, apenas por um segmento invertido fixado no braço direito do terceiro cromossomo (3R). Um cromossomo invertido é gerado por duas quebras cromossômicas e conseqüente rotação de 180° do segmento envolvido. Dos dois diferentes tipos de inversões, a forma mais encontrada em *Drosophila* é aquela que se restringe a um único braço do cromossomo e não inclui o centrômero, sendo chamada de inversão paracêntrica. O outro tipo de inversão é chamada de pericêntrica e inclui os dois braços de um mesmo cromossomo, juntamente com o centrômero.

Existem diferenças importantes em relação às conseqüências genéticas dos dois tipos de inversões, quando permutações ocorrem dentro dos segmentos invertidos, durante a meiose de indivíduos heterozigotos (Figura 1). A ocorrência de recombinação (*crossing over*) dentro da alça de inversão tende a diminuir a freqüência de gametas cromossomicamente normais e funcionais porque gera produtos meióticos não viáveis, com cromátides dicêntricas e acêntricas, portadoras de duplicações e deleções (Figura 1A). Hinton e Lucchesi (1960) foram os primeiros a verificar que em fêmeas de *D. melanogaster* ocorre um mecanismo bastante refinado contra a produção de gametas não-balanceados, resultantes de recombinação dentro da alça de inversão. Esses autores observaram que as divisões meióticas no ovário ocorrem junto a uma das extremidades do oócito e o fuso é orientado de tal forma que, em fêmeas heterozigotas, o produto meiótico, eliminado como primeiro corpúsculo polar, é sempre uma das cromátides balanceadas (com a ordem gênica normal ou invertida). Como segundo corpúsculo polar, é sempre eliminada a cromátide dicêntrica, formada quando ocorre recombinação dentro da região invertida. A cromátide que permanece na célula é sempre uma das cromátides balanceadas (com a ordem gênica inversa à primeira que foi eliminada), e essa irá formar o núcleo funcional do gameta. O fragmento acêntrico, também formado como

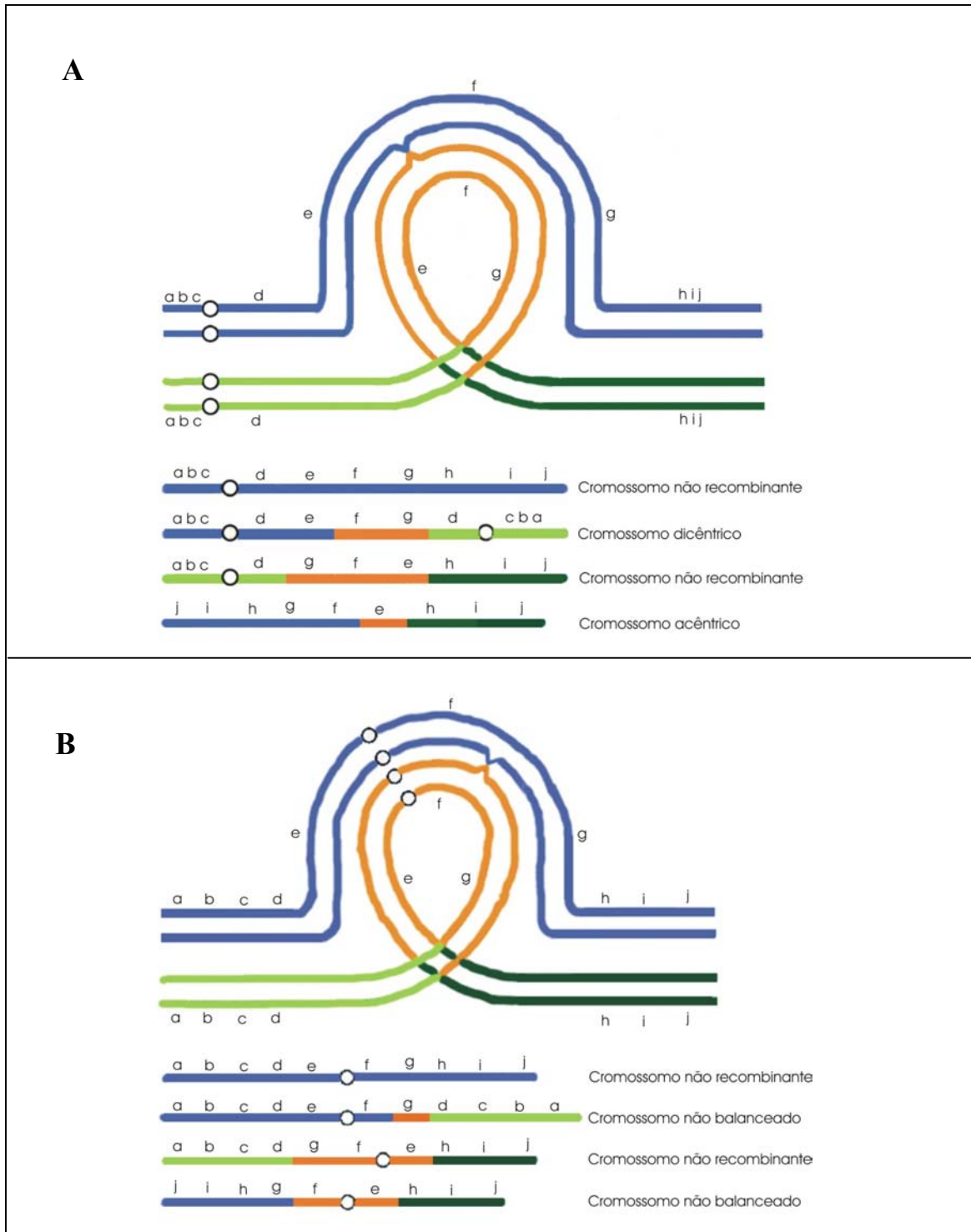


Figura 1. Representação esquemática das conseqüências genéticas esperadas após a ocorrência de um único evento de recombinação dentro de uma alça de inversão paracêntrica (A) e pericêntrica (B). As letras A a J, representam ordens gênicas.

decorrência do mesmo processo recombinacional, não pode se orientar no fuso e é, conseqüentemente, perdido e degradado no citoplasma. O fato desse mecanismo também ter sido identificado em *Sciara impatiens* (Carson 1946), que também explora polimorfismos cromossômicos para inversões paracêntricas, permite supor a sua generalidade em insetos que exploram esse tipo de polimorfismo.

Em machos de *Drosophila*, o mecanismo de proteção contra a formação de gametas não-balanceados, resultantes de um evento de permuta dentro da alça de inversão paracêntrica em heterozigotos, é explicado pela eliminação ou redução considerável da recombinação (Stevens 1908, Morgan 1912, 1914), embora ainda não se conheçam as causas deste fenômeno.

O refinamento desses mecanismos de proteção durante a formação dos gametas reflete tanto a antigüidade do sistema quanto a adaptabilidade do polimorfismo para inversões paracêntricas em *Drosophila*, e também explica porque muitas espécies deste gênero são naturalmente polimórficas para este tipo rearranjo.

A grande quantidade de polimorfismos de inversões paracêntricas no gênero *Drosophila* contrasta com a raridade das inversões pericêntricas. Talvez isso se deva ao fato de que um único evento de recombinação dentro da região invertida de um heterozigoto, gere também cromátides duplicadas e deficientes em seu conteúdo gênico (Figura 1B). Diferentemente do que ocorre com os heterozigotos para inversões paracêntricas, as cromátides recombinantes não-balanceadas formadas pelas inversões pericêntricas são monocêntricas e podem atingir núcleos funcionais, já que não ocorre a formação de uma ponte dicêntrica. Neste caso, se o núcleo portador de um cromossomo recombinado for fertilizado, o zigoto morre devido ao desequilíbrio do seu conteúdo gênico (Griffiths et al. 1998). Assim, a

fecundidade de fêmeas heterozigotas para inversões pericêntricas diminui pela metade e não está protegida pela eliminação preferencial dos gametas não-balanceados. Provavelmente, devido a este quadro, o polimorfismo para inversões pericêntricas é pouco explorado em *Drosophila*. Entretanto, as inversões pericêntricas descritas por Miller (1939) em *D. algonquin*, por Carson e Stalker (1949) em *D. robusta*, por Freire Maia (1960) para *D. ananassae* e por Rohde et al. (2005) para *D. willistoni* sugerem que mecanismos, ainda não conhecidos, possam estar envolvidos na desestabilização do pareamento entre os homólogos, o que evitaria a recombinação dentro da região invertida.

Graças à fidelidade com que as cromátides intimamente pareadas dos cromossomos politênicos refletem a natureza estrutural do cariótipo de seu portador, e ao fato de que uma grande quantidade de espécies de *Drosophila* é naturalmente polimórfica para inversões paracêntricas, a investigação desse tipo de rearranjo nos cromossomos politênicos é uma importante ferramenta para a determinação das relações filogenéticas dentro deste gênero (Sturtevant e Dobzhansky 1936a, b, Wasserman 1963). Assim, a comparação do padrão de bandas dos cromossomos politênicos entre espécies próximas fornece um registro da sua história evolutiva, possibilitando a determinação do número e dos tipos de rearranjos cromossômicos fixados durante a sua divergência, a partir de seu último ancestral comum (revisões em Ehrman e Powell 1982, Krimbas e Powell 1992).

É amplamente aceito que o cariótipo primitivo (ancestral) de *Drosophila* consiste de cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos pontuais, sendo esta configuração encontrada em muitas espécies não relacionadas de grupos e diferentes subgêneros (Patterson e Stone 1952, Stone 1955, Clayton e Wheeler 1975, Sperlich e Pfriem 1986). De acordo com esta visão, todos os outros cariótipos que ocorrem em *Drosophila* são

derivados deste complemento ancestral, que sofreu fusões Robertsonianas e/ou translocações ocasionais. Muller (1940) chamou os cromossomos acrocêntricos do cariótipo ancestral de *Drosophila* de “elementos cromossômicos” e nomeou-os pelas letras A, B, C, D, E, F.

A Tabela 1 apresenta a correspondência entre os elementos de Muller e os braços cromossômicos da espécie *D. willistoni* e da espécie modelo *D. melanogaster*.

Tabela 1. Correspondência entre os elementos cromossômicos de Muller e os braços cromossômicos das espécies.

Espécie	Elementos de Muller				
	A	B	C	D	E
<i>D. willistoni</i>	X	IIR	IIL	XR	III
		L			
<i>D. melanogaster</i>	X	2L	2R	3L	3R

A tendência evolutiva predominante tem sido a de uma redução no número cromossômico. Por consequência, as espécies com menor número de cromossomos são consideradas mais recentes sob o ponto de vista evolutivo, do que aquelas com um número maior de cromossomos (Sturtevant e Novitski 1941). Embora o número de elementos cromossômicos tenha se mantido no gênero *Drosophila*, devido à relativa raridade das inversões pericêntricas e das translocações, os genes que eles contém podem ser encontrados em ordens lineares bem diferentes entre as espécies, uma consequência do predomínio de inversões paracêntricas, que se fixaram ao longo da evolução (Dobzhansky 1970), dentro dos braços cromossômicos.

Sturtevant e Dobzhansky (1936a) foram pioneiros nos estudos dos cromossomos para inferir relações filogenéticas entre espécies proximamente relacionadas. Pelo método dos

autores é possível a construção de árvores filogenéticas, sem indicação temporal, para qualquer organismo com cromossomos politênicos e com um certo número de inversões no mesmo braço cromossômico. A análise das tríades de inversões sobrepostas, como é chamado o método, permite que arranjos perdidos ou hipotéticos sejam inferidos. A validade do método já foi comprovada no estudo comparativo entre as espécies *D. pseudoobscura* e *D. azteca* (Dobzhansky e Sturtevant 1938, Dobzhansky 1941), quando a análise posterior de indivíduos coletados na natureza, revelou a presença de inversões previamente sugeridas. A Figura 2 apresenta um esquema que ilustra o princípio do método, através de três cromossomos que se diferenciaram por meio de sucessivas inversões, as quais se sobrepueram umas às outras. Três possibilidades poderiam explicar o caminho evolutivo das seqüências gênicas: I→II→III, ou III→II→I ou I←II→III. Em função das quebras necessárias para sua formação, seria impossível que o arranjo I tivesse dado origem diretamente ao arranjo III, sendo necessária a ocorrência intermediária do arranjo II.

Uma das regras básicas da análise filogenética que utiliza a sobreposição de inversões paracêntricas, é a que prediz que o caminho evolutivo a ser escolhido deve ser aquele que pressupõe a ocorrência de um número menor de inversões, ou seja, a rota mais parcimoniosa (Ruiz e Wasserman 1993). Através desse método, diversos autores têm construído filogenias para diferentes grupos do gênero *Drosophila*, incluindo o da fauna havaiana (Carson e Kaneshiro 1976), e os grupos: *virilis* (Throckmorton 1982), *repleta* (Wasserman 1954, 1982, Wasserman e Wilson 1957, Diniz 1998), *saltans* (Bicudo 1973), *melanogaster* (Lemeunier e Ashburner 1976, 1984), *tripunctata* (Kastritsis 1966a), *guarani* (Salzano 1954, Kastritsis 1969a), *guaramunu* (Brncic 1953), *pachea* e espécies relacionadas (Ward e Heed 1970, Ward et al. 1975), *bipunctinata* (Jha e Rahman 1972, 1973), *nasuta* (Lambert 1978, Baldwin 1982),

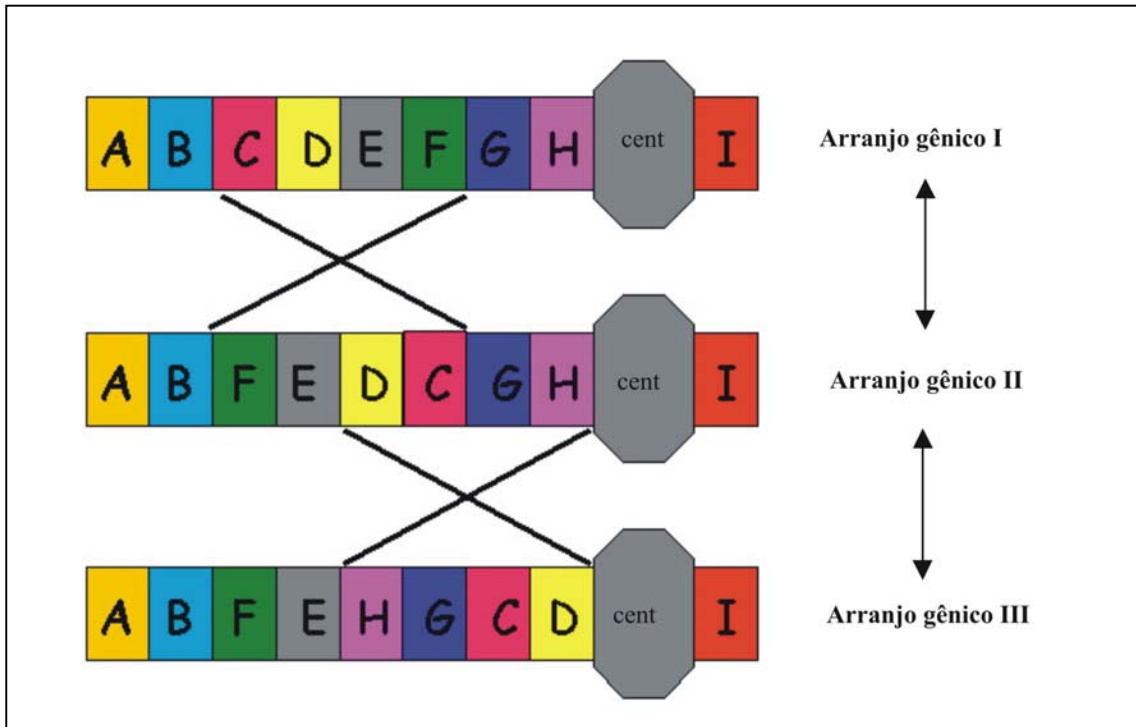


Figura 2. Esquema de três diferentes cromossomos (I, II e III) relacionados entre si pela ocorrência de inversões paracêntricas (representadas pelas linhas cruzadas, que indicam seus pontos de quebra). As letras A a I, representam ordens gênicas hipotéticas. cent = centrômero.

robusta (Narayanan 1973), *cardini* (Heed e Russell 1971). Considerando o grupo *obscura*, filogenias baseadas na sobreposição de inversões têm sido construídas para o *cluster pseudoobscura* (Dobzhansky 1970), para o *cluster bifasciata* (Yamaguchi 1973) e para o subgrupo *affinis* (Miller 1977). Finalmente, Krimbas e Loukas (1984) e Brehm e Krimbas (1990a) estudaram as espécies do grupo *subobscura* e Brehm e Krimbas (1990b, 1991) as espécies do grupo *obscura*.

Como já comentado, a proposta da singularidade da origem das inversões se constitui no princípio fundamental para a validade do método de construção de filogenias por meio da análise de inversões sobrepostas. De acordo com essa proposta, e sob o ponto de vista tradicional, as inversões são geradas por duas quebras independentes e simultâneas no

cromossomo, seguidas pela re-ligação das partes quebradas em orientação invertida (Krimbas e Powell 1992). As múltiplas inversões sobrepostas, encontradas em muitas espécies de *Drosophila*, e que servem de base para a construção de filogenias, teriam ocorrido seqüencialmente, e não pela ocorrência simultânea de múltiplas quebras. Quanto às inversões *in tandem* (inversões lado a lado), a coincidência dos pontos de quebra de mais de uma inversão, é atribuída ao acaso, devido a eventos que ocorreram em tempos diferentes. Desse modo, cada inversão teria uma origem única, e inversões idênticas seriam réplicas de um rearranjo único, surgido no passado, em um determinado indivíduo. Entre as razões que fundamentam a origem única das inversões salientam-se: a) o fato de que, em condições naturais, a geração de inversões é um evento raro; b) a probabilidade de que dois de tais eventos raros ocorram no mesmo braço cromossômico é ainda mais rara e existe a possibilidade de seleção e eliminação do indivíduo portador do rearranjo mesmo que estes dois eventos ocorram e, desse modo, não seria estabelecida na população a nova ordem gênica.

Wasserman (1963) propôs que cada inversão poderia não ter sido causada, obrigatoriamente, por um evento único, e que quebras e inversões nos mesmos pontos poderiam ter ocorrido mais de uma vez, em mais de uma população. Entretanto, o autor argumenta que a probabilidade da ocorrência e sobrevivência da mesma inversão em duas linhas evolutivas independentes é mínima, de tal forma que se pode assumir que cada inversão é única e que quaisquer duas espécies que a compartilhem, são mais intimamente relacionadas entre si, do que a uma terceira espécie na qual falta esta inversão.

Embora a visão clássica indique que as inversões em *Drosophila* são consequência de duas quebras resultantes de eventos independentes e não recorrentes, evidências vêm sendo

produzidas, nas últimas duas décadas, indicando que os elementos transponíveis (TEs) podem desempenhar um papel ativo na gênese dos polimorfismos para inversões paracêntricas em populações naturais. Evidências experimentais para a origem das inversões mediadas por TEs são encontradas em organismos como milho, bactéria e levedura (Berg e Howe 1989). Em populações de laboratório de *Drosophila*, muitos TEs têm sido relacionados à geração de inversões cromossômicas (Lim 1981, Colins e Rubin 1984, Biémont e Aouar 1987). Dois desses elementos, *P* e *hobo* têm sido implicados como causadores de inversões em populações naturais de *D. willistoni* e *D. melanogaster*, respectivamente, devido às suas posições coincidirem com pontos de quebra de inversões (Kusakabe et al. 1990, Lyttle e Haymer 1992, Regner et al. 1996). O elemento *hobo* tem sido encontrado nos pontos de quebra de três inversões endêmicas em populações naturais de *D. melanogaster* do Hawaii (Lyttle e Haymer 1992). Esse elemento também está envolvido em rearranjos cromossômicos de linhagens de laboratório da mesma espécie (Lim 1988, Sheen et al. 1993, Ho et al. 1993, Hatzopoulos et al. 1987, Eggleston et al. 1996). O trabalho de Cáceres et al. (1999), entretanto, foi o primeiro a comprovar o envolvimento de um elemento transponível com a geração de inversões segregantes em populações naturais de *D. buzzatii*, ao invés de só apresentar evidências circunstanciais. Os autores demonstraram que os dois pontos de quebra da inversão *2j* apresentam largas inserções, correspondentes a um novo elemento transponível denominado *Galileo*. Cáceres et al. (2001) através de uma análise molecular detalhada continuaram a estudar as regiões correspondentes aos pontos de quebra da inversão *2j* de *D. buzzatii*, demonstrando um grau jamais visto de reestruturação do genoma associado com elementos de transposição. Estas alterações foram verificadas somente nos cromossomos com a inversão *2j*. Os rearranjos encontrados nos cromossomos com esta configuração incluíram 22 inserções de

dez TEs, 13 deleções, uma duplicação e uma pequena inversão interna. Os autores sugeriram que todas estas alterações se acumularam depois da inserção do elemento *Galileo*, em um curto espaço de tempo evolutivo. Os resultados deste trabalho reforçam a idéia de que os TEs estão fortemente relacionados com a plasticidade do genoma, sendo de importância crucial durante o processo de evolução. Ficou demonstrado, definitivamente, não só o envolvimento de elementos transponíveis na geração de quebras cromossômicas, como o fato de que inserções de certos elementos facilitam novas inserções e alterações marcantes na estrutura cromossômica.

2. O subgrupo da *Drosophila willistoni*

2.1 Aspectos taxonômicos e históricos

Sob o ponto de vista taxonômico o subgrupo da *D. willistoni* está composto por seis espécies crípticas que estão incluídas na seguinte classificação (de acordo com revisão em Ehrman e Powell 1982):

Subgrupo: *willistoni*
Grupo: *willistoni*
Subgênero: *Sophophora*
Gênero: *Drosophila*
Família: Drosophilidae
Ordem: Diptera
Classe: Insecta
Phylum: Arthropoda

A primeira descrição de uma espécie do subgrupo *willistoni* ocorreu em 1896. Dentre uma série de espécies novas coletadas por Samuel Wendell Williston na Ilha de São Vicente, nas pequenas Antilhas, uma foi denominada de *Drosophila pallida*. Entretanto, como esse nome já pertencia a outro drosofilídeo, duas décadas depois, Sturtevant (1916), corrigiu o nome da nova espécie denominando-a de: *Drosophila willistoni*. Em 1943, Dobzhansky e Pavan examinaram indivíduos resultantes de cruzamentos provenientes de descendentes de isolinhagens (fêmeas fecundadas vindas da natureza) de moscas coletadas no Estado de São Paulo e concluíram que naquele local ocorriam duas espécies de drosofilídeos muito semelhantes, sendo que uma delas correspondia à descrição de *D. willistoni*. Impossibilitados de compararem seu material com espécimes vivos ou mesmo preservados, a separação das duas espécies foi feita com base na pequena diferença de tamanho corporal entre elas. Assim, os autores supuseram que a espécie mais freqüentemente encontrada e correspondente à de menor tamanho corporal deveria se tratar da *D. willistoni*. A espécie maior recebeu o nome *D. paulista*. Posteriormente, coletas de *D. willistoni* vindas da Guatemala e do México permitiram comparações e cruzamentos que esclareceram que *D. willistoni* era a espécie de maior tamanho. Desse modo, o nome *Drosophila paulista* passou a ser sinônimo de *D. willistoni*. A outra espécie, a de menor tamanho, somente foi descrita em 1949 e recebeu o nome de *Drosophila paulistorum* Dobzhansky e Pavan (Burla et al. 1949).

Dobzhansky e Mayr (1944), através de experimentos de isolamento sexual, com linhagens de *D. willistoni* oriundas de diferentes regiões geográficas, verificaram que as moscas de Tefé (Amazonas - Brasil) apresentavam isolamento praticamente total com as demais populações. Outros estudos, mais detalhados e de maior duração, confirmaram estes resultados e mostraram que as moscas de Tefé eram incapazes de produzir híbridos com as das

demais localidades. Foram analisadas também, pequenas diferenças morfológicas e fisiológicas entre elas. Estes achados levaram à descrição de uma terceira espécie críptica do subgrupo da *D. willistoni*, a *D. equinoxialis* Dobzhansky (Dobzhansky 1946).

A quarta espécie críptica do grupo *willistoni* foi descrita por Burla et al. (1949) Trata-se da *Drosophila tropicalis*, coletada originalmente em Palma, Goiás, Brasil. Em 1954, Townsend verificou que linhagens de *D. tropicalis* procedentes das Grandes Antilhas geravam descendentes machos híbridos estéreis quando eram cruzadas com linhagens vindas do Continente Sul Americano (Belém, Pará, Içana e Amazonas). Resultados referentes a diferenças na morfologia, citologia e isolamento sexual, além da esterilidade dos machos híbridos sugeriram que as Grandes Antilhas eram habitadas por uma subespécie diferente da que ocupa o continente. Essa subespécie recebeu o nome de *D. tropicalis cubana* Townsend (Townsend 1954). Resultados de cruzamentos envolvendo linhagens provenientes de Palma (Goiás), de Tefé (Amazonas), de Trinidad e de Cuba, realizados por Winge (1965), levaram a proposta de elevação de *Drosophila tropicalis cubana* para o nível de espécie, devido ao grau de isolamento reprodutivo e desaparecimento dos cromossomos híbridos (Winge 1965). Essa proposta, porém, não foi formalizada por uma descrição detalhada e, assim, a *D. tropicalis cubana* é considerada ainda uma subespécie de *D. tropicalis*.

Dobzhansky (1957), em um estudo sobre a variabilidade cromossômica de *D. willistoni* da América Central e das Antilhas, apresentou um mapa da área de distribuição geográfica das espécies crípticas do subgrupo da *D. willistoni* conhecidas. Nesse mesmo trabalho, também foi descrita uma nova espécie críptica do grupo, restrita a algumas das ilhas das Pequenas Antilhas. Esta nova espécie foi denominada de *D. insularis* (Dobzhansky 1957).

O trabalho de Dobzhansky e Spassky (1959) demonstrou que *D. paulistorum*, por sua vez, é na realidade uma superespécie, constituída de pelo menos seis raças ou semi-espécies. Durante o estudo desse complexo foi verificado que o que era considerado inicialmente “raça Guiana”, apresentava, além de diferenças citológicas, em comparação com as demais raças, também isolamento reprodutivo suficiente para ser elevada ao *status* de espécie. Conseqüentemente, a última espécie do grupo críptico *willistoni* descrita recebeu o nome de *D. pavlovskiana* Kastritsis e Dobzhansky (Kastritsis e Dobzhansky 1967).

Assim, o subgrupo *willistoni* é composto por seis espécies crípticas: *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana*. Essas espécies estão incluídas dentro do grupo *willistoni* de *Drosophila* que inclui um total de 23 espécies. Estão listadas abaixo, aquelas de maior interesse para estudos cromossômicos, em ordem cronológica em que foram descritas (revisão em Ehrman e Powell 1982).

- *Drosophila nebulosa* Sturtevant 1916.

- *Drosophila willistoni* Sturtevant 1921.

subespécie *willistoni* Ayala e Tracey 1973 (localizada a leste dos Andes e demais partes da distribuição geográfica);

subespécie *quechua* Ayala e Tracey 1973 (localizada a oeste dos Andes).

- *Drosophila fumipennis* Duda 1925.

- *Drosophila capricorni* Dobzhansky e Pavan 1943.

- *Drosophila succinea* Patterson e Mainland 1944.

- *Drosophila equinoxialis* Dobzhansky 1946.

subespécie *equinoxialis* Ayala et al. 1974a (encontrada a leste do Panamá e América do Sul continental).

subespécie *caribbensis* Ayala et al. 1974a (encontrada no norte da América Central e Grandes Antilhas).

- *Drosophila tropicalis* Burla et al. 1949
subespécie *tropicalis* Townsend 1954;
subespécie *cubana* Townsend 1954.
- *Drosophila paulistorum* Dobzhansky e Pavan (Burla et al. 1949).
semi-espécie Andino-Brasileira Dobzhansky e Spassky 1959;
semi-espécie Amazônica Dobzhansky e Spassky 1959;
semi-espécie Centro Americana Dobzhansky e Spassky 1959;
semi-espécie Orinocana Dobzhansky e Spassky 1959;
semi-espécie Transicional Dobzhansky e Spassky 1959;
semi-espécie Interior Pérez-Salas et al. 1970;
- *Drosophila insularis* Dobzhansky et al. 1957.
- *Drosophila pavlovskiana* Kastritsis e Dobzhansky 1967.

2.2 Importância do estudo das espécies crípticas

Mayr (1963) define espécies crípticas como “populações naturais morfologicamente idênticas ou muito semelhantes, mas reprodutivamente isoladas”. Essa é uma das restrições mais sérias ao conceito morfológico de espécie. Apesar de as espécies crípticas representarem

um grande problema para muitos taxonomistas, principalmente para os que apóiam a idéia de que as espécies devem ser identificadas em material preservado, a distinção dessas espécies nos estudos evolutivos e ecológicos é vital. Vale lembrar aqui a famosa frase de Dobzhansky (1970) que afirma que “as espécies são fenômenos da natureza que existem independentemente da nossa capacidade para distingui-las”. A importância do estudo das espécies crípticas tem levado aos seguintes questionamentos:

a) como explicar que durante o processo de especiação as espécies crípticas tenham divergido geneticamente, o que é ilustrado pelo isolamento reprodutivo entre elas (em muitos casos isolamento completo), mas não fenotipicamente?

b) as diferenças genéticas seriam limitadas a poucos genes, como aqueles envolvidos no isolamento reprodutivo?

c) a separação das espécies crípticas teria sido um evento recente a ponto de ainda não ter havido tempo de acumularem-se diferenças suficientes e detectáveis no fenótipo?

d) as espécies crípticas seriam iguais às outras espécies no que se refere ao grau das diferenças genéticas e ao tempo de existência, com a diferença de apresentarem um fenótipo capaz de conferir um valor adaptativo cujo prêmio seria a manutenção desse fenótipo?

e) sob o ponto de vista ecológico, se essas espécies são tão parecidas fenotipicamente, como seriam seus comportamentos em relação ao aproveitamento dos recursos naturais?

f) haveria sobreposição de nichos de alimentação e criação, ou competição?

E é dentro desse contexto que as espécies crípticas do subgrupo da *D. willistoni* são consideradas importantes e promissoras para estudos evolutivos. O fato desse subgrupo estar constituído de espécies, subespécies e semi-espécies, representa uma oportunidade singular para o estudo da evolução de espécies Neotropicais de *Drosophila* e, certamente, foram esses

motivos que instigaram o ilustre geneticista Theodosius Dobzhansky a estudar essas espécies, quando de sua estada no Brasil entre as décadas de 1940 e 1950. O interesse despertado por esse grupo de espécies confunde-se com o início da história da Genética Evolutiva no Brasil, na primeira metade do século XX. Diversos estudos com variantes genéticas e cromossômicas do subgrupo *willistoni* deram suporte para que Dobzhansky desse sua contribuição à Teoria Sintética da Evolução.

Também no Departamento de Genética da UFRGS, o estudo do subgrupo da *D. willistoni* despertou interesse desde a sua fundação em 1949 pelo Dr. Antônio Rodrigues Cordeiro, ele próprio aluno e colaborador do professor Dobzhansky (Cordeiro e Dobzhansky 1954). Cordeiro e seus seguidores têm contribuído até hoje com importantes estudos com as espécies do subgrupo da *D. willistoni*, buscando conhecê-las sob o ponto de vista ecológico, molecular, comportamental, citogenético e evolutivo.

2.3 Distribuição geográfica

A distribuição geográfica das espécies que compõem o subgrupo da *D. willistoni* é essencialmente Neotropical e foi revisada nos trabalhos de Winge (1971), Spassky et al. (1971), Dobzhansky e Powell (1975), Ehrman e Powell (1982) e Santos e Valente (1990). Os resultados desses estudos foram reunidos e estão ilustrados no mapa da Figura 3. A espécie *D. willistoni* é a de maior distribuição geográfica do grupo e pode ser encontrada desde o sul da Flórida/EUA e centro norte do México, até o norte da Argentina, em uma grande área compreendida aproximadamente entre os paralelos 28°N e 37°S. Essa espécie também foi encontrada nas Bahamas, em toda a América Central, inclusive Grandes e Pequenas Antilhas e

na América do Sul, especialmente a leste da cordilheira dos Andes, sendo talvez a espécie mais comum em toda a região equatorial, na Bolívia, no sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina.

Drosophila paulistorum tem, assim como as demais espécies crípticas, sua área de distribuição geográfica incluída na de *D. willistoni*. É a segunda espécie com maior amplitude de área geográfica ocupada, estendendo-se desde o norte da Guatemala, na localidade de Tikal, ao sul do paralelo 18°N, até Porto Alegre no Estado do Rio Grande do Sul/Brasil, ao sul do paralelo 30°S. Entre esses dois limites, foi coletada na América Central (istmo) e América do Sul, principalmente a leste dos Andes, sendo muito comum em toda a região equatorial, e também no Peru e na Bolívia. A oeste da cordilheira foi encontrada apenas na Colômbia e no Equador. Essa espécie não habita as Antilhas, mas é encontrada na ilha de Trinidad.

A área ocupada por *D. equinoxialis* estende-se desde as Grandes Antilhas e sul do México, até quase o centro do Brasil. No México essa espécie foi encontrada em Cuernavaca, Estado de Morelos, pouco abaixo do paralelo 19°N. Nas grandes Antilhas foi encontrada em Cuba, Jamaica, Grand Cayman, Haiti e Porto Rico. Não foi coletada nas Pequenas Antilhas. Além de bem distribuída em toda a América Central, essa espécie é também encontrada na América do Sul na porção oeste dos Andes, na Colômbia e Equador; tendo sido registrada em altas freqüências a leste da Cordilheira, como na Venezuela, Guiana, ilhas de Trinidad, Peru e Brasil, mais precisamente nos Estados do Amazonas, Acre, Roraima, Tocantins, Rondônia, Pará, Maranhão e Norte de Goiás. O ponto mais ao sul de distribuição da espécie parece ser um pouco abaixo do paralelo 12°S, no Estado de Tocantins.

O extremo norte de distribuição de *D. tropicalis* encontra-se em Tikal, Guatemala, ao sul do paralelo 18°N. Nas Grandes Antilhas foi coletada em Cuba, Jamaica, Grand Cayman,



Figura 3. Mapa das Américas onde estão representadas (linhas e símbolos coloridos) as áreas de distribuição geográfica de cada uma das seis espécies do subgrupo da *D. willistoni*, de acordo com os estudos de Spassky et al. (1971), Winge (1971), Dobzhansky e Powell (1975), El...

Haiti, República Dominicana e Porto Rico. As Pequenas Antilhas não abrigam essa espécie. A área ocupada também inclui a América Central, centro da América do Sul, e localidades à oeste dos Andes como a Colômbia e o Equador. A leste dos Andes foi coletada no Peru, Bolívia e Brasil. A localidade de Santa Cruz de La Sierra (Bolívia) representa o limite sul de distribuição da espécie, correspondente ao paralelo 18°S. Entretanto, existem registros da espécie na região amazônica e em muitas localidades do nordeste brasileiro.

Duas das espécies que compõem o subgrupo da *D. willistoni* são consideradas endêmicas: a *D. insularis* e a *D. pavlovskiana*. A espécie *D. insularis* é bastante restrita geograficamente, tendo sido encontrada apenas em quatro das Pequenas Antilhas, onde é simpátrica com *D. willistoni*: St. Kitts, Montserrat, Guadalupe e Santa Lucia. A área total de distribuição da espécie está incluída entre os paralelos 13° e 18°N e entre os meridianos 60° e 63°O. Finalmente, *D. pavlovskiana* é a que apresenta a menor distribuição geográfica de todas as crípticas. Até hoje foi encontrada apenas na Guiana e em apenas duas localidades compreendidas entre os paralelos 7° e 4°N.

A partir dos dados apresentados, é possível confirmar que o subgrupo da *D. willistoni* apresenta uma extensa área de distribuição geográfica na região Neotropical. Quatro dessas espécies (*D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*) são amplamente distribuídas e apresentam muitas áreas de simpatria, enquanto duas delas (*D. insularis* e *D. pavlovskiana*) são endêmicas. A extrema similaridade morfológica dessas espécies e o fato de serem abundantes na natureza e muitas vezes simpátricas dificultam enormemente o trabalho de identificação dos espécimes. Alguns métodos utilizados para a identificação das espécies crípticas do subgrupo da *D. willistoni* são comentados no próximo item.

2.4 Identificação das espécies

Apesar da existência de um número considerável de trabalhos sobre ecologia de *Drosophila*, poucos são os estudos em que as espécies do subgrupo da *D. willistoni* são identificados. Esse fato, como já salientado, é facilmente explicado pela extrema semelhança morfológica e pela extensa área de simpatria (Figura 3). Vários métodos têm sido propostos para a separação das espécies do subgrupo da *D. willistoni*. Burla et al. (1949) encontraram várias diferenças morfológicas mínimas entre as espécies desse subgrupo, envolvendo a estrutura do palpo maxilar, a posição orbital das cerdas, a coloração do ocelo, a forma da placa vaginal, do hipândrio e a forma da espermateca das fêmeas. Apesar dessa cuidadosa investigação os autores concluíram que “a variabilidade entre essas características é grande o suficiente de modo que a identificação individual das espécies torna-se perigosa”. Malogolowkin (1952), após um estudo detalhado da genitália dos machos do subgrupo da *D. willistoni*, demonstrou que muitas características adicionais poderiam auxiliar no trabalho de identificação. Spassky (1957) descreveu diferenças pequenas, mas consistentes, entre a genitália externa dos machos, capazes de permitir uma identificação direta em nível individual dessas espécies. No caso das fêmeas, embora elas não possam ser distinguidas diretamente, sua identificação pode ser obtida através da inspeção dos machos de sua progênie. Assim, esse método de identificação das espécies do subgrupo da *D. willistoni* é eficaz, mas apresenta a desvantagem de ser limitado a um dos sexos.

A discriminação sem ambigüidade das espécies do subgrupo da *D. willistoni* é também possível através da análise dos arranjos gênicos apresentados pelos cromossomos politênicos da glândula salivar (Burla et al. 1949, Dobzhansky et al. 1950). Entretanto esse método é

muito laborioso para ser utilizado rotineiramente para identificação das espécies e depende da existência de fêmeas férteis. Vários autores também alertam para outra dificuldade, ou seja, a obtenção de bons preparados citológicos de algumas dessas espécies, principalmente no caso da *D. paulistorum* e da *D. equinoxialis* (Dobzhansky 1946, Burla et al. 1949, Kastritsis 1967). Outro problema em aplicar esse método é a ausência de fotomapas cromossômicos para todas as espécies do subgrupo da *D. willistoni*. Alguns trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa no Laboratório de *Drosophila* da UFRGS, vêm suprindo essas dificuldades. Esse é o caso dos trabalhos de Rohde (2000), que elaborou um novo fotomapa para *D. willistoni*, e de Garcia (2002), que elaborou um fotomapa comparativo entre a *D. willistoni* e a *D. paulistorum*.

Testes de intercruzamento, envolvendo as espécies do subgrupo da *D. willistoni*, é outra ferramenta que pode ser utilizada na identificação dessas espécies (Cordeiro e Winge 1995). Entretanto, o método está limitado à obtenção de fêmeas férteis. Do mesmo modo, o padrão do som produzido pelas asas dos machos durante a corte sexual, também pode ser utilizado no reconhecimento das espécies crípticas (Ritchie e Gleason 1995). Entretanto, o tempo despendido na aplicação dessas metodologias, dificulta o seu uso na identificação de espécies em trabalhos de coleta na região Neotropical quando, em geral, um grande número de espécimes pertence ao subgrupo *willistoni*.

Muitos esforços também têm sido feitos na tentativa de encontrar um marcador genético, em especial uma enzima, cujo padrão de mobilidade eletroforética pudesse ser diagnóstico para as espécies do subgrupo da *D. willistoni*. Ayala e seus colaboradores estudaram por muitos anos o padrão de variação geográfica de um grande número de populações em gel de eletroforese nesse subgrupo de moscas (Ayala et al. 1970, Ayala et al.

1971, Ayala et al. 1972a, b, Ayala e Powell 1972a, b, Ayala e Tracey 1973, Ayala e Tracey 1974, Ayala et al. 1974a, b, c, Ayala 1975). Entretanto, entre 36 loci investigados, nenhum foi conclusivo para a identificação das espécies. Valiati (1999), entretanto, observou que a enzima Fosfatase ácida-1 (*AcpH-1*) apresentava alelos diagnósticos para as espécies *D. willistoni* e *D. paulistorum* coletadas na cidade de Porto Alegre, sul do Brasil.

3. A superespécie *Drosophila paulistorum*

3.1 Aspectos gerais

Sob o ponto de vista genético e evolutivo, *D. paulistorum* (Figura 4) é talvez a espécie mais complexa e ao mesmo tempo uma das mais interessantes do gênero *Drosophila*. Entre os anos de 1956 e 1958, resultados de cruzamentos entre linhagens de moscas provenientes desde a Guatemala



Figura 4. Fêmea de *D. paulistorum*

até o sul do Brasil levaram Dobzhansky e Spassky (1959) a concluir que esta não é uma espécie unificada, mas um complexo de raças geográficas ou de espécies *in statu nascendi* que juntas formam a superespécie *D. paulistorum*. O conceito de superespécie é apresentado por Mayr (1963, 1969) e Amadon (1967) como “um grupo monofilético de espécies intimamente relacionadas e em grande parte ou inteiramente alopátricas” ou como “um grupo de táxons inteira ou essencialmente alopátricos que foram outrora raças de uma única espécie, mas que

agora atingiram o *status* de espécies”. De acordo com Amadon (1967), as formas que compõem uma superespécie devem ser denominadas “semi-espécies” quando parecem ser subespécies, mas se aproximam ou talvez já tenham atingido o estado de espécie. Mayr (1963), também define semi-espécies como “populações que completaram parcialmente o processo de especiação. As trocas gênicas ainda são possíveis entre as semi-espécies, mas não tão livremente quanto entre populações co-específicas”. Atualmente, seis semi-espécies formam a superespécie *D. paulistorum*: Andino-Brasileira, Amazônica, Centro-Americana, Orinocana, Transicional (Dobzhansky e Spassky 1959) e Interior (Pérez-Salas et al. 1970).

A distribuição geográfica das semi-espécies de *D. paulistorum* é apresentada na Figura 5, baseada nos mapas apresentados por Dobzhansky e Pavlovsky (1967), Dobzhansky et al. (1969), Pasteur (1970) e Santos e Valente (1990). Cada unidade da superespécie possui uma área geográfica própria, havendo, no entanto, ampla superposição de áreas na América do Sul, especificamente nas proximidades da linha do Equador. A semi-espécie Centro-Americana ocupa uma área que se estende desde a Guatemala até o Panamá. A Amazônica é encontrada no Panamá, na Colômbia, na Guiana e na região norte do Brasil ao longo do Rio Amazonas. A Orinocana foi coletada no Panamá, na Colômbia, na Venezuela e nas Guianas. A Andino-Brasileira, cuja distribuição é a mais ampla entre as semi-espécies, foi encontrada desde a Colômbia, Trinidad e Guianas, até a cidade de Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brasil. A semi-espécie Interior foi citada habitando as matas superúmidas do sul da Colômbia, na região que inclui a fronteira com o Brasil. A Transicional é encontrada em uma área em forma de lua crescente que se estende ao longo do litoral Pacífico da Colômbia até o Maciço de Santa Marta e daí até a cordilheira litorânea da Venezuela.

Conforme visto no mapa da Figura 5, cada semi-espécie ocupa a sua própria área

geográfica, mas em algumas localidades ocorre a simpatria de duas ou mais semi-espécies. Sobre a atual distribuição das semi-espécies de *D. paulistorum* vale comentar os trabalhos de Haffer (1967,1969) e Vuilleumier (1965) que forneceram uma explicação histórica para os padrões de distribuição geográfica de alguns grupos de pássaros intimamente relacionados na América tropical. Alguns desses padrões, como o apresentado pelo grupo da espécie *Crax rubra*, parece ser similar ao que teria ocorrido com *D. paulistorum*. Os registros dos autores demonstram que durante os vários períodos climáticos de seca ocorridos no Pleistoceno e pós-Pleistoceno, a floresta Amazônica foi dividida em pequenas florestas que foram separadas uma das outras por áreas de vegetação aberta ou com ausência de vegetação. Essas áreas alternadas de vegetação abundante formaram refúgios para organismos dependentes das áreas de ambientes úmidos da floresta tropical. O resultado foi uma rápida diferenciação da fauna da floresta Amazônica em um tempo geológico muito recente. Dentro deste contexto, *D. paulistorum* seria um organismo cuja ramificação em semi-espécies pode estar relacionada com as áreas de refúgio propostas.

Cruzamentos entre as semi-espécies ocorrem com dificuldade devido ao isolamento etológico que existe. Mesmo quando as fêmeas não têm escolha, se confinadas com machos de uma semi-espécie diferente, elas permanecem virgens na sua maior parte até que morram, apesar de os machos continuarem a cortejá-las diligentemente. Todavia, as poucas fêmeas que são inseminadas produzem descendência híbrida constituída de fêmeas férteis e machos estéreis (revisão em Dobzhansky 1970). Assim, as semi-espécies são isoladas por esterilidade do macho híbrido e por isolamento sexual que é acentuado em áreas de simpatria.

Ehrman (1965) calculou os coeficientes de isolamento etológicos para linhagens simpátricas de diferentes semi-espécies, e comparou os resultados obtidos com os de



Figura 5. Mapa das Américas onde está representada (linha tracejada azul) a distribuição geográfica da superespécie *D. paulistorum*. Cada um dos símbolos coloridos representa locais onde foram encontradas cada uma das seis diferentes semi-espécies de *D. paulistorum*, de acordo com os estudos de Spassky et al. (1971), Winge (1971), Dobzhansky e Powell (1975),
27

cruzamentos entre linhagens das mesmas semi-espécies, mas alopátricas quanto à origem. Um coeficiente com valor zero (0) indicou a ausência de isolamento e o valor um (1) indicou isolamento completo. O valor médio do coeficiente de isolamento para linhagens simpátricas foi 0,85 contrastando com o obtido entre linhagens alopátricas das mesmas semi-espécies que foi de 0,67. Deste modo, pares de semi-espécies que ocorrem em simpatria exibem maior isolamento sexual que o apresentado por esses mesmos pares quando ocorrem em alopatria, ou seja, semi-espécies que coexistem geograficamente tendem a ser mais isoladas reprodutivamente que aquelas que vivem em alopatria.

Diferentes experimentos em mais de 30 anos têm sido conduzidos pela Dra. Lee Ehrman para desvendar a problemática da esterilidade do macho híbrido em cruzamentos envolvendo as semi-espécies de *D. paulistorum*. Esses estudos têm documentado o papel de uma bactéria simbiote como agente causal dessa esterilidade (revisão em Ehrman et al. 1987). Cada uma das semi-espécies é infectada com uma linhagem de bactéria deficiente de parede celular forma L, provavelmente *Streptococcus faecalis*. Em seus hospedeiros nativos a bactéria é benigna e transmitida citoplasmaticamente através do ovo. Entretanto quando a bactéria se desenvolve no testículo de híbridos entre as semi-espécies, ela cresce fora de controle e acaba destruindo o tecido. A evidência para o envolvimento direto da bactéria veio de um grande número de pesquisas. Primeiro foi verificado que o tratamento com antibióticos poderia diminuir a presença de machos F1 estéreis (Kernaghan e Erhman 1970). Foi provado que a bactéria *S. faecalis* era necessária para a sobrevivência das moscas, uma vez que linhagens livres de bactéria morriam e tratamentos prolongados com antibióticos levavam à extinção da linhagem. Já Williamson et al. (1971) tomaram o homogenado de uma semi-espécie e o injetaram dentro de fêmeas de uma segunda semi-espécie. O resultado foi a

indução de esterilidade nos filhos resultantes do cruzamento com machos da própria semi-espécie. Finalmente, quando culturas isoladas de uma semi-espécie estranha são injetadas nas fêmeas, a esterilidade do macho híbrido é induzida (Ehrman et al 1987).

De acordo com Dobzhansky et al. (1969), a semi-espécie Transicional seria a remanescente da população ancestral que originou o complexo da *D. paulistorum*. Isso se deve ao fato de que algumas linhagens desta semi-espécie são capazes de produzir machos híbridos férteis com as semi-espécies Centro-Americana e Andino-Brasileira. Segundo os autores, a semi-espécie Transicional é mais proximamente relacionada com a Centro-Americana e, em alguns casos, o cruzamento dessas duas semi-espécies produz machos híbridos férteis.

Embora os testes de cruzamentos tenham classificado a *D. paulistorum* como um conjunto de seis semi-espécies (Dobzhansky e Spassky 1959, Pérez-Salas et al. 1970) alguns evolucionistas têm argumentado que a complexidade das espécies incipientes poderia ser mais facilmente tratável se cada uma das semi-espécies fosse considerada como uma espécie críptica independente. Um dos argumentos contra essa idéia têm sido o fato de que haveria um “potencial canalizador de fluxo gênico” entre as semi-espécies através da Transicional. Entretanto, os dados cromossômicos (Kastritsis 1967) têm mostrado que a maioria das linhagens consideradas anteriormente como Transicional devem, atualmente, ser consideradas como Andino-Brasileira. Isto está de acordo com os dados genéticos publicados por Malogolowkin (1963) que sugerem que a semi-espécie Transicional seria um apêndice da Andino-Brasileira. Após um trabalho de reavaliação feito por Dobzhansky et al. (1969), a única linhagem que continuou fazendo parte da semi-espécie Transicional foi àquela procedente de Santa Marta, Colômbia (referida como linhagem Santa Marta 1). No entanto, os dados citológicos de Kastritsis (1967) classificam “Santa Marta 1” como Centro-Americana. O

“novo complexo Transicional”, como definido por Dobzhansky et al. (1969) pode ser entendido como sendo “uma população complexa, muito heterogênea para ser classificada como uma semi-espécie unificada”. Os dados citológicos e outras informações genéticas da época não permitiram conclusões definitivas a respeito do status taxonômico da “nova Transicional”. Kastritsis (1967) e Dobzhansky e Powell (1975) alertam sobre a necessidade de um estudo mais completo a fim de obter conclusões mais definitivas.

3.2 Aspectos cromossômicos

O cariótipo da *D. paulistorum*, assim como o das outras espécies do subgrupo da *D. willistoni*, é constituído por dois pares de cromossomos metacêntricos (o par sexual e o segundo cromossomo) e um par acrocêntrico (terceiro cromossomo) (Metz 1916, Sturtevant e Novitski 1941, Dobzhansky 1950, Patterson e Stone 1952). A nomenclatura dos cromossomos politênicos correspondentes foi definida pelo mapa de Dobzhansky (1950) como XL e XR (braço esquerdo e direito do cromossomo X), IIL e IIR (braço esquerdo e direito do segundo cromossomo) e III (o cromossomo acrocêntrico).

O primeiro estudo citológico com os cromossomos politênicos de *D. paulistorum* foi realizado por Burla et al. (1949). Os autores, que na época desconheciam que *D. paulistorum* era na verdade uma superespécie, realizaram um estudo comparativo entre as espécies do subgrupo da *D. willistoni* conhecidas até então: *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*. Algumas diferenças nos cromossomos politênicos dessas espécies foram verificadas e apontadas como capazes de diferenciá-las. Dobzhansky e Pavlovsky (1962)

também realizaram estudos citológicos, comparando o polimorfismo cromossômico existente entre as semi-espécies de *D. paulistorum*. Entretanto, somente após a confecção do mapa citológico de Kastritsis (1966b), que serviria como padrão para *D. paulistorum*, é que estudos mais detalhados e precisos puderam ser feitos. Para a confecção do mapa citológico foi escolhida uma linhagem proveniente de Palmira, Colômbia, inicialmente considerada como pertencente à raça Transicional, porém mais tarde reclassificada como Andino-Brasileira (Dobzhansky et al. 1969). O conjunto dos cromossomos politênicos do mapa foi arbitrariamente dividido em 100 seções, distribuídas de 1 a 21 no cromossomo XL, de 22 a 40 no XR, de 41 a 60 no IIL, de 61 a 80 no IIR e de 81 a 100 no III cromossomo. O mapa de Kastritsis (1966b) é ilustrado na Figura 6.

3.2.1 Polimorfismo cromossômico dentro das semi-espécies

Kastritsis (1967) observou que o polimorfismo cromossômico dentro das diferentes semi-espécies é bastante elevado, com a presença de 15 a 22 inversões cromossômicas paracêntricas. Para todas as semi-espécies o cromossomo III foi o mais polimórfico. O autor também observou a existência de um compartilhamento bastante elevado do polimorfismo cromossômico entre as diferentes semi-espécies e descreveu três hipóteses para explicar esta situação. A primeira delas supõe a existência de fluxo gênico entre as semi-espécies através da raça Transicional, uma vez que essa semi-espécie é capaz de produzir híbridos férteis com mais de uma semi-espécie. Essa hipótese é considerada pouco provável pelas evidências acumuladas por cruzamentos entre híbridos, que indicam que as linhagens simpátricas de

diferentes semi-espécies apresentam sempre um isolamento reprodutivo maior do que aquele demonstrado por linhagens alopátricas das mesmas semi-espécies. Esses fatos sugerem, fortemente, que o polimorfismo compartilhado não é de origem secundária, ou seja, formado por uma hibridação entre semi-espécies. Winge (1971), fazendo um re-exame dos dados até então existentes, sugeriu que a justificativa anterior não pode ser considerada forte o suficiente para que a hipótese de fluxo gênico através da Transicional seja rejeitada. A segunda idéia para explicar o compartilhamento de polimorfismos cromossômicos entre as semi-espécies é a de que elas teriam se originado de populações relativamente grandes que teriam passado por um processo de retração. Este processo teria levado ao surgimento de "bolsões" ou refúgios isolados, como já comentado, formados a partir da espécie original. Com o tempo, este isolamento teria propiciado um acúmulo de diferenças genéticas, desencadeando a esterilidade do híbrido quando estas populações novamente se expandiram e voltaram a ser simpátricas. Essas populações não teriam passado por um estágio de acentuada homozigose, mas teriam conservado muito da heterozigose da população original. Não há evidências que contrariem ou favoreçam esta explicação. A terceira hipótese, sugerida por Kastritsis (1967), está baseada na idéia de que algumas das inversões heteróticas da população ancestral teriam sido mantidas nas populações marginais, mesmo durante o processo de especiação e, atualmente, estariam passando por um processo de mudança gradual, sendo substituídas por novas combinações mais bem sucedidas surgidas com o avançar do processo de especiação. Os dados citológicos corroboram esta última proposta, pois a análise da *D. pavlovskiana* mostra muito menos inversões em comum com as remanescentes semi-espécies de *D. paulistorum*.

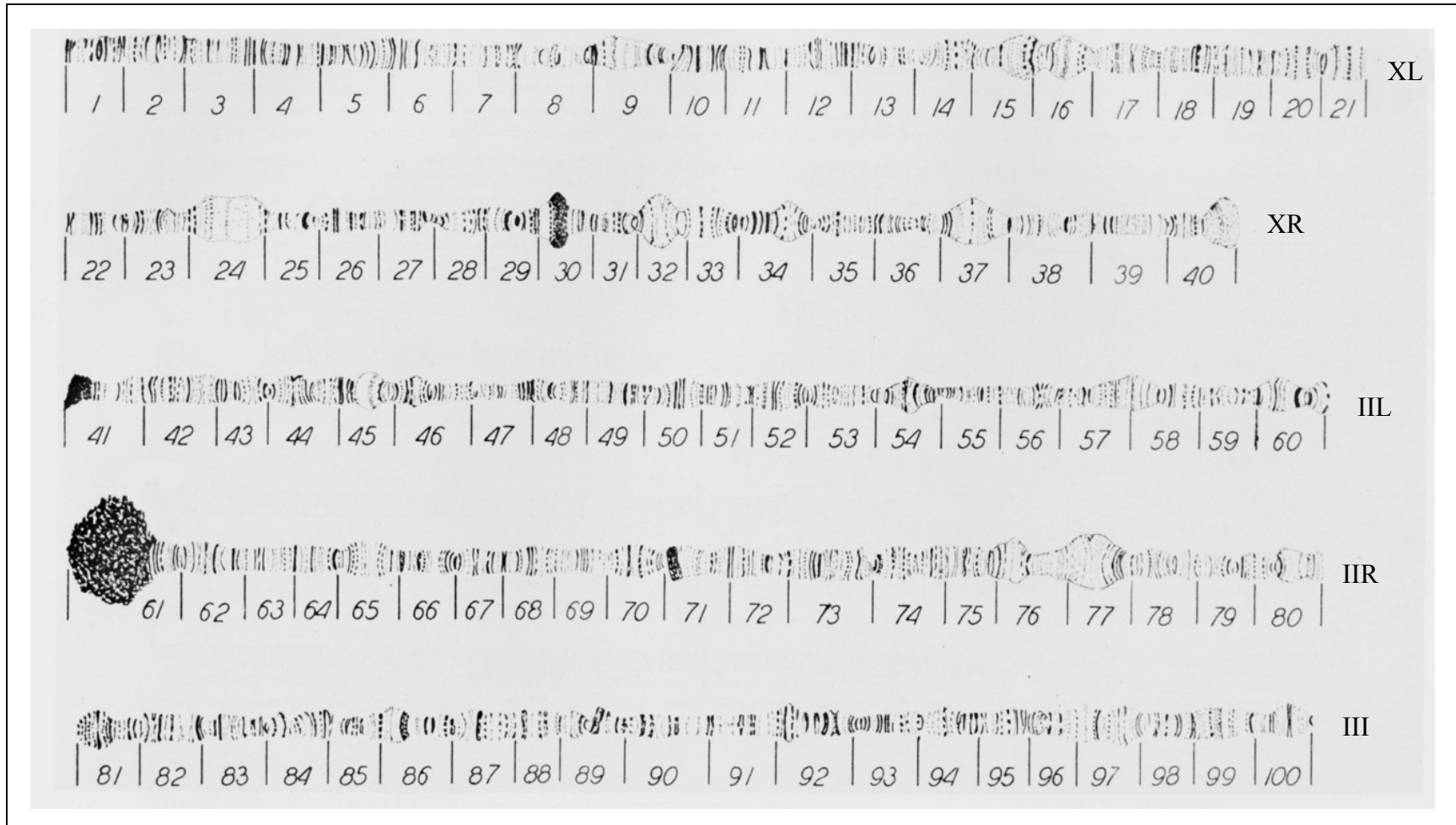


Figura 6. Mapa de referência dos cromossomos politênicos de *Drosophila paulistorum*, segundo Kastritsis (1966b).

Estudos mais recentes, tratando do polimorfismo cromossômico da semi-espécie Andino-Brasileira, de *D. paulistorum* têm sido feitos no Laboratório de *Drosophila* da UFRGS. Santos e Valente (1990), trabalharam com populações urbanas da área de Porto Alegre e verificaram a ocorrência de 18 inversões cromossômicas segregantes. Dessas inversões, quatro ocorreram no braço XL, duas no XR, cinco no IIL, duas no IIR e cinco no III. Valiati e Valente (1997), anos mais tarde, estudando populações de *D. paulistorum* do mesmo local, encontraram 23 inversões diferentes. O braço cromossômico mais polimórfico foi o XR, com seis arranjos, seguido pelo IIL com cinco e pelos braços XL, IIR e III cada um com quatro inversões. Das 23 inversões descritas, 14 não corresponderam a nenhuma daquelas previamente descritas por Kastritsis (1966b, 1967 e 1969b). Das inversões encontradas por Valiati e Valente (1997), apenas seis foram reconhecidas como similares às já descritas por Santos e Valente (1990). No entanto, os autores expressam a dificuldade de comparar as inversões observadas por eles com aquelas registradas por outros autores, em trabalhos prévios. Isto demonstra a falta de sistematização do estudo das inversões cromossômicas de *D. paulistorum*, que dificulta a conclusão sobre o número exato de inversões presente na espécie.

Da mesma forma, faz-se necessária a caracterização dos arranjos cromossômicos presentes nas diferentes semi-espécies de *D. paulistorum*. Este panorama representa um convite para que novos estudos sejam feitos com *D. paulistorum* no sentido de uniformizar a descrição do polimorfismo e facilitar a comparação de seu complemento cromossômico com os das outras espécies do subgrupo da *D. willistoni*.

3.2.2 Polimorfismo cromossômico entre as semi-espécies

A partir da análise do polimorfismo cromossômico de larvas híbridas, resultantes do cruzamento entre a linhagem padrão, procedente de Palmira/Colômbia, e linhagens das diferentes semi-espécies (Kastritsis 1966b, 1969b) e, a partir do polimorfismo observado dentro de diferentes populações das semi-espécies (Kastritsis 1967) foram contabilizados 85 arranjos cromossômicos em *D. paulistorum*. Com base nesses resultados, Kastritsis (1969b) classificou *D. paulistorum* como a espécie mais polimórfica do gênero *Drosophila*. Os resultados obtidos no estudo do polimorfismo cromossômico levaram Kastritsis (1969b) a propor também que a evolução cromossômica de *D. paulistorum* foi até aqui conduzida pelo cromossomo X e II, nos quais são encontrados arranjos fixados, enquanto que o cromossomo III, que hoje apresenta polimorfismo muito elevado, deveria estar passando por diversificação semi-específica. Das 85 inversões descritas, 55 ocorrem no III cromossomo. Como a maioria das 55 inversões é rara, é possível que tenham origem muito recente. Conforme sugerido por Kastritsis (1969b), algumas das inversões fixadas nos outros cromossomos tornaram-se características de certas semi-espécies. Contudo, não é possível utilizar, com absoluta certeza, os arranjos cromossômicos para identificação taxonômica das semi-espécies porque algumas linhagens que apresentam características cromossômicas de uma semi-espécie deveriam ser classificadas como outra, face aos resultados dos testes de cruzamento. Esse quadro indica a necessidade de novas e detalhadas investigações do complemento cromossômico de todas as semi-espécies de *D. paulistorum*, que desde 1969 não foram mais investigadas dentro desse contexto.

A carência de uma identificação citológica precisa das semi-espécies de *D. paulistorum* é somada à dificuldade de identificação a partir dos traços morfológicos. Pasteur (1970) realizou um estudo biométrico comparativo entre as semi-espécies. O autor verificou que existem diferenças no tamanho da asa e da tibia, no comprimento do raio obtido da asa até a tibia, dimorfismo sexual no tamanho da asa, número de dentes do fórceps dos machos e tempo de desenvolvimento. No entanto, nenhuma dessas diferenças pode ser considerada diagnóstica. Atualmente, a única maneira de diagnosticar as semi-espécies de *D. paulistorum* é através da realização de cruzamentos envolvendo todas as semi-espécies com linhagens já identificadas, com análise posterior da fertilidade da prole (Dobzhansky e Spassky 1959).

3.3 Relações evolutivas entre as semi-espécies de *D. paulistorum*

O primeiro estudo das relações evolutivas das espécies do subgrupo da *D. willistoni*, incluindo as semi-espécies de *D. paulistorum*, foi realizado por Spassky et al. 1971 (Figura 7A). Os autores apresentaram um diagrama das relações entre as espécies baseado em dados de biogeografia, capacidade de produção de híbridos, homologia de inversões cromossômicas e evidências bioquímicas.

Mais recentemente, Gleason et al. (1998) analisaram nessas espécies, dois genes nucleares, *period (per)* (Figura 7B) e *Álcool desidrogenase (Adh)*, e um gene mitocondrial, a Citocromo oxidase I (COI). A análise combinada desses três genes sugere que *D. paulistorum* e *D. equinoxialis* são as espécies mais relacionadas (Figura 7B), o que já havia sido indicado pelos trabalhos de Winge (1971) a partir de testes de isolamento sexual, de medidas de pareamento

cromossômico e comparações morfológicas. Outro ponto em comum desses estudos é que *D. insularis* é, provavelmente, a espécie mais distante das demais, sendo muito possível que tenha se separado do tronco ancestral antes das outras espécies se formarem. Por fim, o trabalho de Gleason et al. (1998) apresenta conflitos entre o conceito biológico e filogenético de espécie, uma vez que os dados moleculares obtidos colocam *D. pavlovskiana* como um único táxon junto com *D. paulistorum*.

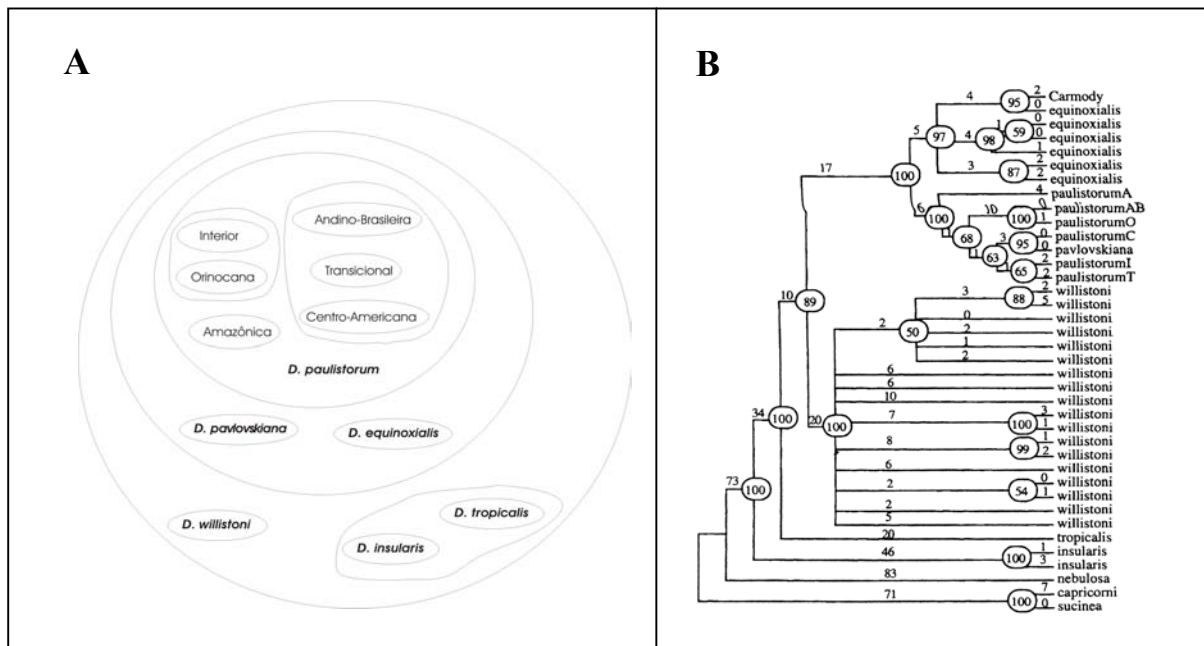


Figura 7. Filogenias previamente publicadas utilizando espécies do subgrupo da *D. willistoni* (A) Relações derivadas de um amplo agrupamento hierárquico baseado em dados biogeográficos, capacidade de produção de híbridos, cromossomos e evidências bioquímicas (redesenhada de Spassky et al. 1971). (B) Árvore de máxima parcimônia baseada em dados da seqüência completa de nucleotídeos do gene *period*. Os valores de *bootstrap* estão mostrados nas elipses. Os números de mudanças de nucleotídeos ao longo de cada ramo estão também indicados. As letras indicam as diferentes semi-espécies de *D. paulistorum* estudadas A= Amazônica, AB= Andino-Brasileira, O= Orinocana, C= Centro-Americana, I= Interior e T= Transicional. (Árvore obtida do trabalho de Gleason et al. 1998).

3.4 Aspectos ecológicos

Apesar do número crescente de trabalhos ecológicos com populações de drosofilídeos na região Neotropical, poucos são aqueles em que as espécies do subgrupo da

D. willistoni são distinguidas, o que pode ser entendido facilmente pela semelhança morfológica das espécies e pelo fato de muitas delas serem simpátricas.

Das espécies do subgrupo da *D. willistoni* a mais versátil ecologicamente é a *D. willistoni*. Essa espécie é encontrada em uma ampla gama de ambientes, desde a floresta tropical superúmida até as regiões quase desérticas da caatinga no Nordeste do Brasil. A ampla distribuição geográfica dessa espécie com certeza se deve a essa versatilidade. *Drosophila paulistorum*, por outro lado, apresenta capacidade de adaptação bem menor. Essas duas espécies são as mais freqüentes na América do Sul, sendo que *D. willistoni* é predominante em relação às demais nas savanas e matas de galeria de Goiás, Maranhão e Território de Roraima, nas caatingas (onde as demais não são encontradas), nas épocas frias na Mata Atlântica do litoral paulista e, de maneira geral, na floresta equatorial quando esta é entremeada de savanas. *Drosophila paulistorum* apresenta dominância nas regiões superúmidas e quentes do Panamá, na floresta tropical em torno de Belém, junto ao rio Mucajaí, no Território de Roraima, e em algumas localidades em torno do rio Branco e do rio Negro. É também a espécie mais freqüente durante os meses quentes, na Mata Atlântica do litoral de São Paulo (revisão em Winge 1971). *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* também apresentam diferenças quanto as suas preferências alimentares. Experimentos com iscas fermentadas por diferentes linhagens de levedo, mostraram que as duas espécies são atraídas diferencialmente pelas mesmas (Dobzhansky e Da Cunha 1955). Diferenças na preferência alimentar entre as duas espécies também foram verificadas nas populações urbanas de Porto Alegre, onde vivem em simpatria. *Drosophila willistoni* apresenta preferência por frutos nativos e *D. paulistorum* por frutos exóticos (Santos e Valente 1990, Valiati e Valente 1996).

3.5 Populações ecológica e geograficamente marginais

Até o estudo de Spassky et al. (1971), o limite mais ao sul da distribuição geográfica de *D. paulistorum* era o município de Osório (29°54' S; 51°16' W), localizado no Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Em maio de 1985 essa espécie foi encontrada pela primeira vez no ambiente urbano da cidade de Porto Alegre (30°02' S; 51°14' W), distante 90 km ao sul da cidade de Osório (Santos e Valente 1990). O registro de *D. paulistorum* em Porto Alegre foi uma novidade, uma vez que a espécie era considerada como ausente em ambientes perturbados pelo homem conforme as próprias palavras de Dobzhansky (1965):

“(…) uma questão deve ser assumida, embora ainda não respondida em termos de finalidade, se as notáveis diferenças na arquitetura genética entre *D. willistoni* e *D. paulistorum* estariam relacionadas ao fato de que *D. willistoni*, mas não *D. paulistorum*, evidencia algumas tendências de se tornar uma espécie com potencial colonizador”.

Assim, a ocorrência de *D. paulistorum* no sítio urbano de Porto Alegre sugeriu seu potencial de colonização de novos ambientes e abriu amplas possibilidades de estudos evolutivos com essas populações. Embora a definição de espécie colonizadora possa ser considerada arbitrária devido ao fato de que toda espécie ocupa um território, de acordo com Mayr (1963), esse termo tem sido usado para designar as espécies que invadem ambientes alterados, geralmente devido à ação antrópica. Entre os anos de 1991 e 1992, Valiati e Valente (1996) realizaram um amplo estudo ecológico na cidade de Porto Alegre e verificaram que a frequência da semi-espécie Andino-Brasileira havia aumentado desde seu primeiro registro nesse tipo de ambiente (em Porto Alegre essa é a única das semi-espécies encontrada). O cenário representado pela cidade de Porto Alegre para o estudo do

potencial evolutivo e colonizador de *D. paulistorum* é único, no momento em que essa cidade corresponde a um ambiente geográfico e ecologicamente marginal para a espécie.

De acordo com Mayr (1963), as populações podem ser ecológica e geograficamente marginais, ou ecologicamente marginais e geograficamente centrais. Populações marginais diferem de outras por viverem em limites ecológicos da espécie. A urbanização é, sem dúvida, um dos limites ecológicos para *D. paulistorum* na cidade de Porto Alegre. Apesar disso, essa espécie já foi encontrada nessa cidade em três níveis distintos de urbanização, definidos de acordo com os critérios de Ruzszyk (1984, 1986) como alto, médio e baixo (Santos e Valente 1990, Valiati e Valente 1996). A colonização de um ambiente urbanizado faz com que organismos que habitavam ambientes naturais sejam expostos a novos fatores ecológicos, tanto abióticos como bióticos. Entre esses fatores está a poluição, resultante da presença da atividade comercial e industrial do homem, que altera significativamente o ambiente e causa grande impacto na qualidade do ar, da água e dos recursos naturais (Marcus e Detwyler 1972), além de afetar a composição dos organismos (Lucchese et al. 2002). Assim, a partir das alterações ambientais que são resultantes da ação do homem, durante os processos de urbanização, são criados novos ecossistemas. Outra consequência importante da urbanização é a eliminação potencial de espécies nativas pela introdução de espécies exóticas. Sob esse aspecto, o estudo sistemático da fauna de drosofilídeos de Porto Alegre também permitiu a detecção da colonização recente do ambiente pela *Zaprionus indianus* (Castro e Valente 2001) no ano 2000. A chegada deste drosofilídeo invasor nas nossas latitudes parece estar promovendo ajustes nas estratégias de sobrevivência das espécies residentes, como demonstrado recentemente (Silva et al. 2005 a, b).

3.6 Polimorfismo cromossômico em populações marginais

O modelo central-marginal da biologia evolutiva (revisão em Brussard 1984), prediz que populações próximas ao centro de distribuição da espécie são contíguas, estão em alta densidade e apresentam altos níveis de variação genética e fenotípica, enquanto que populações isoladas, localizadas além das margens da distribuição, são esparsas e cromossomicamente monomórficas (Mayr 1963, Lewontin e Hubby 1966). Nas margens da distribuição geográfica, onde as condições são extremamente adversas à espécie, somente poucos indivíduos, compondo populações isoladas, conseguem se adaptar. Assim, a colonização se dá por um pequeno número de indivíduos e, em alguns casos, apenas por uma única fêmea fecundada, que obviamente contém somente uma pequena fração da variabilidade genética apresentada pelas populações centrais. É nessa idéia que se fundamenta o “princípio do fundador”.

De acordo com Carson (1958), as condições menos favoráveis existentes nas regiões ecológicas marginais da espécie, tenderiam a reduzir o tamanho da população e aumentar o coeficiente de endocruzamento. Por outro lado, como populações pequenas dificilmente podem suportar a contínua produção de heterozigotos menos adaptados e resultantes da segregação de polimorfismos balanceados, essa situação também contribui para a seleção positiva a favor dos homozigotos bem adaptados (“homoseleção”, segundo Carson). De acordo com Carson (1959) as inversões estariam relacionadas a diferentes componentes ambientais, que conferem um “vigor híbrido” quando no estado heterozigoto. Um alto número de heterozigotos estruturais seria favorecido no centro da distribuição da espécie porque o efeito heterótico resultaria em melhor desempenho em meio à variedade de nichos disponíveis, e populações centrais poderiam produzir menos homozigotos

porque teriam maior tamanho populacional e maior possibilidade de cruzamento. Por outro lado, nas populações marginais isoladas, pequenas e endocruzadas, a adaptação do heterozigoto seria perdida. A seleção favoreceria os homozigotos, retendo adaptações baseadas em características específicas e geneticamente fixadas. Essa situação forneceria a explicação para o decréscimo do polimorfismo cromossômico detectado no extremo da distribuição em espécies que apresentam amplo polimorfismo, como ocorre com a *D. willistoni* (Rohde 2000).

Vários autores, entre os quais Mayr (1963) e Brncic (1970), consideram que a menor variabilidade genética das populações isoladas nas margens da distribuição, quando comparadas com as populações centrais, é devida à menor variabilidade ecológica que somente poderia ser explorada por poucos genótipos da espécie, e não pela ação da homoseleção que favorece os homocariótipos, permitindo maior liberdade de recombinação, como sugerido por Carson.

Da Cunha et al. (1950) e Da Cunha e Dobzhansky (1954) propuseram que o modelo central-marginal pode ser explicado por uma hipótese ecológica: o polimorfismo é proporcional ao número de nichos ecológicos explorados pela espécie e mais nichos são disponíveis no centro da distribuição. Sob essa óptica, as inversões resultariam em blocos de genes coadaptados que confeririam adaptações específicas a nichos ou a condições ecológicas particulares.

Wallace (1984) propôs outra hipótese para explicar a variação entre populações centrais e populações isoladas nas margens da distribuição. Assumindo que heterozigotos estruturais têm distintas habilidades competitivas, se comparados aos homozigotos, eles poderiam ser favorecidos em populações mais densas, próximas do centro de distribuição da espécie. Em direção à margem de distribuição, entretanto, a probabilidade de que uma

fêmea encontre um sítio de ovoposição vai diminuindo, juntamente com a probabilidade de que sua prole sobreviva em uma condição ideal. Nestas circunstâncias, a produção de prole razoavelmente adaptada tem maior probabilidade de deixar descendência que sobreviva, do que a produção de um número menor de indivíduos competitivamente superiores e polimórficos para inversões.

Em vista de suas propriedades genéticas únicas, as populações isoladas nas margens da distribuição são consideradas muito importantes nos eventos de especiação (Mayr 1963). Existem alguns poucos estudos do polimorfismo cromossômico da semi-espécie Andino-Brasileira de *D. paulistorum* na cidade de Porto Alegre. Apesar dessa cidade representar o limite sul de distribuição geográfica e ecológica de *D. paulistorum*, Santos e Valente (1990) registraram a presença de 18 inversões heterozigotas nas populações estudadas. Em um estudo posterior no mesmo local, Valiati e Valente (1997) constataram a presença de 23 inversões heterozigotas, das quais 12 eram novas inversões. Embora os achados dos autores fujam à regra do polimorfismo central-marginal anteriormente discutida, a hipótese levantada por Fontdevila (1992) é sugerida para explicar o alto grau de polimorfismo cromossômico encontrado no extremo de distribuição de *D. paulistorum*. De acordo com essa hipótese, as populações marginais seriam mais susceptíveis ao estresse genômico, promovendo a mobilização de elementos transponíveis, reconhecidos por sua capacidade de produzir rearranjos cromossômicos. Tem sido consistentemente sugerida por muitos autores a idéia de que esses elementos podem desempenhar um papel importante na geração de inversões espontâneas em populações naturais, devido aos distúrbios genômicos que causam (revisão em Krimbas e Powell 1992).

Desde o trabalho de Valiati e Valente (1997), entretanto, a situação de *D. paulistorum* em Porto Alegre não foi mais avaliada. Novos estudos ecológicos e

cromossômicos de populações naturais de *D. paulistorum* que ocupam a margem da distribuição geográfica e ecológica são, portanto, extremamente importantes para o entendimento dos mecanismos implicados no processo de colonização.

OBJETIVOS

Considerando a experiência do grupo de pesquisadores do Laboratório de *Drosophila* da UFRGS, que ao longo dos últimos 40 anos acumulou muitas informações a respeito de citogenética e evolução do subgrupo da *Drosophila willistoni*, o presente trabalho tem como objetivo geral contribuir com novos conhecimentos sobre a superespécie *D. paulistorum* a partir dos seguintes objetivos específicos:

1. Elaborar o fotomapa de referência da semi-espécie Andino-Brasileira de *D. paulistorum*, precisar os pontos de quebras das inversões e rearranjos encontrados e analisar o polimorfismo cromossômico em diferentes populações geográficas (Capítulo II);
2. Caracterizar e comparar, através do padrão de bandas dos cromossomos politênicos, as diferentes semi-espécies de *D. paulistorum* com a finalidade de estabelecer as relações evolutivas entre as mesmas (Capítulo III) e estabelecer o relacionamento filogenético com outras espécies do subgrupo da *D. willistoni* (Capítulo IV);
3. Estabelecer nova metodologia para identificação das espécies crípticas do subgrupo da *D. willistoni* com base no padrão eletroforético da enzima Fosfatase ácida-1 (Capítulo V);
4. Estudar a colonização do ambiente urbano de Porto Alegre pela *D. paulistorum*, através do monitoramento das suas populações e da composição das assembléias de drosofilídeos dos quais ela faz parte (Capítulos VI e VII).

CAPÍTULO II

A photomap of polytene chromosomes and inversion polymorphism in Andean- Brazilian semispecies of *Drosophila paulistorum*

Ana Cristina Lauer Garcia, Vera Lúcia da Silva Valente and Cláudia Rohde

Trabalho pronto a ser submetido à *Journal of Heredity*

A photomap of polytene chromosomes and inversion polymorphism in Andean-Brazilian semispecies of *Drosophila paulistorum*

Ana Cristina Lauer Garcia, Vera Lúcia da Silva Valente and Cláudia Rohde

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address correspondence to Ana C. L. Garcia at Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul Brazil. E-mail: alauergarcia@yahoo.com.br

ABSTRACT

In many parts of tropical South America, *Drosophila paulistorum* is the second most abundant species of the *D. willistoni* subgroup. It comprises six semispecies: Andean-Brazilian, Amazonian, Centro-American, Interior, Orinocan and Transitional that together form the superspecies *D. paulistorum*. Recently, interest has been renewed in the evolutionary aspects of *D. paulistorum*, because it is still evolving and shows considerable variability of gene rearrangements on the chromosomes. However, few systematic studies on the chromosomal evolution of this species complex have been made and the only available reference map of its polytene chromosomes is a sketch map made in 1966. In the present paper, we present the first photomap for the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, the most widely distributed semispecies. Homozygous arrangements and

heterozygous inversions were scored in different populations of the Neotropical region and the breakpoints plotted on the above-mentioned photomap thus taking the first steps towards achievement of our primary objective - to make a detailed study of the chromosomal evolution of *D. paulistorum* superspecies.

INTRODUCTION

Drosophila paulistorum Dobzhansky and Pavan (Burla et al. 1949) is a Neotropical complex species of the *Sophophora* subgenus, with an area of distribution extending from Guatemala and Trinidad to southern Brazil. It comprises six semispecies, namely: Andean-Brazilian, Amazonian, Centroamerican, Orinocan, Transitional (Dobzhansky and Spassky 1959) and Interior (Pérez-Salas et al. 1970). In many parts of tropical South America, it is the second most abundant species of the *D. willistoni* subgroup.

Until *D. paulistorum* was found as a cluster of semispecies or incipient species (Dobzhansky and Spassky 1959) it did not seem a particularly interesting species for evolutionary studies. However, it has been shown to be a rich and promising source for the study of evolution and species formation. The semispecies show sexual (ethological) isolation from one another, and when crosses between them do occur, male hybrids are sterile (Ehrman 1960; 1962; Dobzhansky et al. 1969). Each semispecies has a distinct geographic distribution, but in some places two or more overlap (Spassky et al. 1971) and sympatric strains of two semispecies show greater isolation coefficients than do allopatric strains of the same semispecies (Ehrman 1965). Although the semispecies of *D. paulistorum* are morphologically identical it is possible to identify them by crosses with

known semispecies (Ehrman and Powell 1982) and by the study of polytene chromosomes (Kastritsis 1966; 1967; 1969).

The karyotype configuration of *D. paulistorum* consists of three pairs of mitotic chromosomes, two metacentric (the sexual pair and the second chromosome) and one acrocentric (the third chromosome) (Burla et al. 1949). Kastritsis (1966) made a *camera lucida* sketch map of the polytene chromosomes of Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, the most widely distributed among the semispecies, using as standard a strain collected in Palmira, Colombia and arbitrarily divided the polytene chromosomes XL, XR, 2L, 2R and 3 into sections numbered from 1 to 100. Kastritsis (1966, 1967, 1969) also analyzed the configurations of the polytene chromosomes of the six semispecies and of the hybrids between them comparing the chromosomal polymorphism within the populations of these semispecies. The author above classified *D. paulistorum* among the most chromosomally polymorphic species in the genus, pointing out the existence of at least 85 chromosomal arrangements. In a further study, Santos and Valente (1990) studied the level of chromosomal polymorphism of paracentric inversions in different populations of Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, collected in urban environment of Porto Alegre, Brazil. These authors detected the existence of 18 chromosomal inversions, in spite of the geographical and ecological marginality of these populations. Some years later, Valiati and Valente (1997) re-evaluated the chromosomal polymorphism of this species in samples from the same locality, registering 23 polymorphic inversions, six of them corresponding to some of the 18 described by Santos and Valente (1990).

Although Kastritsis (1966) reference map has been used in more recent chromosomal studies with *D. paulistorum* (Santos and Valente 1990; Valiati and Valente 1997) it can only with difficulty be used for a modern cytogenetic approach. As presented

by the pioneer authors the sketch map makes it very difficult to compare the exact inversion configuration with those recorded in previously published drawings and plates so as to determine if they are the same or new inversions.

In the present investigation we present a reference photomap of Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum* based on a study of 17 different geographic populations. We also present a detailed description of homozygous and heterozygous inversions, with their breakpoints and frequencies, and an analysis of the degree of inversion polymorphism of populations. The present report is part of a more extensive chromosomal evolution study designed to improve our understanding of the diversification mechanisms of the semispecies of *D. paulistorum*.

MATERIALS AND METHODS

Populations analyzed– Seventeen populations from different geographical locations of the semispecies Andean-Brazilian were analyzed (Table 1 and Figure 1). Six of them correspond to mass mating stocks, maintained in laboratory since the date of their collections. At least ten chromosomal arms from different larvae were analyzed per each mass mating population. The other 11 populations were collected and maintained in the laboratory as isofemale lines. At least five different nucleus were analyzed per isoline. All populations were identified as *D. paulistorum* species by the characterization of Acid phosphatase-1 (*AcpH-1*) enzyme, in accordance with the protocol described by Garcia et al (Chapter V of this Thesis).

Culture conditions and cytological preparations -Although good *D. paulistorum* chromosomal preparations are notoriously difficult to obtain due to the thin chromosomes that seldom spread well, we obtained satisfactory results by improving the procedures and rearing larvae cultures at low density and feeding them with biological yeast in the culture medium described by Marques et al. (1966) at $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ chamber and 60% relative humidity. Salivary glands of third instar female larvae were dissected in a physiological solution (Ephrussi and Beadle 1936), fixed in acetic acid 45% during 30 seconds, stained with aceto-lactic orcein (orcein 2% diluted in 51% of acid acetic glacial, 34% of distilled water and 15% of lactic acid 85%) and then gently squashed under a siliconized coverslip (dimetildiclorosilane 2% diluted in chlorophormium). Well politenized chromosomes were obtained and the best observed nuclei were photographed in a Zeiss phase-contrast microscope. For each individual analyzed the inversion and arrangements were scored using photomicrographs of all chromosomal arms.

Construction of the photomap - The chromosomal photomap of Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum* was constructed with carefully selected photos of different chromosomes considered representative of the banding pattern. The best images were captured with the aid of a scanner and processed with the Adobe Photoshop 5.0 program. The chromosomal arms were divided into sections represented by numbers and into subsections represented by capital letters (starting with A in the proximal region). The chromosomes were divided into the 100 sections first used by Kastritsis (1966) but the chromosomal arm descriptions were changed and adopted to conform to the system used by Dobzhansky (1950) in his reference map of the *D. willistoni* species (XL, XR, IIL, IIR and III). The different arrangements of X chromosome and the heterozygous inversions of

the autosomes were identified by lower case letters to distinguish our results from those of the previously cited authors who numerate the inversions. However, wherever possible, we established correspondence between our description and the earlier studies. All the inversions we named (for example, XLc) represent a new configuration from the standard order presented in the photomap (XL).

Polymorphism analysis - Four different estimates of degree of inversion polymorphism were used: (i) the degree of heterozygosity (HZ); (ii), (iii) the hetero and homo inversions density (ID) (both in Sperlich and Kunze-Muehl 1963); and (iv) the index of free recombination (IFR) (Carson 1955). The HZ index can be defined as the mean number of structurally heterozygous chromosome arms per individual and depends on the number and relative frequencies of chromosome structures as well as on how many chromosomes of the set are polymorphic, but it is unaffected by the complexity of gene arrangement. The ID index measures the average number of heterozygous inversions per individual in a wild population by counting all heterozygous in an inversion complex which contribute two, three or more inversions. In our study we present two different ID estimates: the ID (hetero) that correspond to the frequency of heterozygous inversions alone; and the ID (homo) that also includes the inversions occurring in the homozygous state. To calculate the inversion frequencies used to estimate ID (homo), we considered each inversion in the heterozygous state once, and each inversion in the homozygous state (representing each chromosome homologue) twice. As a consequence of this procedure the true number of chromosomal arms analyzed was twice the number of females analyzed, since each female has two homologous chromosomes. Inversion frequency was calculated as follows:

$$\text{Inversion frequency} = \frac{\text{total number of inversion found in the population}}{\text{total number of chromosomal arms analyzed}}$$

The IFR index refers to the effect of heterozygous inversion on recombination reduction and considers both the frequency and the length of an inversion. It measures all chromosome sections in the entire set of chromosome of individuals that are not entangled in inversions loops, and represent the proportion of euchromatin available (or free) for recombination.

RESULTS

The first photomap of the polytene chromosomes of Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum* is shown in Figure 2. All chromosomes were oriented in the same way, with the proximal (centromeric) regions at the left and the distal (free) regions at the right. In the photomap there are 16 sections on XL (1 to 16), 20 on XR (17 to 36), 19 on IIL (37 to 55), 22 on IIR (56 to 77), and 23 on III (78 to 100). The XL arm represented 17.20% of the total chromosomal set, XR 19.20%, IIL 19.37%, IIR 19.53% and chromosome III 24.70%. These relative lengths were calculated by measuring all sections of each chromosomal arm and relating each one with the total size of all chromosomes in the original photomap.

Notwithstanding the difficulties in working with chromosomes of this species, each one of the chromosomal arms can be easily identified by looking for their distal regions. The XR arm presents a repeat region in section 24C and the IIR arm contains a repeat

region shown in section 64A of the photomap (Figure 2). Very distinct puffs are useful landmarks for arm recognition, for example, the puffs of section 13B of XL, the three large puffs in the sections 19B, 26B and 32A of XR; those in the sections 50B and 51A of IIL, the sections 73A, B and 76B of IIR, and the sections 84A and 87A of III (Figure 2). Frequently, the IIR arm can be found connected to the centromeric region and the chromosome III is many times found broken in the section 88A, which seems to be a fragile sub-replicated region (Figure 3).

The careful analysis of the banding pattern of polytene chromosomes revealed the presence of different homozygous arrangements for XL and XR arms (Figure 4). Because of this, we propose to use the description “XL/XL” when referring to the homozygous arrangement of XL, as shown on the photomap; to “XLc/XLc” when referring to the alternatively fixed homozygous arrangement present in some of the populations studied; and to “XL/XLc” when mentioning to the heterozygous inversion (i.e. the result of the pairing between two different arrangements in the same individual). The respective frequencies of the homozygous arrangements in each population are presented in Table 2. As can be seen in this table, the arrangements XL/XL and XR/XR were found most frequently in almost all the populations we investigated. Because of their high frequency, they were chosen as the order of reference for composition of the photomap of the Andean-Brazilian semispecies (Figure 2). The arrangement XLc/XLc appeared most frequently only in the BRA and RIB populations while the arrangement XRh/XRh, was the commonest in ECU, RIB and MSA populations. Detailed description of heterozygous inversions of XL and XR are also presented in Figure 4. Diverging from the practice of earlier authors, we used a lower case letter to identify each inversion, because, as we are attempting to present new descriptions for each inversion, (accompanied by a detailed

photomap and breakpoint descriptions) we opted to use new names for identification of all inversions to avoid misunderstandings.

Figure 5 shows photomicrographs with the seven inversions registered in the chromosome III, the most polymorphic chromosome in this study. The exact breakpoints of these inversions are represented on the photomap by brackets above the chromosome and a capital letter indicating the inversion's name. Contrasting with the polymorphism detected in the chromosome III, no inversion was registered in the chromosome II in all the populations we investigated.

The frequency of all heterozygous inversions found in chromosomal arms XL, XR and III are indicated in Table 3. The most frequent and representative inversions were XRh, IIIId and XLc, occurring in seven, eight and ten populations respectively. Four inversions were exclusively found in one population: IIII in BRA, IIIIn and IIIIo in IQG, and IIIly in TAB. In some cases we were unable to conciliate the inversions detected in this study with the inversion photomicrographs published by Kastritsis (1967), Santos and Valente (1990) and Valiati and Valente (1997) who were working with the Andean-Brazilian semispecies.

In order to permit temporal and spatial comparative analysis between our data and previous studies for Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, the inversion frequencies of two populations obtained by the earlier authors from the same places where the samples were collected for our own investigation, (RMT and JBO - both in the city of Porto Alegre, South Brazil), are also shown on Table 3. When the previous registers estimated by Santos and Valente (1990) and Valiati and Valente (1997) are compared with our 2002/2004 data, the Andean-Brazilian semispecies in general is shown to be less polymorphic in the later years in terms of the number and frequencies of the inversions.

In Table 4 we present for the first time four different estimates of chromosomal polymorphism for all the populations of the Andean-Brazilian semispecies of *D.*

paulistorum we studied. None heterozygous inversions were found in populations from PAR, JAI, MLC, ITC and in consequence these populations showed the lowest values of ID (hetero) and the highest IFR indexes. The most polymorphic populations for heterozygous inversions were BRA, IQG, TAB, ELD and MSA, as shown by IFR and ID (hetero) except for MSA in the ID (hetero) index. The HZ and ID (homo) indexes were sensitive when used to estimate the amount of homozygous arrangements in the X chromosome and detected the highest values for the ECU, RIB, BRA, IQG and MSA populations.

DISCUSSION

In the last few years not much cytogenetic research has been carried out with *D. paulistorum*. In this article we attempt to re-awaken interest in this particular study area by illustrating the possibilities of the cytogenetic analysis of populations of Andean-Brazilian semispecies (which are representative of flies found in many parts of the geographical distribution of this species) to describe its chromosomal polymorphism. The samples we used were obtained in Ecuador and in the northern, central and southern regions of Brazil (Figure 1). So far, a total of 10 polymorphic inversions have been identified: two on chromosomal arm XL (inversions XLc and XLi), one on chromosomal arm XR (inversion XRh) and seven on chromosome III (inversions IIIo, IIIl, IIIf, IIIn, IIIy, IIIe and IIIId).

For the first time this study identifies homozygous inversions included in the analysis of chromosomal polymorphism in the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*. This was possible mainly because of three factors: 1) the careful maintenance of our fly strains, which allowed us to obtain excellent chromosomal preparations; 2) the

precise analysis of each inversion through the use of several different photomicrographs representing all possible configurations and 3) the invaluable assistance of the photomap presented here (Figure 2). Photomaps are more precise than sketch maps, and facilitate more precise registry of every detail, and greater accuracy in the observation of the bands and/or “marker” or “landmark” regions of the chromosomes, as well as the exact breakpoints of all inversions detected (Figures 4 and 5). For instance, this analysis reveals two homozygous arrangements in the chromosome X. The inversions XLc and XRh in homozygosis yield the arrangements XLc/XLc and XRh/XRh respectively. These inversions, together with IIIId inversion, have the widest geographic distribution and characterize the majority of the populations we studied (Table 3). With respect to the X chromosome, Rohde (2000) observed for *D. willistoni* (a sibling species of *D. paulistorum*) a clear discontinuity of arrangements between 22 populations analyzed. The author found a total of eight different arrangements in the XL arm and seven in the XR. These arrangements showed variations associated with the origin of the population. In contrast, our data did not disclose a clear pattern of geographical distribution for the X-chromosome in Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*. A possible explanation for this difference is that our species is in a process of evolutionary diversification while *D. willistoni* remains a fully developed species.

With respect to the autosomal arms IIL, IIR and chromosome III, we observed that the populations share the same standard arrangement, within which seven inversions segregate only in the chromosome III. In a similar manner, only one standard arrangement was observed in each autosome arm of *D. willistoni* (Rohde 2000). However, in *D. willistoni*, the above-mentioned author found high polymorphism in relation to all autosomes, observing seven and nine segregating inversions in chromosomal arms IIR and

IIL respectively, and thirteen inversions in the chromosome III. In the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, the III chromosome was also the most polymorphic but no segregating inversion was found in our populations in relation to chromosome II. According to our findings with *D. paulistorum*, several Drosophilidae exhibit a considerable higher polymorphism in one of the chromosomes in comparison with the rest of chromosomal set. Some examples are: *D. mediopunctata* (Ananina et al. 2002), *D. nebulosa* (Da Cunha et al. 1953), *D. subobscura* (Krimbas 1992) and *D. pseudoobscura* (Schaeffer et al. 2003).

Our records of chromosomal polymorphism of the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum* are not so very different from those found by Kastritsis (1967) almost forty years ago. After careful analysis of 29 populations of the Andean-Brazilian semispecies, the author cited above detected three inversions in the chromosomal arm XL, one in XR, two in IIL, no inversion in IIR and nine in the III chromosome. In the same chromosomal arms we registered respectively, two inversions for XL, one for XR, zero for chromosome II and seven for the III chromosome. Although the configurations of some heterozygous inversions described by Kastritsis (1967) could not be recognized in our micrographs, two features agrees with our data and deserve comment, the absence of inversion in chromosomal arm IIR and the fact that the III chromosome was the most polymorphic.

Our data of chromosomal polymorphism of populations JBO and RMT from Porto Alegre indicated only three inversions (XLc, XRh and IIIId) while Santos and Valente (1990) detected 14 inversions and Valiati and Valente (1997) detected 22 in the same places (Table 3). This loss of chromosomal variability may be a consequence of a considerable reduction of the *D. paulistorum* populations in Porto Alegre (Chapter VI of

this Thesis), which has created a situation where only the three more frequent inversions are still segregating. This assumption can be also supported by data in Table 4 where the JBO and RMT populations in Porto Alegre city show rising IFR indexes. The rarer inversions appear to have suffered a bottleneck effect and were probably either lost completely or are still occurring but at very low frequencies not being sampled in our collections of *D. paulistorum*.

The comparative analysis of the HZ, ID (homo), ID (hetero) and IFR indexes did not reveal any clear association between the populations and their geographic origin on dendrograms generated from these indexes whether taken together or individually (data not shown). The absence of consistent geographical clustering in our analyses may perhaps be due in part to the fact that some of the populations have been maintained as mass cultures in the laboratory for some years, thereby possibly losing typical inversions probably still found in natural populations. However, the indexes were very useful for comparing the chromosomal characteristics of the populations. As a rule, HZ and ID (homo) produced similar information as did the IFR and ID (hetero). The first two of these indexes permitted detection of the real polymorphism expressed by homozygous arrangements which had been undetected previously by other studies.

In conclusion, we recommend caution on two aspects of Kastritsis (1969) statement “... chromosomally speaking, *paulistorum* is by far the most polymorphic species known in the genus *Drosophila*”. Firstly, the *Drosophila paulistorum* superspecies is still in progress of diversification - as Spassky and Dobzhansky (1959) put it “... a cluster of species in *statu nascendi*”. Secondly, Kastritsis (1969) reached his conclusion by considering the polymorphism detected in all the semispecies and in the hybrids produced between them. It is worth mentioning that, before the present study, no investigator had defined the inversion breakpoints precisely, so that some inversions could have been misinterpreted by other authors.

REFERENCES

- Ananina G, Peixoto AA, Souza WN and Klaczko LB, 2002. Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:691-694.
- Burla H, Da Cunha AB, Cordeiro AR, Dobzhansky T, Malogolowkin C, and Pavan C, 1949. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. Evolution 3:300-314.
- Carson HL, 1955. The genetic characteristics of marginal populations of *Drosophila*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 20:276-287.
- Da Cunha AB, Brncic DJ and Salzano FM, 1953. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. Heredity 7:193-202.
- Dobzhansky T, 1950. The chromosomes of *Drosophila willistoni* J Hered 41:156-158.
- Dobzhansky T and Spassky B, 1959. *Drosophila paulistorum*, a cluster of species in *statu nascendi*. Proc Natl Acad Sci 45:419-428.
- Dobzhansky T, Pavlovsky O and Ehrman L, 1969. Transitional populations of *Drosophila paulistorum*. Evolution 23:482-492.
- Ehrman L, 1960. The genetics of hybrid sterility in *Drosophila paulistorum*. Evolution 14:212-223.
- Ehrman L, 1962. A new type of hybrid sterility in *Drosophila paulistorum*. Nature 193:1208-1209.
- Ehrman L 1965. Direct observation of sexual isolation between allopatric and between sympatric strains of the different *Drosophila paulistorum* races. Evolution 19:459-464.

- Ehrman L and Powell JR, 1982. The *Drosophila willistoni* species group. In: The genetics and biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL, and Thompson JN, eds). New York: Academic Press; 3b:193-225.
- Ephrussi B and Beadle GW, 1936. A technique of transplantation for *Drosophila*. *Am Nat* 70: 218-225.
- Kastritsis CD, 1966. A comparative chromosome study in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 19:208-222.
- Kastritsis CD, 1967. A comparative study of the chromosomal polymorphs in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 23:180-202.
- Kastritsis CD, 1969. A cytological study on some recently collected strains of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 23:663-675.
- Krimbas CB, 1992. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. In *Drosophila Inversion Polymorphism* (Krimbas CB and Powell JR, eds). Florida: CRC Press; 127-220.
- Marques EK, Napp M, Winge H and Cordeiro AR, 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosoph Inf Serv* 41:187.
- Pérez-Salas S, Richmond RC, Pavlovsky OA, Kastritsis CD, Ehrman L, and Dobzhansky T, 1970. The interior semispecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 24:519-527.
- Rohde C, 2000. Polimorfismo Cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. (PhD dissertation). Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Santos RA and Valente VLS, 1990. On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan (Diptera, Drosophilidae) in an urban environment: ecological and cytogenetic observations. *Evol Biol* 4:253-268.

- Schaeffer SW, Goetting-Minesky MP, Kovacevic M, Peoples JR, Graybill JL, Miller JM, Kim K, Nelson JG and Anderson WW, 2003. Evolutionary genomics of inversions in *Drosophila pseudoobscura*: evidence for epistasis. Proc Natl Acad Sci U S A 100:8319-8324.
- Spassky B, Richmond RC, Perez-Salas S, Pavlovsky OA, Mourao CA, Hunter AS, Hoenigsberg HF, Dobzhansky T and Ayala FJ, 1971. Geography of sibling species related to *Drosophila willistoni*, and the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. Evolution 25:129-143.
- Sperlich D and Kunze-Muhl E, 1963. Der chromosomale polymorphismus einer population von *Drosophila subobscura* auf der insel ustica im vergleich mit anderen insel- und festlandstandorten. Z Vererb Lehre 94:94-100.
- Valiati VH and Valente VLS, 1997. Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. Braz J Genet 20:567-581.

Population	Place of collection	Collection Year	Collector
ECU	Jaton Sacha, Ecuador	1997	1
PAR	Belém, PA, Brazil	1997	2
BRA*	Brasília, DF, Brazil	2000	3
RIB	Ribeirão Preto, SP, Brazil	1995	4
JAI	Serra do Japi, Jundiaí, SP, Brazil	2003	5
IQG*	Queimada Grande Island, SP, Brazil	2003	5
RAT	Ratones Grande Island, SC, Brazil	1997	6
MLC*	Morro da Lagoa da Conceição, SC, Brazil	2003	7
ITC*	Itacorubi, SC, Brazil	2005	8
TAV*	Tavares, SC, Brazil	2005	8
TAB*	Serra do Tabuleiro, SC, Brazil	1997	6
ELD*	Eldorado do Sul, RS, Brazil	1994	9
MSA	Porto Alegre (Morro Santana), RS, Brazil	1995	9
JBO*	Porto Alegre (Botanic Garden), RS, Brazil	2002	10
JBO*	Porto Alegre (Botanic Garden), RS, Brazil	2004	11
RMT*	Porto Alegre (Mário Totta Street), RS, Brazil	2002	10
RMT*	Porto Alegre (Mário Totta Street), RS, Brazil	2004	11

Numbers refer to the name of flies' collectors: (1) Margaret Kidwell and Joana Silva, (2) Marlúcia Martins, (3) Rosana Tidon, (4) Cláudia Rohde, (5) Hermes Medeiros, (6) Daniela De Toni, (7) Marco Gottschalk, (8) Hermes Schmitz, (9) Luciano B. da Silva, (10) André Schnorr, (11) Ana Lauer Garcia.

* indicate populations analyzed as isofemale lines.

Table 1. Studied populations of Andean-Brazilian semispecies of *Drosophila paulistorum*

Table 2. Frequencies (%) of different arrangements detected on the left arm (XL) and on the right arm (XR) of chromosome X of Andean-Brazilian *Drosophila paulistorum* populations.

Populatio n	Collection Year	N	XL arrangements		XR arrangements	
			XL/XL	XLc/XLc	XR/XR	XRh/XRh
ECU	1997	14	75.00	25.00	0	100,00
PAR	1997	5	100,00	0	100,00	0
BRA*	2000	6	33.33	66.67	50.00	50.00
RIB	1995	10	0	100,00	0	100,00
JAI	2003	6	100,00	0	83.33	16.67
IQG*	2003	10	68.18	31.82	86.36	13.64
RAT	1997	10	52.78	47.22	100,00	0
MLC*	2003	6	100,00	0	100,00	0
ITC*	2005	3	100,00	0	100,00	0
TAV*	2005	6	66.67	33.33	100,00	0
TAB*	1997	2	75.00	25.00	100,00	0
ELD*	1994	11	90.91	9.09	95.45	4.55
MSA	1995	10	60.00	40.00	20.00	80.00
JBO*	2002	7	71.43	28.57	71.43	28.57
JBO*	2004	6	83.33	16.67	91.67	8.33
RMT*	2002	15	70.00	30.00	86.67	13.33
RMT*	2004	68	75.00	25.00	71.32	28.32

N = number of analyzed individuals. * indicate populations analyzed as isofemale lines.

Table 4. Characterization of the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum* with respect to paracentric inversion polymorphism, estimated by different indexes. Standard deviations are given in each case.

Population	Collection Year	N	HZ	ID (homo)	ID (hetero)	IFR
ECU	1997	14	1.5000 ± 0.7596	2.7143 ± 1.0690	0.2857 ± 0.613	0.9849 ± 0.0327
PAR	1997	5	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
BRA*	2000	6	1.8333 ± 0.9832	3.6667 ± 1.2110	1.6667 ± 1.2110	0.9268 ± 0.0404
RIB	1995	10	2.6000 ± 0.5164	4.6000 ± 0.5164	0.6000 ± 0.5164	0.9694 ± 0.0263
JAI	2003	6	0.1667 ± 0.4082	0.3333 ± 0.8165	0.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
IQG*	2003	10	1.0000 ± 0.6667	1.5000 ± 1.1785	0.9000 ± 0.8756	0.9461 ± 0.0516
RAT	1997	10	0.6000 ± 0.5164	1.0000 ± 0.9428	0.2000 ± 0.4216	0.9882 ± 0.0249
MLC*	2003	6	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
ITC*	2005	3	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
TAV*	2005	6	0.5000 ± 0.5477	0.6667 ± 0.8165	0.3333 ± 0.5164	0.9803 ± 0.0305
TAB*	1997	2	1.0000 ± 1.4142	1.0000 ± 1.4142	1.0000 ± 1.4142	0.9610 ± 0.0552
ELD*	1994	11	0.8182 ± 0.9817	1.0000 ± 1.4832	1.0000 ± 1.4832	0.9528 ± 0.0615
MSA	1995	10	1.8000 ± 0.6325	2.8000 ± 0.9189	0.8000 ± 0.6325	0.9543 ± 0.0357
JBO*	2002	7	0.5714 ± 0.7868	1.1429 ± 1.6762	0.2857 ± 0.4879	0.9831 ± 0.0288
JBO*	2004	6	0.3330 ± 0.5164	0.5000 ± 0.8367	0.1667 ± 0.4082	0.9892 ± 0.0266
RMT*	2002	15	0.8000 ± 0.6761	1.0000 ± 0.8152	0.6000 ± 0.7267	0.9650 ± 0.0412

HZ = degree of heterozigosity; ID (homo) = inversion density per female (inversions that occur in the homozygous and heterozygous state); ID (hetero) = inversion density per female (heterozygous inversions only); IFR = index of free recombination. N= number of individuals analyzed. * indicate populations analyzed as isofemale lines.

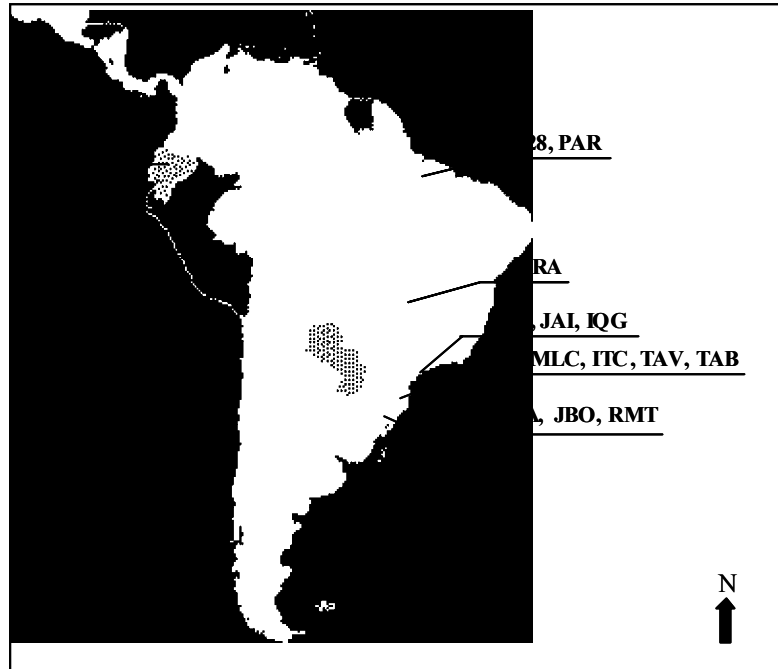


Figure 1. Map of the South America showing the original locations of the *D. paulistorum* Andean-Brazilian populations studied (see Table 1).

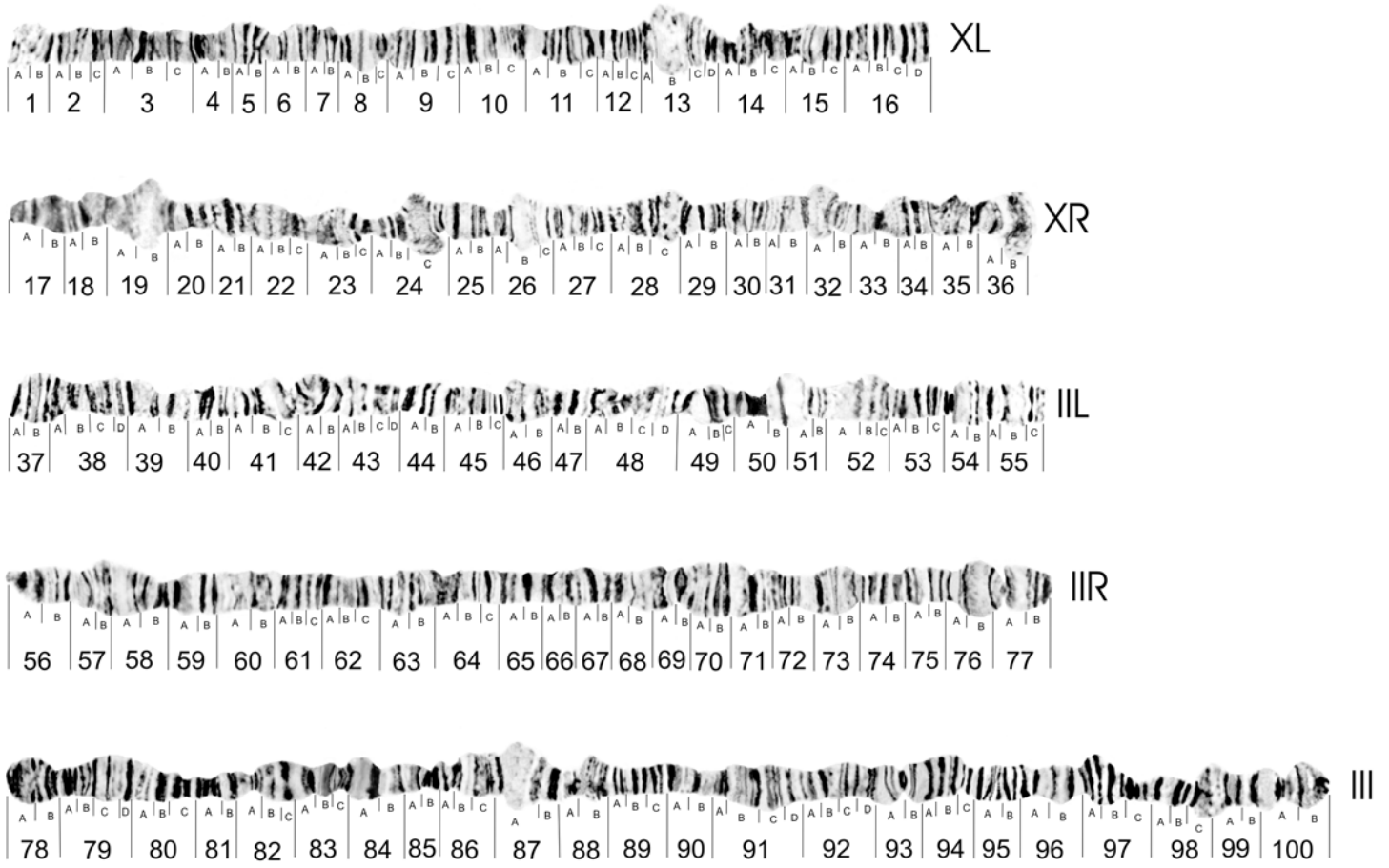


Figure 2. Photomap of Andean-Brazilian semispecies of *Drosophila paulistorum*.

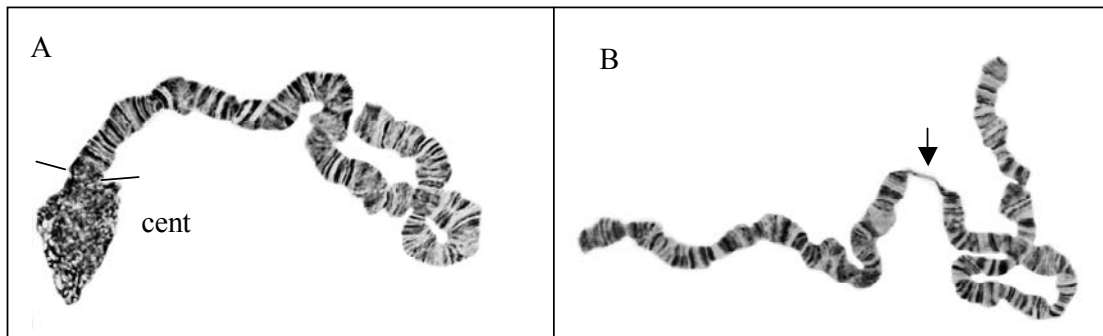


Figure 3. Common configurations found in the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*. (A) Chromosomal arm IIR connected to the centromeric region (cent); (B) Chromosome III broken in section 88A as indicated by an arrow.

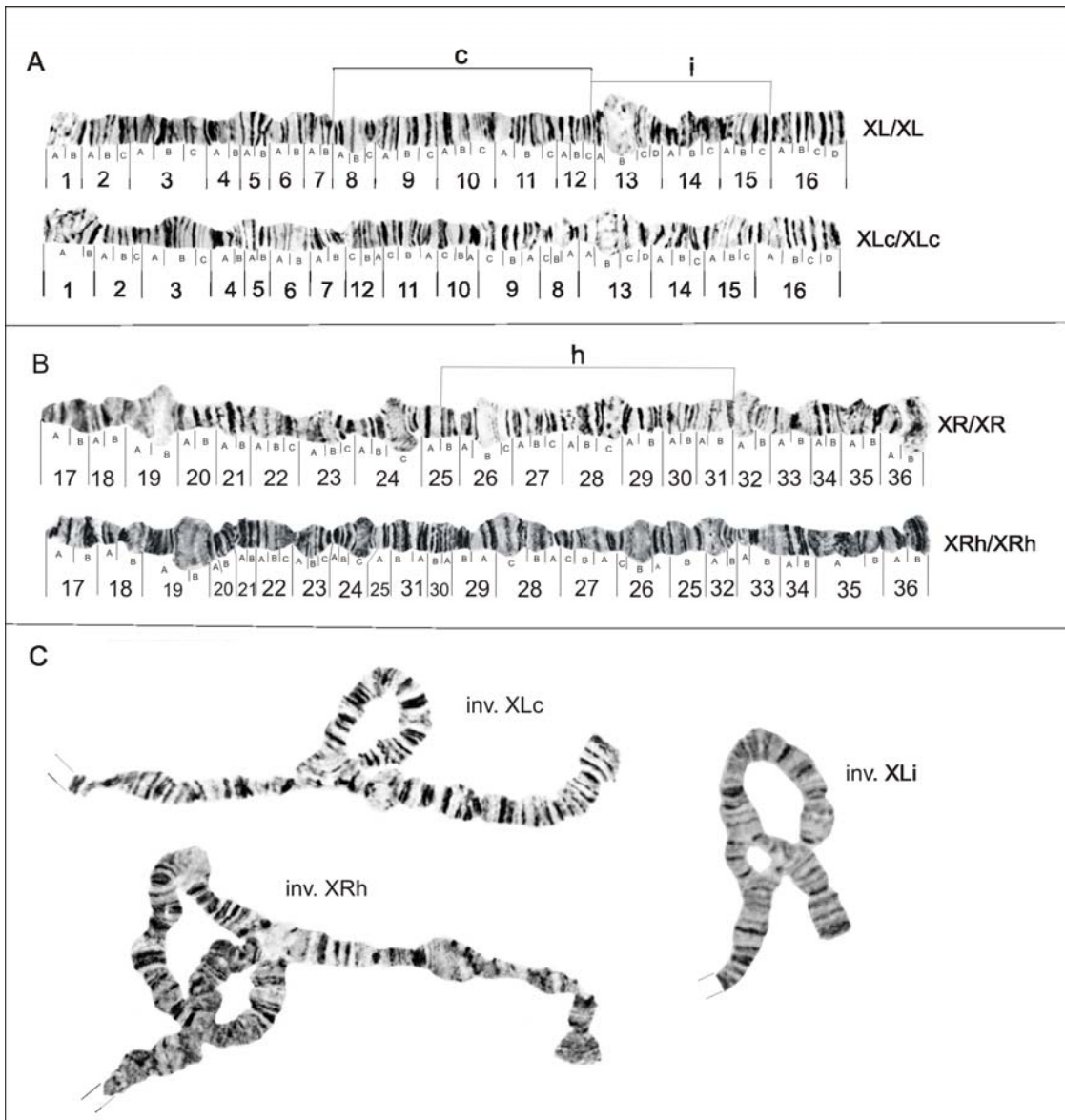


Figure 4. Different homozygous and heterozygous arrangements in the polytene chromosome X in the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*. (A) Homozygous arrangements XL/XL and XLC/XLC, (B) Homozygous arrangements XR/XR and XRh/XRh. Brackets above the chromosome arms in A and B correspond to inversion breakpoints. (C) Heterozygous inversions XLC (XL/XLC), XLI (XL/XLI) and XRh (XR/XRh). inv= inversion.

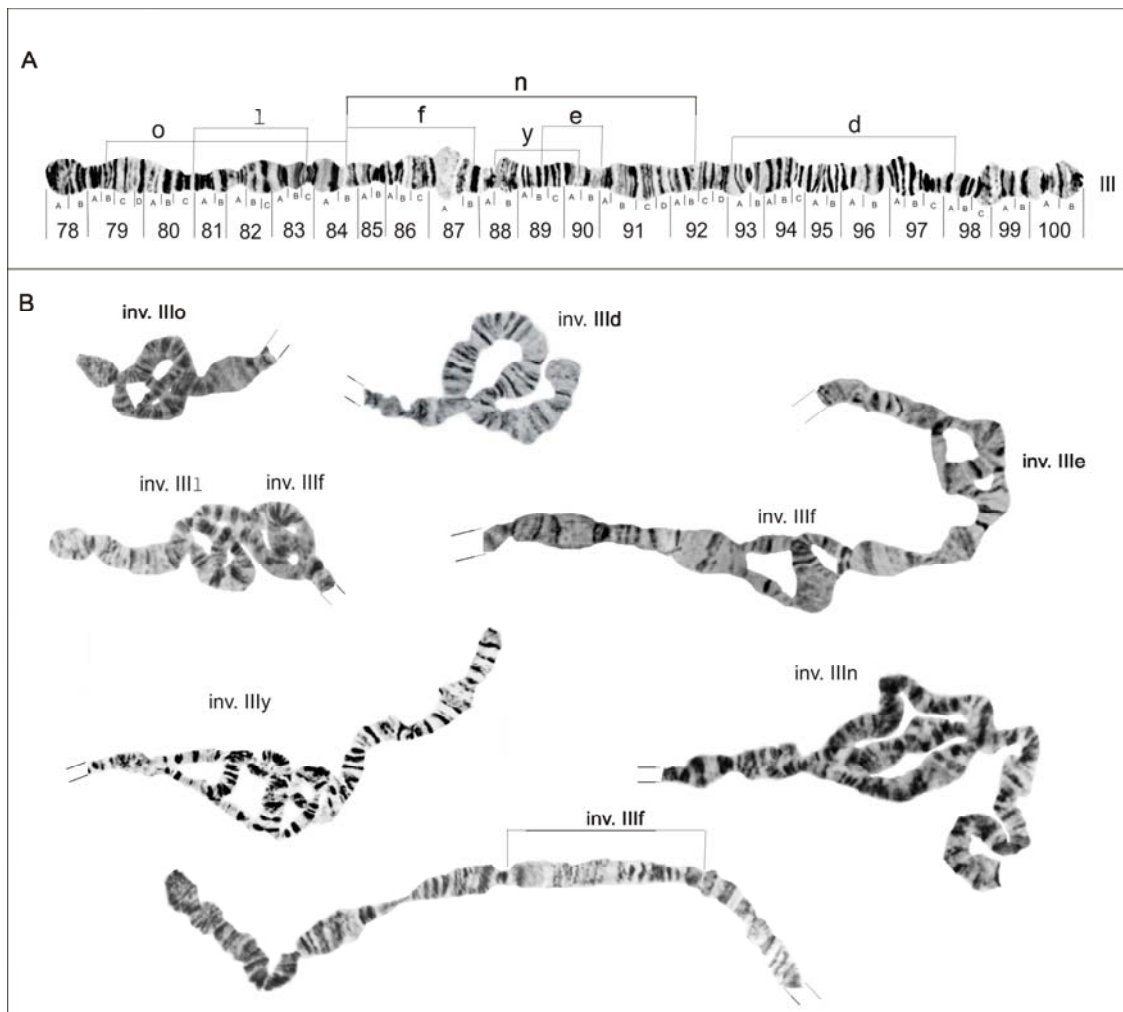


Figure 5. Inversions detected on the chromosome III in the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*. (A) Inversion breakpoints represented by brackets above the III chromosome. (B) Configurations of the heterozygous inversions IIIo, IIIl, IIIf, IIIy, IIIe, IIIn and IIId. Homozygous inversion IIIf are also presented. Inv= inversion.

CAPÍTULO III

Evolução cromossômica dos autossomos das semi-espécies de *Drosophila paulistorum*: elementos B, C e E de Muller

Ana Cristina Lauer Garcia, Cláudia Rohde e Vera Lúcia da Silva Valente

Trabalho em preparação, a ser submetido à *Journal of Heredity*

Evolução cromossômica dos autossomos das semi-espécies de *Drosophila paulistorum*: elementos B, C e E de Muller

Ana Cristina Lauer Garcia^{*}, Cláudia Rohde e Vera Lúcia da Silva Valente.

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para correspondência. E-mail: alauergarcia@yahoo.com.br

Resumo

Através do estudo do padrão de bandas dos cromossomos politênicos autossômicos (elementos C, B e E de Muller) das semi-espécies de *D. paulistorum* observou-se que os cariótipos dessas semi-espécies são pouco reorganizados, refletindo sua proximidade evolutiva. A análise comparativa da reorganização dos blocos de homologia cromossômica permitiu inferir o número mínimo de eventos responsáveis pela diversificação das semi-espécies, bem como o relacionamento filogenético entre elas. As semi-espécies Andino-Brasileira e Orinocana foram homoseqüenciais. Para o cromossomo II, foram observadas duas inversões paracêntricas não sobrepostas envolvendo a região mediana de cada um dos braços que parecem ter sido fixadas, gerando os padrões atuais. O cromossomo III apresentou reorganizações nas regiões média e distal, com quatro arranjos relacionados por três prováveis inversões fixadas.

Introdução

Desde a redescoberta dos cromossomos politênicos nos tecidos larvais de *Drosophila* e outros dípteros, feita em 1933 (Heitz e Bauer 1933, Painter 1933), a pesquisa na área da genética tem despontado com valiosas contribuições para estudos evolutivos. A pressuposição da origem única das inversões em *Drosophila* e a riqueza de informação obtida pela análise comparativa do padrão característico e constante das bandas dos cromossomos politênicos levaram Sturtevant e Dobzhansky (1936) a estabelecerem um método de uso desses cromossomos para inferir relações filogenéticas entre espécies proximamente relacionadas. Através desse método, diversos autores têm construído filogenias para diferentes grupos do gênero *Drosophila* (revisões em Carson e Yoon 1982, Lakovaara e Saura 1982, Clayton e Guest 1986, Lemeunier et al. 1986).

Drosophila paulistorum Dobzhansky e Pavan (Burla et al. 1949), um dos drosofilídeos integrantes do subgrupo Neotropical da *D. willistoni*, é uma superespécie constituída de seis raças ou semi-espécies: Andino-Brasileira, Amazônica, Centro-Americana, Orinocana, Transicional (Dobzhansky e Spassky, 1959) e Interior (Pérez-Salas et al. 1970). Linhagens de diferentes semi-espécies cruzam com dificuldade e quando híbridos são produzidos as fêmeas são férteis e os machos estéreis (Ehrman 1965). O fato de *D. paulistorum* ser composta por semi-espécies revela sua importância para a realização de estudos evolutivos, uma vez que sua diversificação em nível de espécies ainda não está completa e mudanças envolvidas nesse processo são possíveis de serem detectadas e/ou monitoradas.

Como primeiro passo para o estudo da evolução cromossômica da *D. paulistorum*, Garcia et al. (Capítulo II desta Tese) confeccionaram o primeiro fotomapa dos

cromossomos politênicos da semi-espécie Andino-Brasileira, a partir do estudo de várias populações de diferentes regiões geográficas. Esse fotomapa foi proposto como referência no estudo da evolução cromossômica de *D. paulistorum* em substituição ao mapa cromossômico confeccionado em câmara clara por Kastritsis (1966). Recentemente, Rohde, Garcia e colaboradores (Capítulo IV desta Tese) estudaram a evolução do braço cromossômico IIR entre as espécies do subgrupo da *D. willistoni* e semi-espécies de *D. paulistorum*, apresentando uma filogenia cromossômica para o subgrupo. O estudo revelou que existem poucas reorganizações cromossômicas entre as semi-espécies, de forma que a relação evolutiva entre elas é muito mais estreita do que aquela observada entre as espécies crípticas do subgrupo da *D. willistoni*. Os resultados obtidos demonstraram que os cromossomos politênicos são excelentes marcadores, capazes de esclarecer sobre os diferentes níveis de relacionamento filogenético entre as espécies desse subgrupo, formado de espécies crípticas, subespécies e semi-espécies.

No presente estudo apresentamos as relações evolutivas entre as semi-espécies de *D. paulistorum* obtidas a partir da análise do padrão de seqüências de bandas homólogas dos braços cromossômicos politênicos IIL, IIR e III, correspondentes aos elementos C, B e E, respectivamente. De acordo com Muller (1940), o cariótipo básico do gênero *Drosophila* seria correspondente a cinco elementos cromossômicos principais (cromossomos acrocêntricos), nomeados pelas letras de A a F.

Material e Métodos

Populações analisadas: As populações de *D. paulistorum* avaliadas no presente estudo estão citadas na Tabela 1. Foram analisadas 16 linhagens da semi-espécie Andino-

Brasileira e uma de cada uma das demais semi-espécies, exceto a semi-espécie Transicional que embora conste na Tabela 1 ainda não foi investigada.

Preparações citológicas: Para a preparação do material citológico, larvas das diferentes linhagens investigadas foram mantidas em baixa densidade a 17°C, em tubos contendo meio de cultura padrão (Marques et al. 1966), até atingirem o terceiro estágio de desenvolvimento. As glândulas salivares dessas larvas foram dissecadas em solução fisiológica (Ephrussi e Beadle 1936), fixadas em ácido acético 45% e coradas com orceína aceto-lática (orceína 2% diluída em 51% de ácido acético glacial, 34% de água destilada e 15% de ácido láctico a 85%). Os melhores núcleos foram fotografados em contraste de fase em Fotomicroscópio Zeiss, com filme Kodak Plus X-Pan. .

Comparação das bandas dos cromossomos politênicos: Como primeiro passo para a análise comparativa dos autossomos das semi-espécies de *D. paulistorum*, os cromossomos politênicos autossômicos das semi-espécies Centro-Americana, Amazônica, Orinocana e Interior foram fotografados e divididos em seções e subseções pelo critério de similaridade de bandas cromossômicas, respeitando as mesmas divisões apresentadas no fotomapa da semi-espécie Andino-Brasileira (Capítulo II desta Tese). A partir daí, foi possível estabelecer os “blocos” de homologia cromossômica entre as semi-espécies. Esses blocos foram delimitados por letras nos seus extremos basais e distais e coloridos diferentemente. A cor amarela foi utilizada para representar os blocos conservados entre todas as semi-espécies.

Resultados

A Figura 1 apresenta os resultados da análise comparativa do cromossomo II entre as semi-espécies de *D. paulistorum*. Observa-se que ambos os braços IIL e IIR desse

cromossomo apresentam regiões conservadas, ou seja, que não sofreram reorganização cromossômica. Essas regiões correspondem a uma grande porção da base e da região distal (IIL e IIR) e também a uma porção da região mediana (IIR). No braço cromossômico IIL, três blocos internos, que somados representam 73,76% do seu tamanho total, sofreram reorganização cromossômica entre as semi-espécies. A Figura 1A apresenta o fotomapa do braço IIL da semi-espécie Andino-Brasileira, juntamente com os blocos de reorganização cromossômica entre as semi-espécies (em diferentes cores). A representação esquemática dos arranjos presentes nas demais semi-espécies está também indicada, da mesma forma que os pontos de quebra das inversões que originaram cada um dos arranjos fixados nas semi-espécies. A análise comparativa do braço cromossômico IIL revelou que o arranjo da semi-espécie Andino-Brasileira (AB) é o mesmo da Orinocana (ORI) e que o arranjo da Interior (INT) é o mesmo da Centro-Americana (CA). Esses dois grupos de arranjos (AB/ORI e INT/CA) estão relacionados entre si pelo arranjo apresentado pela semi-espécie Amazônica (AM). O arranjo da AM é um arranjo intermediário, capaz de explicar o relacionamento cromossômico que existe entre AB/ORI e INT/CA através da ocorrência de duas inversões paracêntricas denominadas de inversão **o** (inv. IILo) e inversão **n** (inv. IILn). A inv. IILo relaciona-se ao arranjo AB/ORI e a inv. IILn se relaciona ao arranjo INT/CA.

Já o braço cromossômico IIR (Figura 1B) apresentou apenas dois blocos de reorganização cromossômica entre as semi-espécies, que somam 40% do tamanho total deste braço cromossômico. Do mesmo modo que o observado para o IIL, a seqüência de bandas cromossômicas do IIR foi novamente a mesma entre a AB e ORI. A mesma identidade também foi visualizada em relação ao padrão de bandas apresentado pelas semi-espécies Amazônica e Interior (AM/INT). O relacionamento entre AB/ORI e AM/INT se deve, provavelmente, à ocorrência da inversão **h** (inv. IIRh) no passado evolutivo das semi-espécies. Outra inversão fixada encontrada no IIR foi denominada de inversão **g** (inv. IIRg)

que, provavelmente, está envolvida no relacionamento cromossômico entre o arranjo AB/ORI com o arranjo CA.

Na Figura 2 está apresentada a análise da similaridade de bandas entre as semi-espécies de *D. paulistorum* feita para o cromossomo III, que revela a existência de três blocos conservados e quatro blocos de reorganização cromossômica. Três desses blocos estão próximos da região distal desse cromossomo, compreendendo 19,38% do cromossomo III. Conforme esquematizado na Figura 2, através da comparação do padrão de bandas foi possível estabelecer o relacionamento do arranjo AB/ORI com o arranjo CA, pela provável ocorrência da inversão **q** (inv. IIIq). O arranjo AB/ORI também está relacionado com o arranjo da Interior (INT) pela inversão **r** (inv. IIIr) e com o arranjo da Amazônica (AM) pela inversão **k** (inv. IIIk). Apenas no caso do cromossomo III, o arranjo compartilhado por AB/ORI se relaciona, ao mesmo tempo, com o arranjo das outras três semi-espécies (CA, INT e AM) sempre pela ocorrência de apenas uma inversão.

Discussão

No presente estudo, avaliamos a evolução cromossômica entre as semi-espécies de *D. paulistorum*, comparando o padrão de bandas dos cromossomos politênicos autossômicos (elementos B, C e E) que representam juntos, aproximadamente 64% do tamanho total do genoma da espécie.

Os dados obtidos até o momento, reforçam a idéia de Dobzhansky e Spassky (1959) de que cada semi-espécie estaria se diversificando a caminho de se tornar uma espécie plena. Semi-espécies em estágio inicial de divergência evolutiva podem fornecer informações cruciais sobre a base genética do isolamento reprodutivo, bem como sobre as forças evolutivas que promovem a especiação (Koop e Frank 2005). A especiação é, na

maioria dos casos, um processo contínuo de acúmulo de diferenças ao nível do desenvolvimento comportamental e/ou incompatibilidades ecológicas entre populações divergentes (Mayr 1963, Coyne e Orr 2004). As semi-espécies podem passar por um estágio no qual apresentam poucas diferenças genéticas e são apenas parcialmente isoladas reprodutivamente umas em relação às outras.

A análise comparativa do padrão de bandas dos politênicos autossômicos demonstrou que todas as semi-espécies são possíveis de serem identificadas ao nível cromossômico. O melhor cromossomo para esse propósito foi o III, já que o braço cromossômico IIL não permitiu diferenciar CA de INT e o braço IIR não foi capaz de diferenciar AM de INT (Figuras 1 e 2). As semi-espécies AB e a ORI são homoseqüenciais e não puderam ser diferenciadas ao nível dos cromossomos autossômicos (Figuras 1 e 2) e tão pouco em relação ao cromossomo X (braços XL e XR, dados não mostrados). Daí conclui-se que essas duas semi-espécies são homoseqüenciais. A estreita relação entre a AB e a ORI também foi indicada no trabalho de Gleason et al. (1998). Através da análise de 1,2 kb do gene *period* os autores verificaram que essas duas semi-espécies diferem por apenas uma mutação do gene. As semi-espécies CA, INT e Transicional (TR) agruparam-se em outro clado, sendo INT e TR as mais relacionadas, e a semi-espécie mais divergente foi a AM. Nossos dados, em conjunto com os resultados dos autores acima citados, apontam para a necessidade de reavaliar as semi-espécies AB e ORI, no sentido de verificar se o isolamento reprodutivo entre elas se mantém, uma vez que as últimas investigações nesse sentido foram realizadas na década de 1960 (Ehrman 1965). Vale salientar que casos de espécies homoseqüenciais para todo o complemento cromossômico já foram detectados em *Drosophila*, como o exemplo clássico de algumas espécies Havaianas (Carson e Yoon 1982). Carson (1970, 1971) sugere que espécies homoseqüenciais podem representar exemplos de uma rápida especiação alopátrica sem a ocorrência de grandes diferenças cromossômicas.

Muitos autores têm proposto que a especiação freqüentemente ocorre quando a população se torna fixada para um ou mais rearranjos cromossômicos que, em heterozigose, reduzem a adaptação (White 1978, King 1993). Neste sentido, White (1978) concluiu que os rearranjos cromossômicos “têm desempenhado um papel fundamental na maioria dos eventos de especiação”. No entanto, a generalização dessa pressuposição exige

cautela. Um exemplo é o caso das drosófilas do Hawaii onde especiação explosiva é acompanhada por uma baixa taxa de rearranjos cromossômicos (Carson et al. 1970). Estudos recentes têm apresentado um outro enfoque para o papel dos rearranjos cromossômicos no processo de especiação. Os rearranjos cromossômicos não seriam as causas do surgimento de novas espécies, mas um mecanismo que reforçaria o isolamento entre as espécies recentemente divergidas, suprimindo a recombinação e, por consequência, restringindo o fluxo gênico entre elas.

Mesmo sendo diferenciadas cromossomicamente, exceção já comentada para AB e ORI, as semi-espécies de *D. paulistorum* são muito menos reorganizadas do ponto de vista cromossômico do que as espécies crípticas do subgrupo da *D. willistoni* do qual fazem parte. Esse fato leva à pressuposição de que elas tenham divergido muito recentemente e/ou continuem a trocar genes por hibridação introgressiva. Os dados do presente estudo também foram corroborados por Rohde, Garcia e colaboradores (Capítulo IV desta Tese), através da análise do braço cromossômico IIR (elemento B de Muller), entre as espécies do subgrupo da *D. willistoni*, incluindo algumas das semi-espécies de *D. paulistorum* (AB, ORI, CA, e INT). Os dados levantados pelos autores citados acima, também indicaram que a CA seria a semi-espécie mais proximamente relacionada com as demais espécies do subgrupo. Garcia (2002) estudou a evolução do cromossomo II da semi-espécie AB de *D. paulistorum* em relação a sua críptica *D. willistoni*, revelando a existência de pelo menos oito inversões fixadas no braço IIL e quatro no braço IIR. Embora nossa análise até o momento, não tenha incluído a semi-espécie Transicional, a similaridade do padrão de bandas cromossômicas para todo o complemento dos autossomos demonstrou que as semi-espécies se relacionam pela ocorrência de apenas duas inversões em cada um dos dois braços do cromossomo II e pela presença de três inversões no cromossomo III.

Na presente investigação, o arranjo cromossômico da AB/ORI foi o que se relacionou mais diretamente com todas as demais semi-espécies de *D. paulistorum*, o que

poderia sugerir este arranjo como o mais primitivo dentre as semi-espécies. Essa constatação, no entanto, merece algumas considerações. Como já salientado, os estudos prévios de evolução cromossômica, envolvendo também as outras espécies do subgrupo da *D. willistoni* (Capítulo IV desta Tese) indicam a CA como a portadora do arranjo mais primitivo, ao mesmo tempo, entre as semi-espécies e entre as espécies do subgrupo *willistoni*. Isso poderá ser comprovado em futuras investigações, quando a análise dos autossomos estiver concluída para a semi-espécie Transicional, para as demais espécies do subgrupo da *D. willistoni* e, especialmente, para o cromossomo X, o mais diferenciado evolutivamente entre os cromossomos.

Os blocos de homologia detectados entre as semi-espécies para os cromossomos II e III revelaram uma maior conservação da região basal, sendo a maioria dos pontos de quebra das inversões localizados na região mais mediana do cromossomo no caso do II e na região mais distal no caso do cromossomo III. A constatação de que a distribuição dos pontos de quebra não é randômica ao longo do cromossomo foi feita por alguns autores. Novitski (1946), estudando o elemento cromossômico C de *D. pseudoobscura* e *D. atabasca*, verificou uma concentração de pontos de quebra de inversões na região distal do cromossomo. Roberts (1976), por sua vez, sugere que a concentração dos pontos de quebras das inversões cromossômicas, em várias espécies de *Drosophila*, seria devida, primariamente, à seleção natural, já que inversões nessa região seriam mais eficientes supressoras de recombinação e com isso manteriam mais fortemente unidos genes coadaptados.

È sabido que a fertilidade dentro de uma espécie diminui acentuadamente quando mais de um cromossomo é portador de inversões paracêntricas em estado heterozigoto (Cooper et al. 1955, Terzaghi e Knapp 1960). Considerando as semi-espécies da *D. paulistorum*, esta constatação poderia estar nos indicando a existência dessa forte barreira entre elas, uma vez que a ordem das bandas dos cromossomos autossômicos difere entre as semi-espécies pela presença de pelo menos uma inversão (exceto AB e ORI). Em

experimentos com *D. melanogaster*, Cooper et al. (1955) constataram um forte declínio na postura de ovos por fêmeas portadoras de mais de uma inversão, o que foi atribuído ao pareamento de cromossomos não homólogos seguido pela não disjunção dos cromossomos não recombinantes e a inviabilidade dos ovos devido a aneuploidias. Estudos similares revelaram que fêmeas de *D. pseudoobscura* sem inversões heterozigotas apresentaram um sucesso na eclosão dos ovos de 95%, as portadoras de uma inversão tiveram um sucesso de 93% e as portadoras de três inversões heterozigotas não ligadas apresentaram apenas 59% (Terzagui e Knapp 1960).

A supressão de recombinação, ocasionada pelos rearranjos cromossômicos, e o significado desse evento na especiação, apesar do fluxo gênico inter-específico, têm sido testada por Brown et al (2004). Esses autores avaliaram a base genética da esterilidade do híbrido em um par de subespécies simpátricas *D. pseudoobscura pseudoobscura* e *D. persimilis* e em um par de subespécies alopátricas *D. pseudoobscura bogotana* e *D. persimilis*. Todos os fatores de esterilidade apresentaram associação com três regiões invertidas no primeiro par de espécies e em regiões colineares no último par, indicando que a recombinação e a seleção natural podem ter eliminado fatores de esterilidade fora das regiões invertidas entre *D. p. pseudoobscura* e *D. persimilis*. Isso apoia a idéia de que os rearranjos cromossômicos podem facilitar a persistência da espécie apesar da ocorrência de hibridação. Uma vez que as relações dos rearranjos cromossômicos entre as semi-espécies de *D. paulistorum* estão sendo estabelecidas, o estudo dos fatores de esterilidade nesse contexto deve ser objeto de futuras investigações.

Referências bibliográficas

- Brown K, Burk L, Henagan L and Noor M, 2004. A test of the chromosomal rearrangement model of speciation in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 58:1856-1860.
- Burla H, Da Cunha AB, Cordeiro AR, Dobzhansky T, Malogolowkin C and Pavan C, 1949. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 3:300-314.
- Carson HL and Yoon JS, 1982. Genetics and evolution of Hawaiian *Drosophila*. In: The genetics and biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN, eds). London: Academic Press; 3b:298-344.
- Carson HL, 1970. Chromosome tracers of the origin of species. *Science* 168:1414-1418.
- Carson HL, 1971. Polytene chromosome relationships in Hawaiian species of *Drosophila*. *Univ Texas Publs Stud Genet* 6:183-191.
- Carson HL, Hardy DE, Spieth HT and Stone WS, 1970. The evolutionary biology of the Hawaiian *Drosophilidae*. In: *Essays in Evolution and Genetics in honor of Theodosius Dobzhansky* (Hecht MK and Steere WC, eds). New York: Evolutionary Biology; 437-543.
- Clayton FE and Guest WC, 1986. Overview of chromosomal evolution in the family *Drosophilidae*. In: The genetics and biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN, eds). London: Academic Press; 3e:1-38.
- Cooper KW, Zimmering S and Krivshenko JD, 1955. Interchromosomal effects and segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41:911-914.
- Coyne JA and Orr HA, 2004. *Speciation.*, Sunderland: Sinauer Associates.

- Dobzhansky T and Spassky B, 1959. *Drosophila paulistorum* a cluster of species in *statu nascendi*. Proc Natl Acad Sci U S A 45:419-428.
- Dobzhansky T and Spassky B, 1959. *Drosophila paulistorum* a cluster of species in *statu nascendi*. Proc Natl Acad Sci U S A 45:419-428.
- Ehrman L, 1965. Direct observation of sexual isolation between allopatric and between sympatric strains of the different *Drosophila paulistorum* races. Evolution 19:459-464.
- Ephrussi B and Beadle GW, 1936. A technique of transplantation for *Drosophila*. Am Nat 70: 218-225.
- Garcia ACL, 2002. Estudo da homologia cromossômica entre *Drosophila paulistorum* e *D. willistoni*. (Msc dissertation). Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Gleason JM, Griffith EC and Powell JR, 1998. A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: Conflicts between species concepts? Evolution 52:1093-1103.
- Heitz E and Bauer H, 1933. Cytologische Untersuchungen an Dipteren. Z Zellforsch Mikrosk Anat 17:67-82.
- Kastritsis CD, 1966. A comparative chromosome study in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. Chromosoma 19:208-222.
- King M, 1993. Species evolution. The role of chromosome change. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Koop A and Frank A, 2005. Speciation in progress? A continuum of reproductive isolation in *Drosophila bipectinata*. Genetica 125:55-68.
- Lakovaara S and Saura A, 1982. Evolution and speciation in the *Drosophila obscura* group. In: The genetics and biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN, eds). London: Academic Press; 3b:1-59.

- Lemeunier F, David JR, Tsacas L and Ashburner M, 1986. The melanogaster species group. In: The genetics and biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN, eds). London: Academic Press; 3e:148-256.
- Marques EK, Napp M, Winge H and Cordeiro AR, 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosoph Inf Serv* 41:187.
- Mayr E, 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge.
- Muller HJ, 1940. Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: The New Systematics (Huxley J, ed). Oxford: Clarendon Press; 185-268.
- Novitski E, 1946. Chromosome variation in *Drosophila athabasca*. *Genetics* 31:508-524.
- Painter TS, 1933. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* 78:585-586.
- Pérez-Salas S, Richmond RC, Pavlovsky O, Kastritsis CD, Ehrman L and Dobzhansky T, 1970. The Interior semiespecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 24:519-527.
- Roberts PA, 1976. The genetics of chromosome aberration. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* (Ashburner M and Novitski E, eds). London; New York: Academic Press; 67-184.
- Sturtevant AH and Dobzhansky T, 1936. Inversions in the third chromosome of wild races of *Drosophila pseudoobscura* and their use in the study of the history of the species. *Proc Natl Acad Sci USA* 22:448-450.
- Terzaghi E and Knapp D, 1960. Pattern of chromosome variability in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 14:347-350.
- White MJD, 1978. Modes of speciation. San Francisco, California: Freeman WH and Company.

Tabela 1. Populações e semi-espécies de *Drosophila paulistorum* investigadas.

População	Semi-espécie	Local da coleta	Coletor
ECU	Andino- Brasileira	Jaton Sacha, Equador	1
MÊS	Andino- Brasileira	Mesitas, Colômbia	2
MAN	Andino- Brasileira	Manaus, AM, Brasil	3
PAR	Andino- Brasileira	Belém, PA, Brasil	3
IQG	Andino- Brasileira	Ilha da Queimada Grande, SP, Brasil	4
RIB	Andino- Brasileira	Ribeirão Preto, SP, Brasil	5
JAI	Andino- Brasileira	São Paulo, SP, Brasil	4
MLC	Andino- Brasileira	Morro da Lagoa da Conceição, SC, Brasil	6
RAT	Andino- Brasileira	Ilha de Ratonas Grande, SC, Brasil	7
ITC	Andino- Brasileira	Itacorubi, SC, Brasil	8
TAV	Andino- Brasileira	Tavares, SC, Brasil	8
TAB	Andino- Brasileira	Serra do Tabuleiro, SC, Brasil	7
MSA	Andino- Brasileira	Porto Alegre (Morro Santana), RS, Brasil	9
RMT	Andino- Brasileira	Porto Alegre (Rua Mário Totta), RS, Brasil	9
PGK	Andino- Brasileira	Porto Alegre (Parque Gabriel Knijnik), RS, Brasil	9
JBO	Andino- Brasileira	Porto Alegre (Jardim Botânico), RS, Brasil	9
C2	Centro- Americana	Lancetilla, Honduras	2
T1	Transicional	Santa Marta, Colômbia	2
A28	Amazônica	Belém, PA, Brasil	2
O11	Orinocana	Georgetown, Guyana	2
I1	Interior	Llanos, Colômbia	2

Coletores: (1) Margaret Kidwell e Joana Silva, (2) Lee Ehrman and Yong Kyu Kim, (3) Marlúcia Martins, (4) Hermes Medeiros, (5) Cláudia Rohde, (6) Marco Gottschalk, (7) Daniela De Toni, (8) Hermes Schmitz, (9) Ana Lauer Garcia.

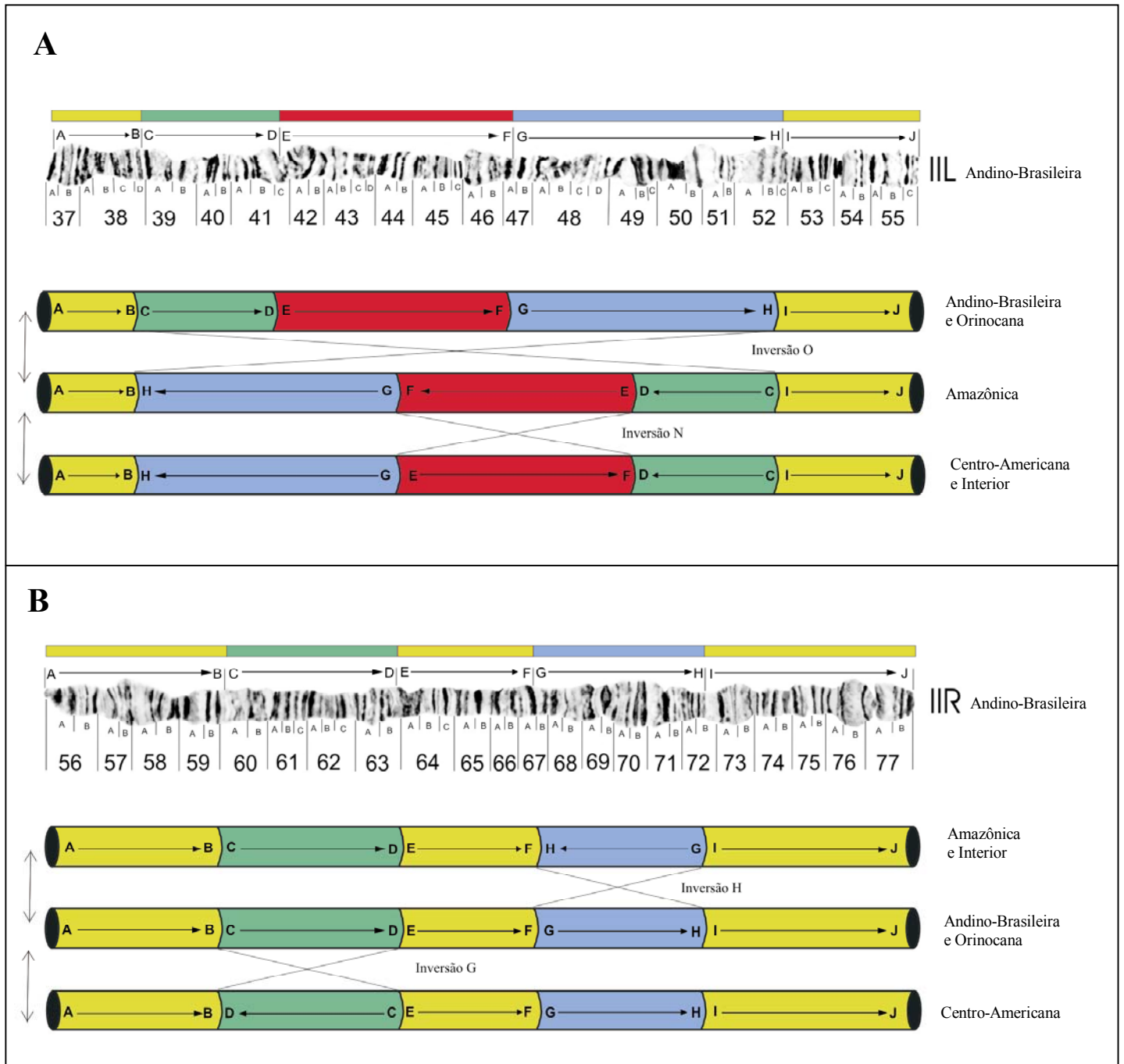


Figura 1. Evolução do cromossomo II de cinco semi-espécies de *D. paulistorum*. Sobre o fotomapa do braço IIL (A) e IIR (B) da Andino-Brasileira estão representados, com diferentes cores, os blocos de homologia cromossômica entre as cinco semi-espécies. O início e o fim de cada bloco estão indicados por letras. As linhas cruzadas entre os diferentes arranjos referem-se à ocorrência de inversões paracêntricas. As flechas indicam as direções das inversões responsáveis pela reorganização dos arranjos cromossômicos. Os blocos

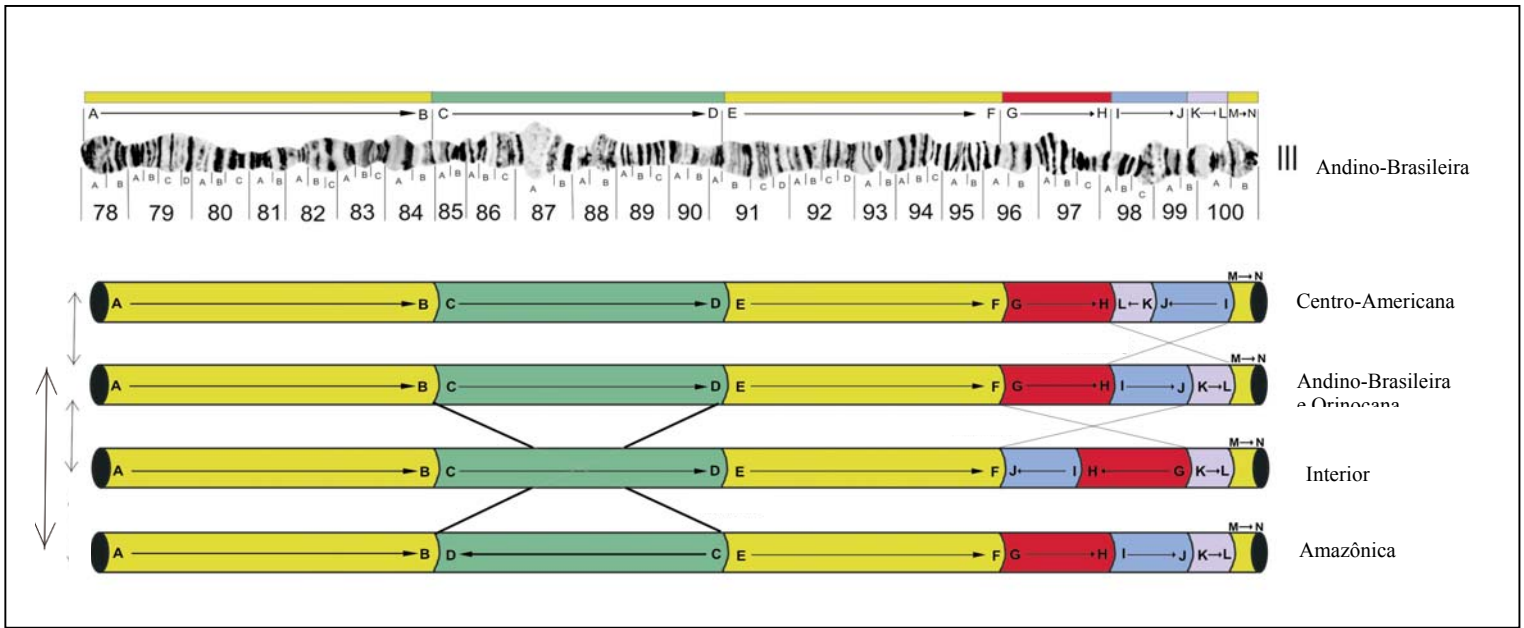


Figura 2. Evolução do cromossomo III de cinco semi-espécies de *D. paulistorum*. Sobre o fotomapa do braço III da Andino-Brasileira estão representados, com diferentes cores, os blocos de homologia cromossômica entre as cinco semi-espécies. O início e o fim de cada bloco estão indicados por letras. As linhas cruzadas entre os diferentes arranjos referem-se à ocorrência de inversões paracêntricas. As flechas indicam as direções das inversões

CAPÍTULO IV

Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B)

**Cláudia Rohde*, Ana Cristina Lauer Garcia*, Victor Hugo Valiati
and Vera Lúcia da Silva Valente**

*** Estas autoras contribuíram igualmente para a realização desse trabalho**

Trabalho publicado na revista *Genética*

CAPÍTULO V

Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through electrophoretical mobility of Acid phosphatase-1

**Ana Cristina Lauer Garcia, Cláudia Rohde, Grazia Fagundes Audino,
Vera Lúcia da Silva Valente and Victor Hugo Valiati**

Trabalho no prelo, a ser publicado na revista

Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research

¹*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;* ²*Laboratório de Biologia Molecular, Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.*

Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through electrophoretical mobility of Acid phosphatase-1

A. C. L. GARCIA¹, C. ROHDE¹, G. F. AUDINO¹, V. L. S. VALENTE¹ and V. H. VALIATI²

Abstract

The *Drosophila willistoni* group consists of twenty three species of which six are sibling species and belong to the *D. willistoni* subgroup: *D. willistoni*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis*, *D. pavlovskiana* and *D. paulistorum*. These sibling species are abundant in the Neotropical region and can hardly be differentiated by the usual taxonomic traits. Four of them (*D. willistoni*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis* and *D. paulistorum*) cover extensive geographic distribution areas overlapping in places while two of them are endemic (*D. insularis* and *D. pavlovskiana*). In this study we are presenting a method for the identification of five sibling species of the *D. willistoni* subgroup based on allozyme variation of Acid phosphatase-1 (*AcpH-1*) in polyacrilimide gel electrophoresis. Our work showed that *AcpH-1* allozyme differences can be used for species-diagnostic characterization. This method is shown to be a more efficient tool for species identification than others until now available because it is both quicker and produces reliably result in a shorter time. Key words: Acid phosphatase-1 – sibling species - *Drosophila willistoni*.

Introduction

The *Drosophila willistoni* group consists of twenty three species of which six are sibling and belong to the *D. willistoni* subgroup: *D. willistoni* Sturtevant 1921, *D. equinoxialis* Dobzhansky 1946, *D. tropicalis* Burla et al. 1949, *D. insularis* Dobzhansky et al. 1957, *D. pavlovskiana* Kastritsis and Dobzhansky 1967 and *D. paulistorum* Dobzhansky and Pavan (in Burla et al. 1949) which include six semispecies. This subgroup is one of the most outstanding and widespread groups of drosophilids in the Neotropical region and the cytological, morphological and behavioral aspects have been extensively studied. The species are so similar in their morphology that it is difficult to tell them apart by studying only the external morphology (Burla et al. 1949).

The geographic distribution of the species of *D. willistoni* subgroup overlaps in extensive areas but *D. pavlovskiana* and *D. insularis* are endemic in small defined places as shown by Kastritsis and Dobzhansky (1967) for *D. pavlovskiana* and Dobzhansky et al. (1957) for *D. insularis* – the former in Guyana and the latter on some islands of Lesser Antilles. The other four sibling species are sympatric from Guatemala, through Central America and northern of South America, down to central Peru and Brazil (Spassky et al. 1971; Dobzhansky and Powell 1975). *Drosophila willistoni* presents the widest geographical distribution in Neotropical regions. It is the dominant species in most hot and humid forests, despite the considerable seasonal fluctuations (Dobzhansky 1957; Da Cunha et al. 1959; Spassky et al. 1971). Its ecological versatility is clearly shown by the variable range of breeding sites successfully exploited, the most important of which are fermented fruits (Carson 1965; Valente and Araújo 1986). The *D. paulistorum* is in fact, a superspecies, comprising six morphologically indistinguishable semispecies: Andean-Brazilian, Centroamerican, Orinocan, Amazonian, Transitional (Dobzhansky and Spassky 1959) and Interior (Pérez-Salas et al. 1970). In many parts of tropical South America it is the second most abundant species of the *D. willistoni* subgroup. Individuals of different semispecies do not cross in nature when sympatric, thus behaving as completely isolated species. In the laboratory, however, they may, in some cases, produce hybrids. *Drosophila*

equinoxialis extends from central Mexico through Central America, the Greater Antilles, and the northern half of continental South America. *Drosophila tropicalis* is found from Central America to the center of South American continent. Although in recent years many authors have published a reasonable number of ecological studies with the *D. willistoni* subgroup (Tidon et al. 1994; De Toni and Hofmann 1995; Saavedra et al. 1995; Vilela and Mori 1999; Valiati and Valente 1996; Martins 2001; Medeiros and Klaczko 2004; Silva et al. 2005) only a few of these studies present the identification at the species level (Vilela and Mori 1999; Valiati and Valente 1996; Medeiros and Klaczko 2004). This fact is explained by the abundance of the sibling species in the collections, their extreme morphological similarity and the lack of a practical method for identification of the species. The methods currently used to separate the species of the *D. willistoni* subgroup are the inspection of external genitalia of males (Burla et al. 1949; Malogolowkin 1952; Spassky 1957), the detailed study of the band patterns of polytene salivary gland chromosomes (Rohde et al. 2006), intercrossing tests (Cordeiro and Winge 1995) and the analyses of the song produced by males during the courtship (Ritchie and Gleason 1995). However, these methods are very laborious to identify a large numbers of flies.

Here we present a method for the identification of five species of *D. willistoni* subgroup which is much more efficient than those traditionally used. This involves determining the allozyme variation of Acid phosphatase-1 (*Acph-1*, EC3.1.3.2) locus in polyacrilamide gel electrophoresis in a representative number of individuals. The results obtained prove that such measurements of *Acph-1* can distinguish between these sibling species in spite their great morphological similarity.

Materials and Methods

Fifty-three population samples of the *D. willistoni* subgroup (Table 1) were analyzed. Of these, 26 were of *D. willistoni* (including 5,148 individuals), 21 of *D. paulistorum* (904 individuals), four of *D. equinoxialis* (699 individuals), one of *D. tropicalis* (127 individuals) and one of *D. insularis* (132 individuals). Unfortunately we could not include *D. pavlovskiana* in the study because no sample strain was available from any of the suppliers of *Drosophila* stock. However, this has no great effect on the study results because this species is a rare endemic in Guyana. As indicated in Table 1, eight populations of *D. willistoni* and eight of *D. paulistorum* correspond to recently collected samples that were analyzed as isofemale lines making a total of 5,059 and 842 individuals of each species, respectively. The other populations correspond to laboratory stocks maintained as mass cultures for varying periods of time. There is no doubt about the identification of the species investigated. They were confirmed by the analysis of the banding patterns of the polytene chromosomes, examination of the genitalia and outcrosses with known species strains (data not shown).

TABLE 1

Adult individuals of both sexes were submitted to horizontal electrophoresis for *AcpH-1* enzyme. Each fly was individually macerated with a drop of distilled water. Electrophoresis of *AcpH-1* in acrylamide slab gels was carried out by adjusting the method described by Hüettel and Bush (1972). The 6% polyacrilamide gels, containing 95% of acrylamide and 5% bisacrylamide, were prepared with 80 ml buffer (composed by 0.038 M Tris and 0.0025 M citric acid pH 7.5.), 0.8 ml APS (Ammonium persulphate) and 0.08 ml TEMED (Sigma). The buffer in the electrode chamber contained 0.34 M Tris and 0.078 M

citric acid pH 7.5. The gel was subject to an electrophoretical run for approximately 4 hr at 20 V/cm and was stained with 0.05 g Fast Blue RR stain and 0.05 g Na α -naphthyl acid phosphate, diluted in 100 ml of 0.2 M acetate buffer pH 5.0, during 1.5 hr, at 37°C. The gel was pre-soaked in 0.25 M boric acid for 1 hr prior to staining. After the appearance of the enzyme bands, the reaction was stopped by washing the gel with water and adding the fixing solution of 5:5:1, methanol, water and acetic acid, respectively.

In each gel were used a minimum of three control flies of two species: *D. willistoni*, strain wilSPE, and *D. paulistorum*, strain pauRMT. They were used as a positive control of the gel conditions and as controls for the two more frequent homozygous allelic forms of *Acph-1*. Numbers were used to identify the different alleles and the *Acph-1* form for *D. willistoni* was considered the species standard and its allele was denominated *Acph-1*^{1.00}. The alleles of other species were designated by their relative mobility in relation to the standard *Acph-1*^{1.00}.

Results

Electrophoretic variations in the protein encoded by *Acph-1* locus were detected in 2,415 individuals, representing 53 populations of five sibling species of the *D. willistoni* subgroup. The optimal conditions for separation of the different alleles of *Acph-1* were obtained by adjusting the pH to 7.5 and the gel concentration to 6%. The genotypic variants detected for *Acph-1* and characteristic for the species studied were: *Acph-1*^{0.54/0.54}, *Acph-1*^{1.08/0.54} and *Acph-1*^{1.08/1.08} for *D. equinoxialis*, *Acph-1*^{0.64/0.64} for *D. tropicalis*, *Acph-1*^{1.00/1.00} for *D. willistoni*, *Acph-1*^{1.31/1.31} for *D. insularis* and *Acph-1*^{1.42/1.42} for *D. paulistorum*. All phenotypes are showed in the Figure 1. Uniquely, *D. equinoxialis*

presented two segregating alleles, *Acph-I*^{1.08} (fast) and *Acph-I*^{0.54} (slow). None of the allelic forms here described was shared with other species indicating that *Acph-I* can be used as a species-diagnostic enzyme. We found pairs of species with near migration alleles for *Acph-I* enzyme such as (i) *D. paulistorum* (*Acph-I*^{1.42}) and *D. insularis* (*Acph-I*^{1.31}) (ii) *D. tropicalis* (*Acph-I*^{0.64}) and *D. equinoxialis* (*Acph-I*^{0.54}). *Drosophila willistoni* (*Acph-I*^{1.00}) and *D. equinoxialis* (*Acph-I*^{1.08}) were the species with the closest migration of their allelic forms. However, even there the difference is still more than sufficient to clearly identify each species (see Figure 2).

FIGURES 1 and 2

The efficiency of our diagnostic method to identify species of the *D. willistoni* subgroup was also confirmed by the absence of intraspecific variation of the *Acph-I* allelic forms in each species. The two most exhaustively investigated species were *D. willistoni* and the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*. For *D. willistoni*, for example, we find the same allele *Acph-I*^{1.00} in all twenty six geographic populations studied, including 8 that were recently collected: wilIQG, wilMLC, wilRMT, wilPGK, wilJBO, wilPFA, wilITA, wilTER (see Table 1). In all, 5,059 individuals from parental or F1 generation were *Acph-I*^{1.00/1.00} (98.3% of all the *D. willistoni* samples). In the same way, between twenty one populations for Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, all were homozygous for *Acph-I*^{1.42}. Eight of these populations corresponded to recently collected strains (pauIQG, pauALC, pauMLC, pauITC, pauRMT, pauPGK, pauJBO, pauITA, see Table 1) or to 842 parental or F1 individuals.

Discussion

Despite the expressive number of individuals belonging to *D. willistoni* subgroup in Neotropical drosophilid communities, not much data is found in the literature about the frequency and the ecology of each of the species. Recent studies on population structure

and ecology of *Drosophila* species have demonstrated that the *D. willistoni* subgroup can represent up to 80% of collected specimens from the Amazon area (Martins 2001). In this way, methodologies that make it possible to distinguish rapidly between a large number of individuals of *D. willistoni* subgroup at the species level can be extremely important for a fuller comprehension of the ecological affinities of each species in particular.

The present study suggests a new methodology to identify species of *D. willistoni* subgroup based on the pattern of *Acph-1* enzyme because each sibling species has its own specific allelic form. This method has the advantage of being faster than other known methods permitting analysis of a larger number of individuals. The localization of the *Acph-1* gene in an autosomal chromosome is also favorable for species-specific identification in both sexes.

For many years, researchers have sought investigative methods to separate the sibling species of the *D. willistoni* subgroup. In this sense, Burla et al. (1949) found several minute morphological differences between sibling species and concluded that “*the variability is great enough to make identification of species in single individuals hazardous*”. A more detailed study of the genitalia of males of the *D. willistoni* subgroup was made by Malogolowkin (1952) that revealed several additional characteristics which help to differentiate the sibling species. Spassky (1957) described slight but consistent difference between the external male genitalia that allows a direct identification of single male individuals. Although the females are not themselves distinguishable, they can be identified by inspection of their male progenies. Nowadays this is a helpful auxiliary method in spite of being limited to one sex.

Since 1969, efforts have been made to detect one enzyme that could be used as species diagnostic for species of the *D. willistoni* subgroup. Ayala and his coworkers

studied for several years the pattern and the geographical variation of a large number of enzymes by electrophoresis starch gels in this subgroup of flies (review in Ayala 1975). However, between 36 loci investigated none conclusively identified the species. The *Acph-1* enzyme was also investigated for this purpose, but in contrast with our results the authors found in this loci alleles shared between more than one species of the *D. willistoni* subgroup. We believe that the reason of our success in conclusively distinguishing species using *Acph-1* enzyme can be explained by differences in our methodology as compared to that used by the former authors. For example, we used polyacrlamide gel and electrode buffers conditions adjusting the method describe by Huetell and Bush (1972) while the earlier investigators used starch gel with the methods ascribed to Poulik (1957) (see Ayala et al. 1972).

In relation to *D. paulistorum*, Richmond (1972a, b) found differences of *Acph-1* alleles between the semispecies and between different populations of each one. At this interspecific level, we always found the same allelic form (*Acph-1*^{1.42}) in all populations and semispecies tested. The best studied semispecies was the Andean-Brazilian with 904 individuals, 93% recently collected and analyzed as isofemale lines. Although only one sample of each Amazonian, Centroamerican, Interior, Orinocan and Transitional semispecies were studied here we are convinced that *Acph-1*^{1.42} is the pattern for *D. paulistorum*. Considering that semispecies of *D. paulistorum* are populations in the process of speciation, our results indicate that *Acph-1* enzyme diverged between the species of the *D. willistoni* subgroup but not at semispecies level.

Acknowledgments

This research was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul/FAPERGS and PROPESQ/UFRGS.

References

- Ayala, F. J., 1975: Genetic differentiation during the speciation process. *Evol. Biol.* **8**, 1-78.
- Ayala, F. J.; Powell, J. R.; Tracey, M. L.; Mourão, C. A.; Pérez-Salas, S., 1972: Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* **70**, 113-139.
- Burla, H.; Da Cunha, A. B.; Cordeiro, A. R.; Dobzhansky, T.; Malogolowkin, C.; Pavan, C., 1949: The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* **3**, 300-314.
- Carson, H. L., 1965: Chromosomal morphism in geographically widespread species of *Drosophila*. In: Baker, H. G.; Stebbins G. L. (eds.), *The Genetics of Colonizing Species*. New York and London: Academic Press, pp. 503-531.
- Cordeiro, A. R.; Winge, H., 1995: Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levine, L. (ed.), *Genetics of natural populations: The continuing importance of Theodosius Dobzhansky*. New York: Columbia University Press, pp. 262-280.

- Da Cunha, A. B.; Dobzhansky, T.; Pavlovsky, O.; Spassky, B., 1959: Supplementary Data on the chromosomal polymorphism in the *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* **13**, 389-404.
- De Toni, D. C.; Hofmann, P. R. P., 1995: Preliminary taxonomic survey of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) at Morro da Lagoa da Conceição; Santa Catarina Island, Brazil. *Revta Bras. Biol.* **55** (3), 347-350.
- Dobzhansky, T., 1946: Complete reproductive isolation between two morphologically similar species of *Drosophila*. *Ecology* **27**, 205-211.
- Dobzhansky, T., 1957: Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from central America and the west Indies. *Evolution* **11**, 280-293.
- Dobzhansky, T.; Ehrman, L.; Pavlovsky, O., 1957: *Drosophila insularis*, a new sibling species of the *willistoni* group. *Univ. Texas Publ.* **5721**, 39-47.
- Dobzhansky, T.; Powell, J. P., 1975: The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. In: King, R. C. (ed.), *Handbook of Genetics*. New York: Plenum Press, pp. 589-622.
- Dobzhansky, T.; Spassky, B., 1959: *Drosophila paulistorum*, a cluster of species in statu nascendi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**, 419-428.
- Hüettel, R. N.; Bush, G. L., 1972: Starch gel electrophoresis of tephritid proteins. In: Group on fruit flies (eds), *A manual of techniques*. International Biological Programme Press, pp.1-65.
- Kastritsis, C. D.; Dobzhansky, T., 1967: *Drosophila pavlovskiana*, a race of a species? *Amer. Midl. Nat.* **78**, 244-247.
- Malogolowkin, C., 1952: Sobre a genitália dos Drosophilidae (Diptera) III. Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Revta. Bras. Biol.* **12** (1), 79-96.

- Martins, M. B., 2001: Drosophilid fruit-fly guilds in forest fragments. In: Bierregaard, R. O.; Gascon, C.; Lovejoy, T. E.; Mesquita, R. (eds.), New Haven and London: Yale University Press, pp. 175-186.
- Medeiros, H. F.; Klaczko, L. B., 2004: How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forests of São Paulo, Brazil? Species lists of three forests remnants. *Biota Neotropica* **4(1)**, 1-12.
- Pérez-Salas, S.; Richmond, R. C.; Pavlovsky, O. A.; Kastritsis, C. D.; Ehrman, L.; Dobzhansky, T., 1970: The interior semispecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* **24**, 519-527.
- Poulick, M. D., 1957: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* **180**, 1477-1479.
- Richmond, R. C., 1972a: Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. III. Amounts of variability in the superspecies *Drosophila paulistorum*. *Genetics* **70**, 87-12.
- Richmond, R. C., 1972b: Genetic similarities and evolutionary relationships among the semispecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* **26**, 536-544.
- Ritchie, M. G.; Gleason, J. M., 1995: Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *J. Evol. Biol.* **8(4)**, 463-479.
- Rohde, C.; Garcia, A. C. L.; Valiati, V. H.; Valente, V. L. S., 2006 (*in press*): Chromosomal evolution of sibling species of *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B). *Genetica* **26**, 1-12.
- Saavedra, C. C. R.; Callegari-Jacques, S. M.; Napp, M.; Valente, V. L. S., 1995: A descriptive and analytical study of four neotropical drosophilid communities. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **33(2)**, 62-74.

- Silva, N. M.; Fantinel, C. C.; Valente, V. L. S.; Valiati, V. H., 2005: Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of Drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. *Neotropical Ent.* **34 (3)**, 363-374.
- Spassky, B., 1957: Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Univ. Texas Publs.* **5721**, 48-61.
- Spassky, B.; Richmond, R. C.; Perez-Salas, S.; Pavlovsky, O. A.; Mourao, C. A.; Hunter, A. S.; Hoenigsberg, H. F.; Dobzhansky, T.; Ayala, F. J., 1971: Geography of sibling species related to *Drosophila willistoni*, and the semi-species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* **25**, 129-143.
- Sturtevant, A.H., 1921: The North American species of *Drosophila*. *Publs. Carnegie Instn.* **301**, 1-50.
- Tidon, R.; Vilela, C. R.; Sene, F. M.; Pereira, M. A. Q. R., 1994: The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipo, State of Minas Gerais, Brazil. *Revta. Bras. Ent.* **38 (3-4)**, 627-637.
- Valente, V. L. S.; Araújo, A. M., 1986: Comments on breeding sites of *Drosophila willistoni* Sturtevant (Diptera, Drosophilidae). *Revta. Bras. Ent.* **30(2)**, 281-286.
- Valiati, V. H.; Valente, V. L. S., 1996: Observations on ecological parameters of urban populations of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan (Diptera, Drosophilidae). *Revta. Bras. Ent.* **40 (2)**: 225-231.
- Vilela, C. R.; Mori, L., 1999: The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipo: further notes. *Revta. Bras. Ent.* **43 (3-4)**, 319-328.

Authors' adress:

Ana Cristina Lauer Garcia (for correspondence, alauergarcia@yahoo.com.br), Cláudia Rohde (claudiarohde@yahoo.com), Grazia Fagundes Audino (gaia_ufrgs@gmail.com) and Vera Lúcia da Silva Valente (vera.gaiesky@ufrgs.br), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil. Victor Hugo Valiati (valiati@unisinós.br) Laboratório de Biologia Molecular, Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, 93022-000, Brazil.

Table 1. Species and populations of the *Drosophila willistoni* subgroup studied

Species	Semispecies	Population sample	Place of collection	Source
<i>D. willistoni</i>		wilAPA	Apazapan, Veracruz, Mexico	1
		wilPAR	Belém, PA, Brazil	2
		wilWIP	Salvador (Ipitanga), BA, Brazil	3
		wilCIP	Serra do Cipó, Santana do Riacho, MG, Brazil	4
		wilIQG*	Queimada Grande Island, SP, Brazil	5
		wilRIB	Ribeirão Preto, SP, Brazil	6
		wilMEL	Ilha do Mel Island, PR, Brazil	6
		wilISC	Santa Catarina Island, SC, Brazil	7
		wilARV	Arvoredo Island, SC, Brazil	7
		wilMLC*	Morro da Lagoa da Conceição, SC, Brazil	8
		wilCMP	Campeche Island, SC, Brazil	7
		wilRAT	Ratones Grande Island, SC, Brazil	7
		wilBEN	Bento Gonçalves, RS, Brazil	9
		wilDLA	Dois Lajeados, RS, Brazil	6
		wil17A2	Eldorado do Sul, RS, Brazil	9
		wilMSA	Porto Alegre (Morro Santana), RS, Brazil	10
		wilRMT*	Porto Alegre (Mário Totta Street), RS, Brazil	10
		wilPGK*	Porto Alegre (Gabriel Knijnik Park), RS, Brazil	10
		wilJBO*	Porto Alegre (Botanic Garden), RS, Brazil	10
		wilPFA*	Porto Alegre (Farroupilha Park), RS, Brazil	10
		wilITA*	Itapuã Park, Viamão, RS, Brazil	11
		wilSPE	São Pedro, Osório, RS, Brazil	3
		wilLAG	Laguna Negra, Rocha, Uruguay	12
	wilCOR	Coronilla, Uruguay	12	
	wilTER*	National Park Santa Teresa, Rocha, Uruguay	6	
	wilGUA	Guadeloupe Island, Lesser Antilles	13	
<i>D. paulistorum</i>	Andean Brazilian	pauECU	Jaton Sacha, Ecuador	1
	Andean-Brazilian	pauMES	Mesitas, Colombia	14
	Andean-Brazilian	pauMAN	Manaus, AM, Brazil	2
	Andean-Brazilian	pauPAR	Belém, PA, Brazil	2
	Andean-Brazilian	pauIQG*	Queimada Grande Island, SP, Brazil	5
	Andean-Brazilian	pauRIB	Ribeirão Preto, SP, Brazil	9
	Andean-Brazilian	pauJAI	São Paulo, SP, Brazil	5
	Andean-Brazilian	pauALC*	Alcatrazes Island, SP, Brazil	5
	Andean-Brazilian	pauMLC*	Morro da Lagoa da Conceição, SC, Brazil	8
	Andean-Brazilian	pauRAT	Ratones Grande Island, SC, Brazil	7
	Andean-Brazilian	pauITC*	Itacorubi, SC, Brazil	15
	Andean-Brazilian	pauMSA	Porto Alegre (Morro Santana), RS, Brazil	16
	Andean-Brazilian	pauRMT*	Porto Alegre (Mário Totta Street), RS, Brazil	10
	Andean-Brazilian	pauPGK*	Porto Alegre (Gabriel Knijnik Park), RS, Brazil	10
	Andean-Brazilian	pauJBO*	Porto Alegre (Botanic Garden), RS, Brazil	10
	Andean-Brazilian	pauITA*	Itapuã Park, Viamão, RS, Brazil	11
	Centroamerican	pauC2	Lancetilla, Honduras	14
	Transitional	pauT1	Santa Marta, Colombia	14
	Amazonian	pauA28	Belém, PA, Brazil	14
Orinocan	pauO11	Georgetown, Guyana	14	
Interior	pauI1	Llanos, Colombia	14	
<i>D. equinoxialis</i>		equAPA	Apazapan, Veracruz, Mexico	14
		equPAN	Panama	6
		equTEF	Tefé, AM, Brazil	3
		equHON	Honduras	13
<i>D. tropicalis</i>		tro0801.0	San Salvador, El Salvador	13
<i>D. insularis</i>		insSTK	Saint Kitts, Lesser Antilles	3

Number refer to the name of flies' collectors: (1) Margaret Kidwell, (2) Marlúcia Martins, (3) Antonio Cordeiro and Helga Winge, (4) Carlos Vilela, (5) Hermes Medeiros, (6) Claudia Rohde, (7) Daniela De Toni, (8) Marco Gottschalk, (9) Vera Valente, (10) Ana Lauer Garcia, (11) André Schnorr, (12) Beatriz Goñi, (13) Tucson Stock Center, (14) Lee Ehrman and Yong Kyu Kim, (15) Hermes Schmmitz, (16) Victor Hugo Valiati. * recently collected population samples.

Figure legends:

Figure 1. Zymogram of the phenotypic patterns of *AcpH-1* found in each one of the five species of *D. willistoni* subgroup. Different homozygous and heterozygous genotypes are indicated. The direction of migration of the protein is up toward the anode according to the arrow.

Figure 2. Differences in the phenotypic patterns of *AcpH-1* found in two species of the *D. willistoni* subgroup: *AcpH-1*^{1.08/0.54} for *D. equinoxialis* and *AcpH-1*^{1.00/1.00} for *D. willistoni*. The direction of migration of the protein is up toward the anode according to the arrow.

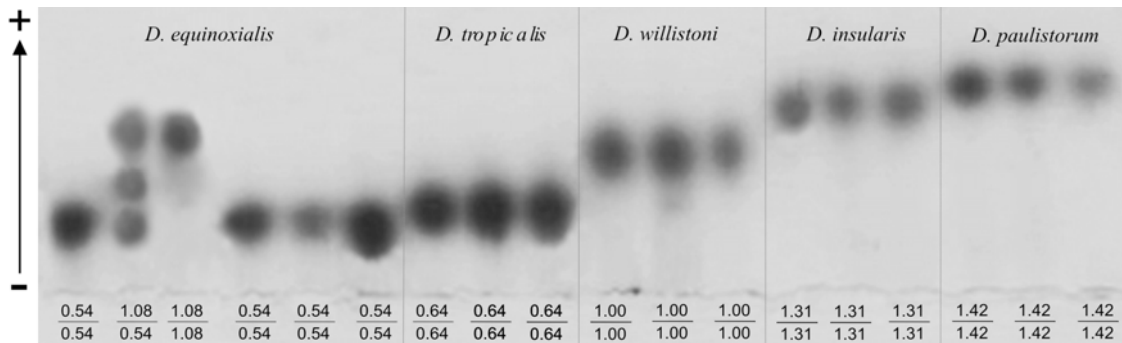


Figure 1

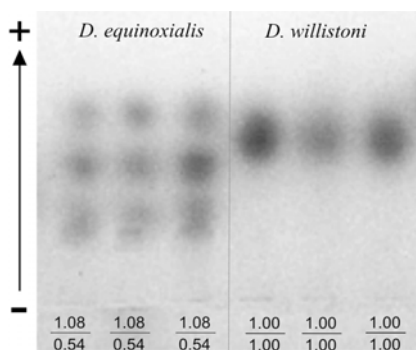


Figure 2

CAPÍTULO VI

Vinte anos de colonização do ambiente urbano de Porto Alegre, Sul do Brasil, pela *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae)

**Ana Cristina Lauer Garcia, Vitor Hugo Valiati, Marco Silva Gottschalk,
Cláudia Rohde & Vera Lúcia da Silva Valente**

Trabalho concluído, a ser submetido à *Biological Journal of the Linnean Society*

Vinte anos de colonização do ambiente urbano de Porto Alegre, Sul do Brasil, pela *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae)

Ana Cristina Lauer Garcia^{1*}, Victor Hugo Valiati², Marco Silva Gottschalk³, Cláudia Rohde¹ & Vera Lúcia da Silva Valente^{1,3}

1. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Caixa Postal 275, 93022-000, São Leopoldo, RS, Brasil.

3. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

***Autor para correspondência. E-mail: alauergarcia@yahoo.com.br**

Resumo

Embora *Drosophila paulistorum* não houvesse sido encontrada inicialmente em ambientes com interferência antrópica, a ocorrência dessa espécie no sítio urbano de Porto Alegre em 1985 sugeriu seu potencial de colonização de novos habitats e abriu amplas possibilidades para estudos evolutivos com essas populações. Nesse estudo foram realizadas coletas de *Drosophila* com o objetivo de acompanhar as variações nas populações de *D. paulistorum* nessa cidade, em pontos com diferentes níveis de urbanização, quase 20 anos depois de seu primeiro registro nesse ambiente. Os resultados apontam para uma diminuição

da capacidade colonizadora de *D. paulistorum* em Porto Alegre, evidenciada por uma queda da frequência desta espécie nos últimos anos. Este fato pode estar relacionado com o crescimento da cidade, assim como às retrações naturais que podem ocorrer no tamanho das populações relacionadas a mudanças climáticas, como por exemplo, variações nas temperaturas mínimas e máximas. Ainda, a recém introdução de espécies exóticas, como *Zaprionus indianus*, parecem contribuir com esse quadro, uma vez que estariam modificando as interações entre as espécies residentes e, como consequência, aumentando o contato e uma possível competição entre *D. willistoni* e *D. paulistorum*, que anteriormente utilizavam recursos tróficos diferenciados.

Palavras-chave: urbanização, colonização, *Drosophila paulistorum*, *Zaprionus indianus*.

INTRODUÇÃO

Drosophila paulistorum Dobzhansky & Pavan (1946) é uma superespécie constituída de seis raças ou semi-espécies (Dobzhansky & Spassky, 1959; Pérez-Salas *et al.*, 1970) membro do subgrupo da *D. willistoni*. Sua distribuição geográfica se estende desde a Guatemala até o sul do Brasil, onde prevalece a semi-espécie Andino-Brasileira que vive em simpatria com a sua espécie críptica *D. willistoni*. Em muitas partes da América tropical, *D. paulistorum* é a segunda espécie mais abundante do subgrupo da *D. willistoni* (Spassky *et al.*, 1971), composto também pelas espécies crípticas *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana*.

Até o estudo de Spassky *et al.* (1971), o limite mais ao sul da distribuição geográfica de *D. paulistorum* era o município de Osório (29°54'S; 51°16'W), Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Em maio de 1985, *D. paulistorum* foi encontrada pela primeira vez no ambiente urbano de Porto Alegre (30°02'S; 51°14'W), 90 km ao sul de Osório (Santos & Valente, 1990). Embora essa espécie fosse considerada como ausente em locais perturbados pelo homem (revisão em Ehrman & Powell, 1982) a ocorrência de *D. paulistorum* em Porto Alegre sugeriu seu potencial de colonização e abriu amplas possibilidades de estudos evolutivos com essas populações. Embora a definição de espécie colonizadora possa ser considerada arbitrária, devido ao fato de que toda espécie ocupa um território, esse termo tem sido usado para designar as espécies que invadem ambientes alterados, geralmente devido à ação antrópica (Mayr, 1965).

A importância dos estudos em ambientes urbanos reside no fato de que a urbanização faz com que organismos que habitavam ambientes naturais sejam expostos a novos fatores ecológicos. Entre esses fatores estariam a perda de áreas verdes e a poluição, resultante da atividade industrial do homem, que altera significativamente o ambiente, diminuindo a qualidade do ar, da água e dos recursos naturais (Marcus & Detwyler, 1972) e também alterando a composição dos organismos (Lucchese *et al.*, 2002). Assim, a partir das alterações ambientais resultantes da ação antrópica, durante os processos de urbanização são criados novos ecossistemas. Outra consequência importante da urbanização é a potencial eliminação de espécies nativas e a introdução de espécies exóticas. Sob esse aspecto, o estudo sistemático da fauna de Porto Alegre também propiciou a detecção da introdução recente do drosofilídeo *Zaprionus indianus* no ano 2000 (Castro & Valente, 2002). A chegada desta espécie invasora

parece estar promovendo ajustes nas estratégias de sobrevivência das espécies residentes, como sugerido recentemente por Silva *et al.* (2005a,b).

Existem poucos trabalhos com artrópodes no ambiente urbano, excluindo aqueles sobre controle de pestes ou epidemias (McIntyre, 2000). Embora os drosofilídeos se prestem para esse tipo de estudo, devido à sua abundância nas cidades, pouco ainda se conhece sobre como esses organismos são afetados pela urbanização (Kremen *et al.*, 1993; Valiati & Valente, 1996; Lucchese *et al.*, 2002), embora o uso de diferentes marcadores genéticos em populações urbanas de *D. willistoni* e *D. paulistorum* tenham revelado profundas modificações genéticas impostas pela urbanização sobre estas populações (Regner & Valente, 1993; Valente *et al.*, 1993; Valiati & Valente, 1997; Saavedra *et al.*, 2001). Tais estudos vêm contribuindo para o entendimento da adaptação de *Drosophila* na resposta aos diferentes gradientes ambientais, devido à importância do gênero como modelo para estudos do impacto da urbanização sobre a biodiversidade de espécies nativas (Parsons, 1991; Powell 1997; Avondet *et al.*, 2003; Gottschalk, 2004; Ferreira & Tidon, 2005).

Entre os anos de 1991 e 1992, Valiati & Valente (1996) realizaram um amplo estudo ecológico de *D. paulistorum* em Porto Alegre e verificaram que sua frequência havia aumentado desde seu primeiro registro nessa cidade. Tanto os trabalhos de Santos & Valente (1990) e Valiati & Valente (1996) indicaram a preferência de *D. paulistorum* por frutos exóticos como sítios de ovoposição e alimentação, enquanto *D. willistoni* preferia frutos nativos, sugerindo uma estratégia para evitar a competição entre as duas espécies. Neste trabalho, apresentamos o monitoramento da representatividade da *D. paulistorum* na área urbana de Porto Alegre, 20 anos depois de seu primeiro registro neste ambiente, a fim de contribuir para o entendimento de sua trajetória como uma espécie colonizadora.

MATERIAL E MÉTODOS

Moscas da família Drosophilidae foram coletadas durante o ano de 2004 em quatro locais da cidade de Porto Alegre (30°02'S, 51°14'W) com diferentes níveis de urbanização, de acordo com a proporção de áreas verdes e construídas estimada por Ruszczyk (1986): Parque Farroupilha (PFA), alto nível de urbanização (menos de 20% de cobertura vegetal e ocupada, principalmente, por edificações altas) e Jardim Botânico (JBO), Rua Mário Totta (RMT) e Parque Gabriel Knijnik (PGK), todos com baixo nível de urbanização (mais de 40% de cobertura vegetal e predomínio de casas e construções baixas). Foram feitas amostragens nos diferentes locais, durante três dias consecutivos, nos meses de Fevereiro (verão), Abril (outono), Julho (inverno) e Outubro (primavera), no período entre 8h e 11h da manhã. Dois métodos de amostragens foram empregados: 1) moscas adultas foram capturadas com rede entomológica sobre diferentes frutos em decomposição presentes nos locais, bem como sobre iscas de banana e de laranja colocadas no chão e cobertas com fermento biológico, sendo utilizados cinco quilos de cada tipo de isca; 2) frutos fermentados contendo moscas em estágios pré-adultos foram coletados e mantidos em laboratório em vidros contendo vermiculita, em câmara com temperatura e umidade controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60% de umidade relativa) por 12 a 17 dias. Depois desse período, os adultos emergidos foram

aspirados e transferidos para vidros com meio de cultura padrão (Marques *et al* 1966). A mesma quantidade de cada tipo de fruto foi utilizada em todas as amostragens. Os espécimes adultos foram identificados através de chaves de identificação e, em alguns casos, através da análise da genitália masculina. As espécies crípticas *D. paulistorum* e *D. willistoni* foram identificadas através da técnica de eletroforese da enzima Fosfatase ácida-1 (*AcpH-1*), de acordo com Garcia *et al.* (Capítulo V).

Para traçar os aspectos históricos dos 20 anos de colonização do ambiente urbano de Porto Alegre pela *D. paulistorum* foram considerados os registros numéricos e de frequências das espécies, descritos para os anos de 1986 e 1987 por Santos & Valente (1990) para os locais JBO e RMT, e os dados de 1991 e 1992 descritos por Valiati & Valente (1996) para PFA, JBO e RMT. Os dados de Santos e Valente (1990) contêm apenas as frequências de *D. paulistorum* e *D. willistoni*, sendo que as demais espécies não foram discriminadas e não puderam ser empregadas para algumas das análises. Para fins comparativos, também foram considerados os dados de coletas de drosofilídeos referentes aos anos de 2001 e 2002 descritos por Silva *et al.* (2005b). No entanto, como nesse último trabalho os indivíduos pertencentes ao subgrupo da *D. willistoni* não foram diferenciados, somente utilizamos esses dados nas análises em que as espécies *D. willistoni* e *D. paulistorum* foram agrupadas como subgrupo *willistoni*.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Comparação Múltipla de Kruskal-Wallis a fim de avaliar as variações das frequências das espécies nos diferentes locais e estações do ano, e o de Correlação de Spearman para verificar a influência da temperatura na frequência das espécies.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo de 2004, foram coletados 27.985 drosofilídeos nos locais de Porto Alegre amostrados (Tabela 1). *Drosophila simulans* (13.461 indivíduos), *Zaprionus indianus* (5.946 indivíduos) e *D. willistoni* (4.365 indivíduos) foram as espécies mais abundantes e, juntas, representaram 85% dos indivíduos coletados. *Drosophila paulistorum*, com 246 indivíduos capturados, representou apenas 0,9% do total de drosofilídeos.

Na Tabela 2 estão apresentados os dados das coletas de drosofilídeos realizadas em Porto Alegre durante o ano de 2004, acrescidos dos dados obtidos por Santos & Valente (1990) e Valiati & Valente (1996), para os locais de coletas coincidentes. As amostras foram divididas por locais (com seus respectivos níveis de urbanização), por ano de coleta e por estação do ano. Os recursos tróficos utilizados na captura dos indivíduos foram separados em duas categorias: os nativos, correspondentes aos frutos de plantas neotropicais e, os exóticos. Observa-se que nos anos anteriores a 2004, *D. paulistorum* sempre foi coletada em maior frequência que *D. willistoni* em frutos exóticos, como *Averrhoa carambola* e *Maclura pomifera*, e que *D. willistoni* sempre foi mais coletada em frutos nativos, como *Syagrus romanzoffiana*. Em 2004, observa-se que *D. paulistorum* praticamente não utilizou frutos nativos e seguiu preferindo alguns frutos exóticos, como *Eriobotrya japonica* (primeiro registro), onde a espécie apresentou uma frequência superior àquela encontrada para *D. willistoni* (28,4% e 5,4%, respectivamente). Entretanto, no caso do fruto exótico de *A. carambola*, houve uma grande alteração em relação ao que vinha sendo registrado em anos anteriores e as frequências de *D. paulistorum* foram quase sempre inferiores às de *D. willistoni*

(exceto na primavera na RMT quando *D. paulistorum* chegou a 28,5%, superando levemente a da *D. willistoni*, de 23,3%). É possível que esse deslocamento de *D. willistoni* para os frutos exóticos tenha interferido nas freqüências observadas de *D. paulistorum*. Além disso, pode ser também resultante da pressão exercida pela *Z. indianus* na utilização dos recursos disponíveis, uma vez que, dos 14 recursos vegetais avaliados, a espécie só não foi encontrada em um deles (*E. japonica*).

A Figura 1 apresenta um gráfico comparativo das freqüências médias de *D. paulistorum*, *D. willistoni*, *Z. indianus* e demais espécies de drosofilídeos, coletados entre os anos de 1986 e 2004 nos locais JBO e RMT, igualmente avaliados no período. O panorama que emerge da análise dos dados sugere que *D. paulistorum* iniciou com sucesso a colonização de Porto Alegre, entre os anos de 1986 e 1987, com uma freqüência média inicial de 11%, manteve sua freqüência na amostragem feita cinco anos depois (13%), mas sofreu uma forte retração em 2004, alcançando a freqüência de 1,4%. Também na Figura 1 pode-se notar que a espécie *Z. indianus* não foi encontrada nas coletas feitas entre 1986 e 1992. Na verdade, essa espécie foi registrada pela primeira vez em Porto Alegre somente no ano de 2000 (Castro & Valente, 2001). Trata-se de uma espécie invasora de origem africana que vem colonizando muito rapidamente o território brasileiro (De Toni *et al.*, 2001; Tidon *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005 a,b) e a América do Sul (Goñi *et al.*, 2001), desde sua descoberta no Estado de São Paulo em março de 1999 (Vilela, 1999). A análise de coletas de drosofilídeos em Porto Alegre, feitas regularmente durante os anos de 2001 e 2002, sugeriu que a chegada de *Z. indianus* estaria promovendo ajustes nas estratégias de sobrevivência das espécies residentes (Silva *et al.*, 2005a,b). Os dados de 2004 sugerem que uma das espécies afetada pode ser a *D. paulistorum*,

já que antes do aparecimento de *Z. indianus*, ela era bem representada no ambiente urbano (Valiati & Valente, 1996).

Na Figura 2 estão representadas as frequências médias dos drosofilídeos coletados entre os anos de 1986 e 2004 na cidade de Porto Alegre, independentemente do local, estação do ano e recurso trófico coletado. Os subgrupos mais representativos coletados no período foram o da *D. melanogaster* (representado principalmente pela *D. simulans*, com mais de 90%), o da *D. willistoni* (*D. willistoni* e *D. paulistorum*), a espécie *Z. indianus* e um grande grupo formado pelas demais espécies. Chama a atenção o fato do subgrupo da *D. melanogaster* apresentar uma oscilação de frequência inversa ao da espécie *Z. indianus*. Assim, em 1991, quando não havia registro de *Z. indianus* em Porto Alegre, esse subgrupo representava 75,5% do número total de indivíduos coletados. Em 2001, essa frequência foi reduzida para 16,7%, enquanto que a frequência da *Z. indianus* aumentou para 44,2%. Nova situação de inversão de frequências foi observada em 2004, quando ocorreu uma recuperação da frequência do subgrupo da *D. melanogaster* (49%) acompanhada da diminuição da frequência da *Z. indianus* (21%). É muito provável que ocorra forte competição entre estes dois grupos de espécies. Por outro lado, as oscilações de frequência do subgrupo da *D. willistoni* foram pequenas quando comparadas com as do subgrupo da *D. melanogaster*.

A presença de *Z. indianus* parece não afetar a frequência do subgrupo da *D. willistoni* como um todo, uma vez a frequência desse subgrupo em 2004 foi de 17%, muito similar àquela registrada durante o ano de 1991, 14,2%, uma década antes da entrada da *Z. indianus* em Porto Alegre. Entretanto, isso não significa que as variações das frequências de cada uma das espécies do subgrupo (*D. willistoni* e *D. paulistorum*) se mantiveram constantes antes e depois da invasão de *Z. indianus*. Conforme demonstrado na Figura 3, *D. willistoni* foi mais

freqüente em 1986, 1987 e 2004, enquanto que *D. paulistorum* foi bem mais freqüente em 1991 e 1992.

Variações anuais nas freqüências de diversos grupos de insetos também foram observadas por Wolda (1992) em um estudo de 14 anos em uma floresta no Panamá. O autor verificou que algumas populações foram notavelmente estáveis, enquanto outras flutuaram amplamente, sendo que algumas espécies extinguiram-se, enquanto outras, que eram inicialmente raras ou ausentes, tornaram-se abundantes. Deste modo, o monitoramento em longo prazo das comunidades de drosofilídeos de Porto Alegre é fundamental para a avaliação da tendência de alternância da representatividade de *D. willistoni* e *D. paulistorum* dentro do subgrupo *D. willistoni*. No presente estudo, está sendo possível detectar as oscilações da freqüência de *D. paulistorum* em Porto Alegre, antes e depois da chegada da espécie invasora *Z. indianus*. Entretanto, os dados permitem sugerir que a baixa freqüência de *D. paulistorum* em 2004 pode ter associação indireta com a presença de *Z. indianus*, e interação direta (ou competição) com a *D. willistoni*.

Na Figura 4 estão representadas as freqüências de *D. paulistorum* e de *D. willistoni* durante os anos de 1986 a 1992 em três locais da cidade de Porto Alegre com diferentes níveis de urbanização. Observamos que *D. paulistorum* está distribuída diferencialmente nesses ambientes, ocupando preferencialmente os locais de baixa urbanização, principalmente RMT, onde o número de indivíduos coletados foi significativamente maior em comparação com o JBO ($Z = 2,98$, $p < 0,01$) e com o PFA ($Z = 2,08$, $p < 0,05$). A Figura 5 apresenta os dados de freqüência de *D. paulistorum* nas coletas feitas em 2004 nos mesmos locais avaliados em anos anteriores (PFA, JBO, RMT), incluso também o local PGK, avaliado por Silva *et al* (2005b). Observamos que o padrão de distribuição das freqüências de *D. paulistorum* entre locais de

baixa urbanização tem se mantido constante durante o ano de 2004 (Figura 5). Entretanto, depois de quase 20 anos, uma redução significativa da representatividade dessa espécie foi observada em todos os ambientes estudados (Figuras 4 e 5). A análise estatística de Kruskal-Wallis revela redução significativa de *D. paulistorum* no PFA ($Z = 3,16$, $p < 0,01$) no JBO ($Z = 3,24$, $p < 0,01$) e na RMT ($Z = 4,44$, $p < 0,01$) ao longo de 2004. Chama a atenção que a espécie havia sido anteriormente amostrada na RMT com frequência de até 43,3% (Tabela 2).

A redução da frequência de *D. paulistorum* pode estar associada a vários fatores, como por exemplo, ao crescimento de Porto Alegre desde a década de 1980, o que alteraria os níveis de urbanização desde sua primeira classificação por Ruszczyk (1986). Provavelmente, a área onde está localizado o JBO, onde foram construídos novos prédios de grande porte e aberta uma larga avenida, deva ser considerada atualmente, como um local de média urbanização, enquanto os pontos RMT e PGK ainda seriam áreas de baixa urbanização.

Ao contrário do observado para *D. paulistorum*, entretanto, as possíveis alterações dos níveis de urbanização em Porto Alegre não vêm afetando significativamente as frequências de *D. willistoni* ($p > 0,05$), uma vez que esta espécie ocupa igualmente os diferentes pontos de coleta desde 1986. Dobzhansky (1965) havia comparado *D. willistoni* e *D. paulistorum* quanto as suas capacidades de explorar novos ambientes, sugerindo que das duas, apenas a *D. willistoni*, pelas suas características genéticas, teria algumas tendências para se tornar uma espécie colonizadora. Embora essa idéia tenha sido contradita pelos dados de Santos & Valente (1990) e Valiati & Valente (1996), obtidos quando *D. paulistorum* estava em franca expansão, nossos achados atuais nos levam a reconsiderar a sugestão de Dobzhansky (1965), já que *D. paulistorum* passou a ser encontrada apenas em ambientes pouco urbanizados.

Como *D. willistoni*, *Z. indianus* foi encontrada em todos os ambientes e recursos tróficos estudados em Porto Alegre o que evidencia seu sucesso como invasora na cidade (Figura 5). Ferreira & Tidon (2005), estudando o potencial de colonização de drosofilídeos em ambientes com diferentes níveis de urbanização na cidade de Brasília, encontraram resultados similares para *Z. indianus*.

Dentre os locais avaliados no presente estudo, merece especial atenção PGK, onde foram registradas as menores frequências de *Z. indianus*. Essa diferença, no entanto, apenas foi estatisticamente significativa quando comparada com o local de maior urbanização, PFA ($Z= 3,06$, $p < 0,01$). Dentre os locais estudados, PGK apresenta como diferencial algumas zonas de mata fechada que poderiam justificar a redução de *Z. indianus*. No Brasil Central, Tidon *et al.* (2003) encontraram maior abundância dessa espécie em ambientes perturbados, limitados às regiões mais externas de matas de galeria. Recentemente, Döge (2006) observou um claro efeito de borda em uma região de Mata Atlântica de Joinville, Estado de Santa Catarina, onde *Z. indianus* permaneceu restrita a locais mais próximos dos limites da mata, não se estabelecendo no interior da floresta. Ferreira & Tidon (2005) verificaram que a maioria das espécies endêmicas de Drosophilidae não é capaz de colonizar ambientes urbanos, concluindo, assim como Avondet *et al.* (2003), que algumas espécies dessa família podem detectar não apenas alterações do ambiente, pela sua presença ou ausência, mas também o seu grau de distúrbio, pela sua frequência. Dessa forma, essas espécies atuam como eficientes indicadores de mudanças ecológicas provocadas pela urbanização.

A Figura 6 apresenta as oscilações das frequências de *Z. indianus* e do subgrupo da *D. willistoni*, assim como as médias das temperaturas máximas e mínimas com seus respectivos desvios padrões, durante as estações dos anos de 2001, 2002 e 2004 na cidade de Porto

Alegre. Nos anos de 2001 e 2002 a frequência do subgrupo da *D. willistoni* diminuiu significativamente ($r = -0,91$, $p < 0,01$) naquelas estações do ano em que a frequência de *Z. indianus* aumentou, o que não ocorreu, entretanto, em 2004 ($r = 0,60$, $p > 0,05$). O aumento de *Z. indianus* correspondeu às estações do verão e primavera, quando as temperaturas médias foram mais elevadas. Contudo, verifica-se que as maiores frequências de *Z. indianus* estão mais correlacionadas com as médias das temperaturas mínimas ($r = 0,61$, $p < 0,01$) do que com as médias das máximas ($r = 0,32$, $p > 0,05$) e, quando são consideradas as temperaturas médias, estas correlações nem sempre ocorrem. Por exemplo, somente em 2002 encontrou-se uma correlação entre as temperaturas médias e as maiores frequências de *Z. indianus* ($r = 0,99$, $p > 0,01$). Tidon *et al.* (2003) não encontraram correlação de *Z. indianus* com as temperaturas médias e Tidon (2006) encontrou correlação significativa, porém baixa, com esse fator em alguns dos locais de estudo na região do Cerrado brasileiro. Assim, as temperaturas médias não refletem o que ocorre com os extremos de temperatura (mínimas e máximas), os quais podem ser mais críticos para as populações de drosofilídeos. Portanto, temperaturas baixas seriam um fator limitante do tamanho populacional de *Z. indianus*, como ocorreu nos invernos e, em especial, no ano de 2004, onde as temperaturas mínimas foram as menores registradas. Do mesmo modo, as frequências do subgrupo da *D. willistoni* também são influenciadas pela temperatura na cidade de Porto Alegre. No entanto, diferentemente do verificado para *Z. indianus*, esse subgrupo apresentou uma correlação negativa com as temperaturas máximas ($r = -0,72$, $p < 0,01$), tendo as menores frequências nas estações de temperaturas mais elevadas.

Comparando-se a proporção de *D. paulistorum*, *D. willistoni*, *Z. indianus* e das demais espécies durante as estações do ano de 2004, independente do local de coleta (Figura 7), observamos que as frequências de *D. paulistorum* oscilaram pouco nas diferentes estações:

2,2% na primavera, 0,8% no outono, 0,2% no verão e 0,1% no inverno. *Drosophila willistoni* e *Z. indianus*, por sua vez, atingiram suas menores frequências (3,4% e 3,5%, respectivamente) na primavera, e suas populações sofreram grande expansão no outono (22,7% e 43,1%, respectivamente). Apesar disso, ao contrário de *D. willistoni* e *Z. indianus*, em nenhuma estação obteve-se números expressivos de *D. paulistorum*. Estas flutuações sazonais são comuns em comunidades de drosofilídeos frugívoros e já foram descritas por vários autores (Dobzhansky & Pavan, 1950; Pavan, 1959; Saavedra *et al.*, 1991; De Toni & Hofmann, 1995; Tidon *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005b).

Finalmente, a expressiva redução do tamanho populacional de *D. paulistorum* nos últimos anos é refletida também em termos de polimorfismo para inversões cromossômicas. No trabalho de Santos & Valente (1990), o número de inversões cromossômicas detectadas nas populações de Porto Alegre foi de 18, e posteriormente, Valiati & Valente (1997) constataram a presença de 23 arranjos em heterozigose, dos quais apenas seis foram encontrados pelos primeiros autores. A análise atual do polimorfismo cromossômico das amostras de *D. paulistorum* dessa cidade (Capítulo II desta Tese) revelou a presença de apenas três inversões cromossômicas em heterozigose.

Nossos dados parecem estar apontando para uma diminuição do potencial colonizador de *D. paulistorum* em Porto Alegre, evidenciada pela queda da frequência desta espécie nos últimos anos. Este fato pode estar relacionado com o crescimento da cidade, assim como às retrações naturais que podem ocorrer no tamanho das populações. Estas retrações também podem estar relacionadas a mudanças climáticas, como por exemplo, variações nas amplitudes de temperaturas mínimas e máximas. Ainda, a presença de *Z. indianus*, parece contribuir com esse quadro, uma vez essa espécie estaria modificando as interações entre as espécies

residentes e, como consequência, aumentando o contato e uma possível competição entre *D. willistoni* e *D. paulistorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AVONDET, J. L.; BLAIR, R. B.; BERG D. J. & EBBERT, M. A. 2003. *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. **Environmental Entomology** **32**: 347-358.

BELO, M. & OLIVEIRA-FILHO, J. J. 1976. Espécies domésticas de *Drosophila*. V: Influências de fatores ambientais no número de indivíduos capturados. **Revista Brasileira de Biologia** **36**: 903-909.

CASTRO, F. L. & VALENTE, V. L. S. 2001. *Zaprionus indianus* is invading Drosophilidae communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Dros. Inf. Serv.** **84**: 15-16.

CHASSAGNARD, M. T. & TSCAS, L. 1993. Le sous-genre *S.* Str. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe *vittiger* (Diptera, Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France** (N. S.) **29** (2): 173-194.

DE TONI, D.C.; HOFMANN, P.R.P. & VALENTE, V.L.S. 2001. First register of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in the state of Santa Catarina. **Biotemas** **14** (1): 71-85.

- DOBZHANSKY, T. 1965. "Wild" and "domestic" species of *Drosophila* In: **The Genetics of colonizing Species**. BAKER, H. B. & STEBBINS, G. L. eds. Academic Press, New York, P. 533-546.
- DOBZHANSKY, T. & SPASSKY, B., 1959. *Drosophila paulistorum*, a cluster of species in *statu nascendi*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **45**: 419-428.
- DÖGE, J.S. 2006. Avaliação da variação temporal e microgeográfica e da influência do efeito de borda em assembléias de drosofilídeos de uma região de Mata Atlântica no norte e Santa Catarina, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- EHRMAN, L.& POWELL, J. R. 1982. The *Drosophila willistoni* species group. In: **The Genetics and Biology of Drosophila**. ASHBURNER, M.; CARSON, H. L. & THOMPSON, JR., J. N. eds. New York, Academic Press, New York. vol 3b p. 193-225.
- FERREIRA, L. B. & TIDON, R. 2005. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Biodiversity and Conservation** **14**: 1809-1821.
- FREIRE-MAIA, N. & PAVAN, C. 1949. Introdução ao estudo da drosófila. **Cultus** **5** (1): 1-70.
- GARCIA, A.C.L., GOTTSCHALK, M.S., AUDINO, G.F., ROHDE, C., VALIATI, V.H. & VALENTE, V.L.S. 2005. First evidence of *Drosophila malerkotliana* in the extreme South of Brazil (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). **Dros. Inf. Serv.** **88**: 28-30.

- GOÑI, B., MARTINEZ, M. E. & DAGUER P. 1997. Studies of two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. *Revista Brasileira de Entomologia* 41: 89-93.
- GOÑI, B., FRESIA, P., CALVIÑO, M., FERREIRO, M.J.; VALENTE, V.L.S. & Basso da Silva, L. 2001. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in southern localities of Uruguay. **Dros. Inf. Serv.** 84: 61-64.
- GOTTSCHALK, M.S. 2004. Influência da urbanização sobre assembléias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- KREMEN, C.; COLWELL, R. K.; ERWIN T. L.; MURPHY, D. D.; NOSS; R. F. & SANJAYAN, M. A. 1993. Terrestrial arthropod assemblages – their use in conservation planning. **Conserv. Biol.** 7: 796-808.
- LEÃO, B.F. & TIDON, R. 2004. Newly invading species exploiting native host-plants: the case of the African *Zaprionus indianus* (Gupta) in the Brazilian Cerrado (Diptera, Drosophilidae). **Ann. Soc. Entomol. Fr.** 3-4: 285-290.
- LEVINS, R. 1968. **Evolution in Changing Environments**. Princeton, Princeton University Press. 120p.
- LIEBHOLD, A. M.; MacDONALD, W. L.; BERGDAHL, D.; & MAESTRO, V. C. 1995. Invasion by exotic forest pests – a threat to forest ecosystems. **Forest Science** 41: 1-49. Suppl.

- MARCUS, M. G. & DETWYLER, T. R. 1972. Urbanisation and environment in perspective:
In Detwyler, T. R. & Marcus, M. G. (eds). Urbanisation and Environment – The physical
geography of the city. Duxbury, Belmont: 3-25.
- MARQUES, E.K.; NAPP, M.; WINGE, H. & CORDEIRO, A.R. 1966. A corn meal, soybean
flour, wheat germ medium for *Drosophila*. **Dros. Inf. Serv.** **41**: 187.
- MAYR, E. 1965. Summary In: **The Genetics of Colonizing Species**. BAKER, H. B. &
STEBBINS, G. L. eds. Academic Press, New York,. P. 553-562.
- MCCOY, C. E. 1962. Population ecology of common species of *Drosophila* in Indiana.
Journal of Economic Entomology **55**: 978-985.
- MCINTYRE, N. E. 2000. Ecology of urban arthropods: a review and a call to action. **Annals
of Entomological Society of America** **93**: 825-835.
- PARSON, P. A. 1987. Features of colonizing animals: phenotypes and genotypes. In:
Colonization, Succession and Stability. GRAY, A. J.; CRAWLEY, M. L. &
EDWARDS, P. J. eds. Blackwell, Oxford, U. K. p. 133-154.
- PARSONS, P. A. 1982. Evolutionary ecology of Australian *Drosophila* a species analysis.
Evolutionary Biology **14**: 297-350.
- PARSONS, P. A. 1991. Biodiversity conservation under global climatic change: the insect
Drosophila as biological indicator? **Global Ecology and Biogeography** **1**: 77-83.
- PÉREZ-SALAS, S.; RICHMOND, R. C.; PAVLOVSKY, O. A.; KASTRITSIS, C. D.;
EHRMAN, L. & DOBZHANSKY, T., 1970. The interior semispecies of *Drosophila
pauistorum*. **Evolution** **24**: 519-527.

- POWELL, J. R. 1997. Progress and prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila Model*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- RUSZCZYK, A. 1986. Análise da cobertura vegetal da cidade de Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Botânica** **9**: 225-229.
- SANTOS, R. A. & VALENTE, V. L. S. 1990. On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae) in an urban environment: ecological and cytogenetic observations. **Evolución Biológica** **4**: 253-268.
- SCHOENER, T. W. 1970. Non-synchronic spatial overlap of lizards in patchy habitats. **Ecology** **51**: 408-418.
- SHORROCKS, B. 1977. Ecological classification of European *Drosophila* species. **Oecologia** **26**: 335-345.
- SILVA, N. M.; FANTINEL, C. C.; VALENTE, V. L. S. & VALIATI, V. H. 2005a: Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of Drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. **Neotropical Entomology** **34** (3): 363-374.
- SILVA, N. M.; FANTINEL, C. C.; VALENTE, V. L. S. & VALIATI, V. H. 2005b: Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Porto Alegre, southern of Brazil. **Iheringia, Sér. Zool.** **95** (3): 233-240.
- SPASSKY, B.; RICHMOND, R. C.; PEREZ-SALAS, S.; PAVLOVSKY, O. A.; MOURAO, C. A.; HUNTER, A. S.; HOENIGSBERG, H. F.; DOBZHANSKY, T.; &

- AYALA, F. J., 1971. Geography of sibling species related to *Drosophila willistoni*, and the semi-species of the *Drosophila paulistorum* complex. **Evolution** **25**: 129-143.
- TIDON, R., LEITE, D.F., LEÃO.B.F.D. 2003. Impact of the colonisation of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: two years after the invasion. **Biological Conservation**, **112**: 299-305.
- VALIATI, V. H. & VALENTE, 1996. Observations on ecological parameters of urban populations of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia** **40** (2): 225-231.
- VALIATI, V. H. & VALENTE, V. L. S. 1997. Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Brazilian Journal of Genetics* **20**: 567-581.
- VILELA, C. R. 1999. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonising the Neotropical Region? *Dros. Inf. Serv.* **82**: 37-38.
- VILELA, C. R.; TEIXEIRA, E. P. & STEIN, C. P. 2001. Mosca-africana-so-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. & CANTOR, F. eds. *Histórico e Impacto das Pragas Introduzidas no Brasil*. **Ribeirão Preto, Holos. P. 48-52.**
- VILELA, C. R.; VALENTE, V. L. S. ; BASSO da SILVA, L. 2004. *Drosophila angustibucca* Duda *sensu* Frota-Pessoa is an undescribed species (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, **48**, (2): 233-238.

Tabela 1. Espécies e número total de indivíduos amostrados nos quatro pontos de coleta na cidade de Porto Alegre no ano de 2004.

Espécie	Autor e ano	Local				Total (%)
		PFA	JBO	RMT	PGK	
<i>D. simulans</i>	Sturtevant, 1919	6896	4065	2128	372	13461 (48,1)
<i>Z. indianus</i>	Gupta, 1970	1821	2637	1403	95	5956 (21,3)
D. willistoni	Sturtevant, 1921	709	1725	1412	519	4365 (15,6)
<i>D. mercatorum</i>	Patterson & Wheller, 1942	627	614	104	4	1349 (4,8)
<i>D. mediopunctata</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943	66	88	79	302	535 (1,9)
D. immigrans	Sturtevant, 1921	108	216	188	6	518 (1,9)
<i>D. cardinoides</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943	317	8	19	0	344 (1,2)
<i>D. maculifrons</i>	Duda, 1927	110	127	49	14	300 (1,1)
<i>D. paulistorum</i>	Dobzhansky & Pavan, 1946	0	27	189	30	246 (0,9)
D. kikkawai	Burla, 1954	122	27	45	0	194 (0,7)
<i>D. nebulosa</i>	Sturtevant, 1916	52	57	11	10	130 (0,5)
<i>D. polymorpha</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943	27	58	25	13	123 (0,4)
<i>D. griseolineata</i>	Duda, 1927	19	53	11	20	103 (0,4)
<i>D. neocardini</i>	Streisinger, 1946	16	14	26	1	57 (0,2)
<i>D. paraguayensis</i>	Duda, 1927	0	11	6	34	51 (0,2)
D. sturtevanti	Duda, 1927	1	28	15	3	47 (0,2)
<i>D. bandeirantorum</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943	3	12	12	6	33 (0,1)
<i>D. nappae</i>	Vilela <i>et al.</i> , 2004	0	8	3	16	27 (0,1)
<i>D. paramediostriata</i>	Townsend & Wheller, 1955	7	12	2	0	21 (0,1)
<i>D. capricorni</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943	0	0	1	18	19 (0,1)
<i>D. parabocainensis</i>	Carson, 1954	0	1	1	17	19 (0,1)
D. cardini	Sturtevant, 1916	15	0	0	0	15 (0,1)
<i>D. hydei</i>	Sturtevant, 1921	2	2	8	0	12 (*)
<i>D. melanogaster</i>	Meigen, 1830	0	0	0	12	12 (*)
<i>D. zottii</i>	Vilela, 1983	0	0	0	11	11 (*)
<i>D. onca</i>	Sene <i>et al.</i> , 1977	0	1	7	0	8 (*)
<i>D. mediopicta</i>	Frota-Pessoa, 1954	0	3	1	3	7 (*)
<i>D. meridionalis</i>	Wasserman, 1962	0	6	0	0	6 (*)
<i>D. buzzatii</i>	Carson & Wasserman, 1965	2	3	0	0	5 (*)
<i>D. neoguaramunu</i>	Frydenberg, 1956	1	0	1	0	2 (*)
D. pallidipennis	Dobzhansky & Pavan, 1943	0	1	0	1	2 (*)
<i>D. roehrae</i>	Pipkin & Heed, 1964	0	0	0	2	2(*)
<i>D. ananassae</i>	Doleschall, 1858	0	0	0	1	1 (*)
<i>D. annulimana</i>	Duda, 1927	0	0	0	1	1 (*)
<i>D. caponei</i>	Pavan & Da Cunha, 1947	0	1	0	0	1 (*)
<i>D. malerkotliana</i>	Parshad & Paika, 1964	0	0	1	0	1 (*)
<i>D. ornatifrons</i>	Duda, 1927	0	0	0	1	1 (*)
Total (%)		10921 (39,0)	9805 (35,0)	5747 (20,5)	1512 (5,4)	27985

PFA - Parque Farroupilha; JBO - Jardim Botânico; RMT - Rua Mário Totta; PGK - Parque Gabriel Knijnik.

(*) frequência menor que 0,1%

Tabela 2. Locais, níveis de urbanização (N.U.), períodos, recursos tróficos e frequência de *D. paulistorum*, *D. willistoni*, *Z. indianus* e outras espécies de drosofilídeos coletados em Porto Alegre durante os anos de 1986 e 1987 (Santos & Valente, 1990), 1991 e 1992 (Valiati & Valente, 1996) e no presente estudo.

Locais	N.U.	Ano/Estação	Recursos	Subgrupos da <i>D. willistoni</i>				Totais	Referências
				<i>D. paulistorum</i> (%)	<i>D. willistoni</i> (%)	<i>Z. indianus</i> (%)	Outras espécies (%)		
Parque Famóspilha	Alto	1991/aut.	1 (E)	4,65	0	0	95,35	129	Valiati & Valente (1996)
		1991/aut.	2 (N)	0	4,79	0	95,21	313	Valiati & Valente (1996)
		1992/ver.	1 (E)	43,33	24,87	0	31,80	616	Valiati & Valente (1996)
		1992/aut.	1 (E)	25,98	5,12	0	68,90	1913	Valiati & Valente (1996)
		1992/aut.	3 (N)	1,08	25,63	0	73,29	1951	Valiati & Valente (1996)
		2004/ver.	1 (E)	0	1,15	5,36	93,49	522	Presente estudo
		2004/ver.	2 (N)	0	20,74	21,79	57,47	1051	Presente estudo
		2004/ver.	4	0	11,09	40,22	48,70	460	Presente estudo
		2004/ver.	5	0	9,62	28,02	62,36	364	Presente estudo
		2004/aut.	1 (E)	0	0	47,83	52,17	23	Presente estudo
		2004/aut.	2 (N)	0	7,99	64,06	28,35	843	Presente estudo
		2004/aut.	4	0	12,86	50,00	37,14	70	Presente estudo
		2004/aut.	5	0	12,12	33,33	54,55	33	Presente estudo
		2004/aut.	6 (E)	0	11,96	71,74	16,30	92	Presente estudo
		2004/aut.	7 (N)	0	4,92	80,33	14,75	366	Presente estudo
		2004/inv.	2 (N)	0	14,66	7,48	77,86	962	Presente estudo
		2004/inv.	4	0	11,01	5,79	83,20	363	Presente estudo
		2004/inv.	5	0	19,42	6,61	73,97	484	Presente estudo
		2004/jm.	2 (N)	0	0,19	-4,08	95,73	4638	Presente estudo
		2004/jm.	4	0	1,82	0,45	97,73	220	Presente estudo
2004/jm.	5	0	1,16	1,16	97,68	430	Presente estudo		
Jardim Botânico	Baixo	1986/inv.	3 (N)	3,92	46,53	0	49,54	2192	Santos & Valente (1990)
		1986/inv.	8 (E)	8,03	7,55	0	84,42	2490	Santos & Valente (1990)
		1991/ver.	3 (N)	1,42	3,50	0	95,08	8764	Valiati & Valente (1996)
		1991/ver.	8 (E)	8,83	1,32	0	89,85	3782	Valiati & Valente (1996)
		1991/aut.	2 (N)	0	0,88	0	99,12	1016	Valiati & Valente (1996)
		1991/aut.	8 (E)	17,48	0	0	82,52	978	Valiati & Valente (1996)
		1991/inv.	4	0,35	5,94	0	93,71	780	Valiati & Valente (1996)
		1991/inv.	2 (N)	0	2,33	0	97,67	86	Valiati & Valente (1996)
		1991/jm.	4	0	0	0	100	182	Valiati & Valente (1996)
		1991/jm.	5	0	0	0	100	273	Valiati & Valente (1996)
		1992/ver.	3 (N)	0	3,40	0	96,60	589	Valiati & Valente (1996)
		1992/ver.	9 (N)	11,90	5,95	0	82,15	381	Valiati & Valente (1996)
		1992/aut.	8 (E)	27,80	10,03	0	62,17	1525	Valiati & Valente (1996)
		2004/ver.	3 (N)	0,12	20,06	35,15	44,67	1630	Presente estudo
		2004/ver.	4	0,70	11,16	20,70	67,44	430	Presente estudo
		2004/ver.	5	0	27,91	18,60	53,49	43	Presente estudo
		2004/ver.	8 (E)	0	0	30,88	69,12	68	Presente estudo
		2004/ver.	10 (N)	0	19,88	71,08	9,04	166	Presente estudo
		2004/ver.	9 (N)	0	5,52	79,55	14,94	308	Presente estudo
		2004/ver.	11 (E)	0	2,01	27,76	70,23	299	Presente estudo
2004/ver.	12 (N)	3,23	37,10	43,55	16,13	62	Presente estudo		
2004/aut.	2 (N)	0	16,28	46,48	37,25	639	Presente estudo		
2004/aut.	3 (N)	0	1,61	54,50	43,90	934	Presente estudo		
2004/aut.	4	0,38	31,38	30,77	37,54	325	Presente estudo		
2004/aut.	5	0	21,88	35,16	42,97	128	Presente estudo		
2004/aut.	8 (E)	2,53	20,54	55,06	21,88	672	Presente estudo		
2004/inv.	2 (N)	0	31,23	4,04	64,74	1313	Presente estudo		
2004/inv.	3 (N)	0	18,89	1,11	80,00	90	Presente estudo		
2004/inv.	4	0	12,11	6,77	81,13	355	Presente estudo		
2004/inv.	5	0,33	36,46	-4,54	58,70	661	Presente estudo		
2004/inv.	8 (E)	0	72,84	0	27,16	81	Presente estudo		
2004/jm.	2 (N)	0	7,14	3,57	89,30	981	Presente estudo		
2004/jm.	4	0	2,03	0,68	97,29	295	Presente estudo		
2004/jm.	5	0	7,29	0,99	91,72	302	Presente estudo		
2004/jm.	8 (E)	0	17,39	17,39	65,22	23	Presente estudo		

Tabela 2. Continuação

Locais	H.U.	Ano/Estação	Escores	Subgrupo da <i>D. willmanni</i>			Outras espécies	Totais	Referências
				<i>D. paulistocum</i> (%)	<i>D. willmanni</i> (%)	<i>Z. indianus</i> (%)			
Ipa Mazé Iota	Barro	1987/ver.	S (E)	45,45	14,39	0	37,94	793	Santos & Valente (1990)
		1991/ver.	S (E)	11,44	0,14	0	88,38	5447	Valenti & Valente (1994)
		1991/ónt.	S (E)	25,79	2,14	0	72,04	4033	Valenti & Valente (1994)
		1991/inv.	S (E)	8,47	2,45	0	89,08	2821	Valenti & Valente (1994)
		1992/ónt.	S (E)	44,84	0,94	0	34,22	440	Valenti & Valente (1994)
		2004/ver.	+	0	4,42	22,79	72,79	452	Presente estale
		2004/ver.	5	0	10,14	24,09	43,77	207	Presente estale
		2004/ver.	S (E)	1,34	19,01	24,43	55,20	221	Presente estale
		2004/ónt.	2 (N)	0	34,99	24,58	38,43	1772	Presente estale
		2004/ónt.	+	0	18,02	49,75	32,23	405	Presente estale
		2004/ónt.	5	0	21,17	44,97	33,84	378	Presente estale
		2004/ónt.	S (E)	5,18	39,45	23,30	31,88	734	Presente estale
		2004/ónt.	13 (N)	0	24,73	37,43	35,44	101	Presente estale
		2004/inv.	+	0	10,23	3,24	84,51	215	Presente estale
		2004/inv.	5	0,77	23,44	0	75,77	131	Presente estale
		2004/inv.	S (E)	0	8,43	0	91,40	238	Presente estale
		2004/jan.	+	0	4,24	0	95,74	94	Presente estale
		2004/jan.	5	4,12	8,25	0	87,43	97	Presente estale
		2004/jan.	S (E)	28,49	23,31	4,77	41,43	502	Presente estale
		Parque Gabriel Kupul	Barro	2004/ver.	+	0,35	32,87	3,85	42,94
2004/ver.	5			0,74	45,02	4,54	29,44	243	Presente estale
2004/ónt.	+			0	35,58	28,84	35,58	143	Presente estale
2004/ónt.	5			1,57	45,75	9,84	22,84	254	Presente estale
2004/inv.	+			0	2,01	0	97,99	249	Presente estale
2004/inv.	5			0	5,88	0	94,12	119	Presente estale
2004/jan.	+			1,89	7,55	0	90,57	53	Presente estale
2004/jan.	5			1,94	17,45	0	80,39	51	Presente estale
2004/jan.	14 (E)			28,38	5,41	0	44,22	74	Presente estale
N. fruto nativo	Ver.: Verde			Frutos e sementes:	(5) Icas de braga	(9) <i>Psidium guajava</i>	(13) <i>Passiflora edulis</i>		
E. fruto exótico	Out.: Outono	(1) <i>Machaera pomifera</i>	(4) <i>Aravena dulcis</i>	(10) <i>Aravena guatemalensis</i>	(14) <i>Eriobotrya japonica</i>				
	Inv.: Inverno	(2) <i>Syagrus romanzoffiana</i>	(7) <i>Syagrus coronata</i>	(11) <i>Eugenia jambolana</i>					
	Pri.: Primavera	(3) <i>Albizia ericoides</i>	(8) <i>Avicennia corambola</i>	(12) <i>Psidium araçá</i>					
		(4) Icas de Banana							

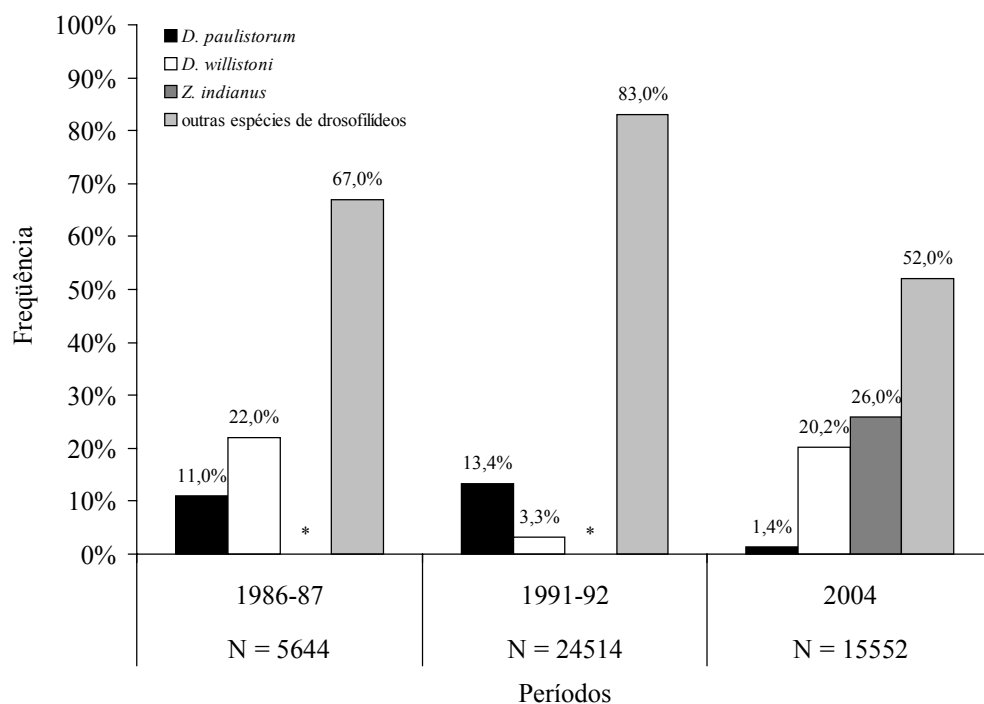


Figura 1. Frequências médias de *D. paulistorum*, *D. willistoni*, *Z. indianus* e demais espécies de drosofilídeos coletados nos locais JBO e RMT em três períodos: de 1986 a 1987 (Santos & Valente, 1990); de 1991 a 1992 (Valiati & Valente, 1996) e no ano de 2004 (presente estudo). N = número total de indivíduos. * não ocorrência de *Z. indianus* no Sul do Brasil.

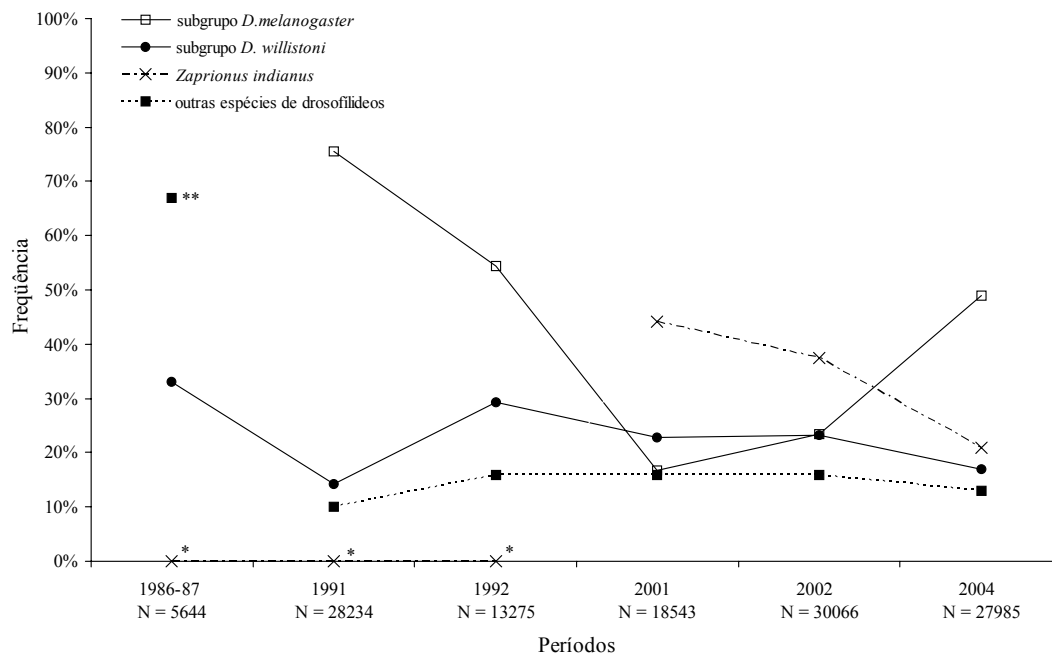


Figura 2. Frequências médias dos subgrupos *D. melanogaster* e *D. willistoni* juntamente com *Z. indianus* e demais espécies de drosofilídeos durante os anos de 1986 a 2004 na cidade de Porto Alegre, independente de local, estação do ano e recurso trófico. N = número total de indivíduos. *não ocorrência de *Z. indianus* no Sul do Brasil. ** autores não identificam as espécies do subgrupo *D. melanogaster*.

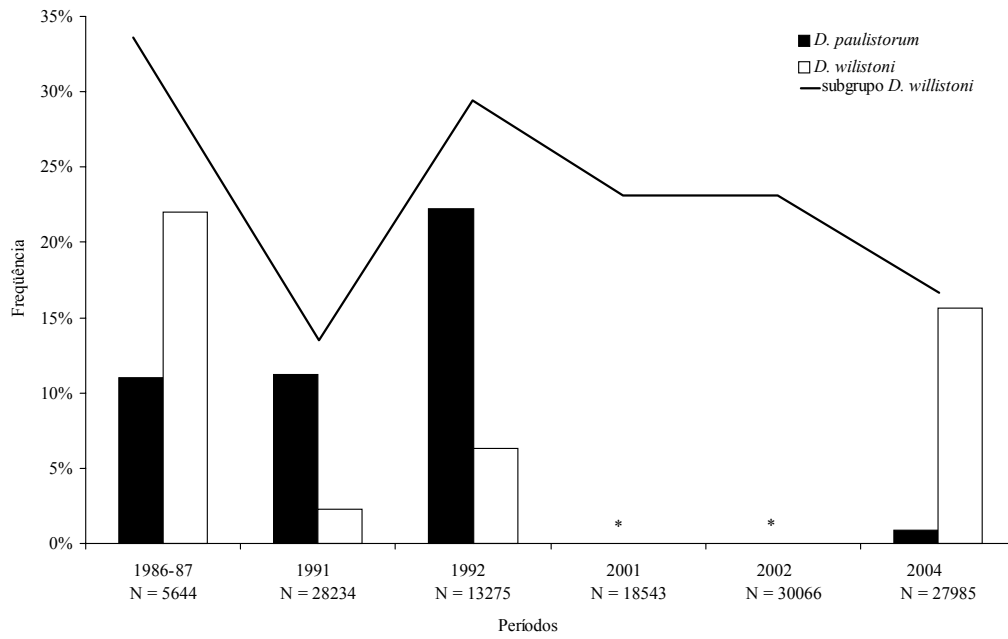


Figura 3. Frequências médias do subgrupo da *D. willistoni* no período de 1986 a 2004 e as frequências de *D. paulistorum* e *D. willistoni* entre os anos de 1986 a 1992 e no ano de 2004 na cidade de Porto Alegre, independente de local, estação do ano e recurso trófico. N = número total de indivíduos. *autores não diferenciaram as espécies crípticas do subgrupo *D. willistoni*.

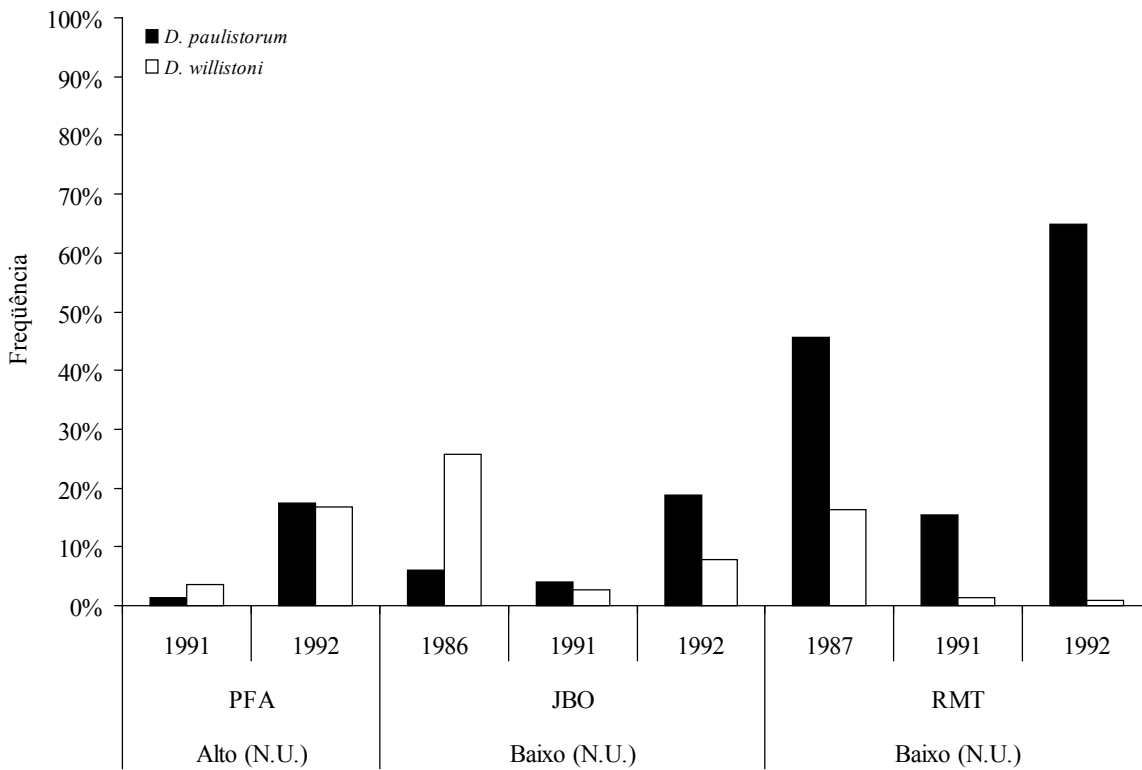


Figura 4. Frequência médias de *D. paulistorum* e *D. willistoni* durante os anos de 1986 a 1992 em três locais (PFA, JBO e RMT) da cidade de Porto Alegre, independente de estação do ano e recurso trófico. N.U. = nível de urbanização.

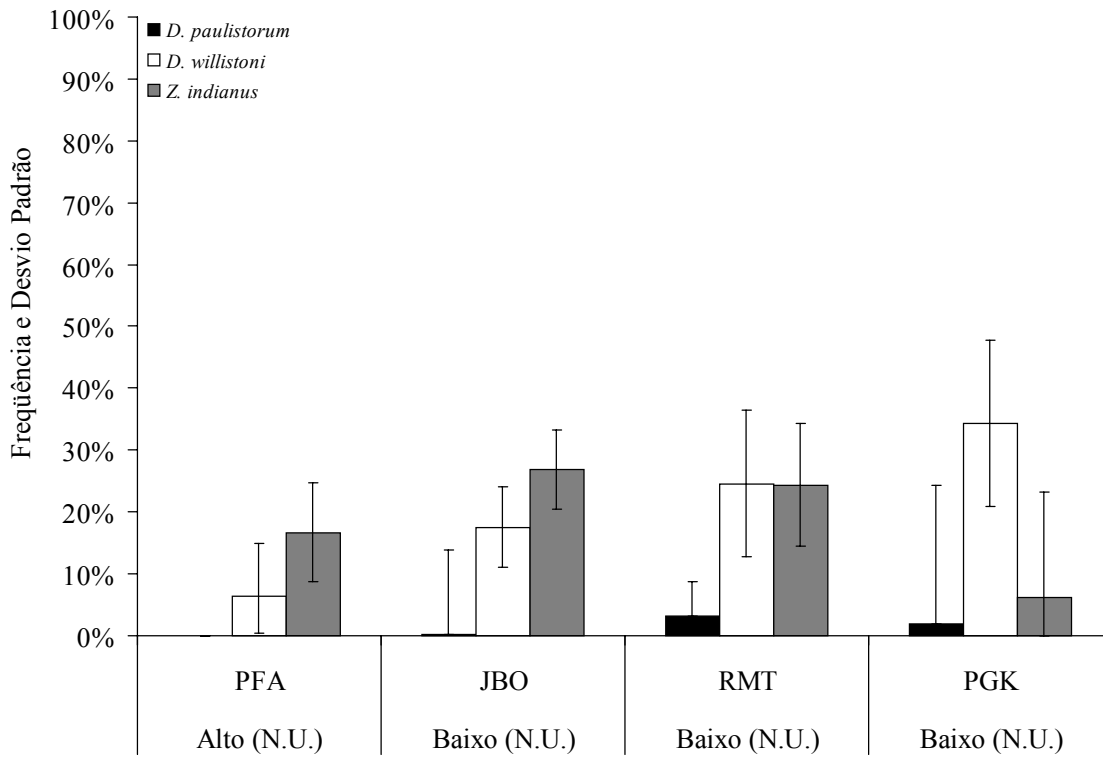


Figura 5. Médias e desvios das frequências de *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *Z. indianus* no ano de 2004 em quatro locais da cidade de Porto Alegre, independentemente da estação do ano e do recurso trófico. N.U. = nível de urbanização.

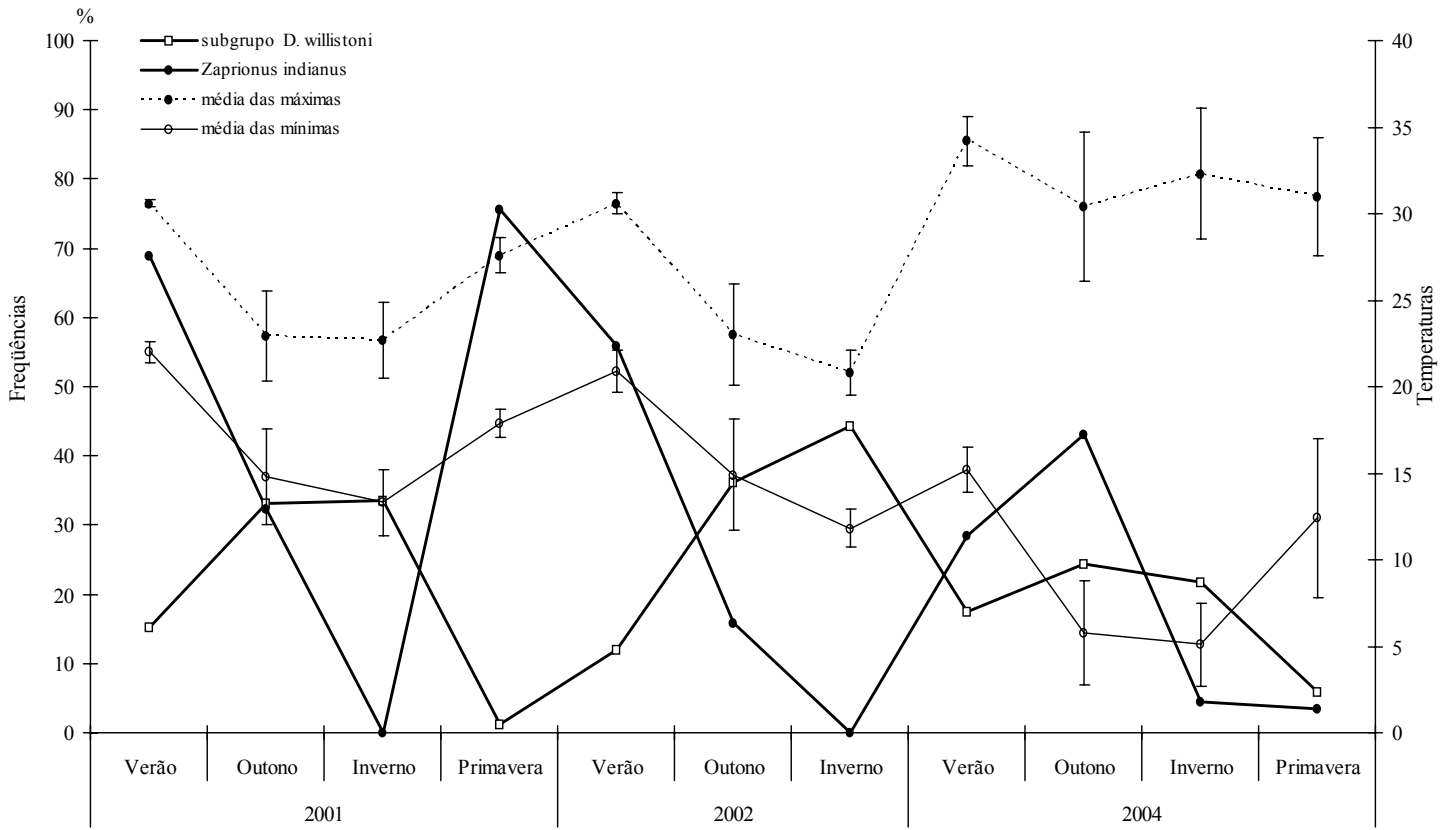


Figura 6. Frequências médias do subgrupo da *D. willistoni* e da espécie *Z. indianus*, e as médias das temperaturas máximas e mínimas, com seus desvios, em onze estações nos anos de 2001, 2002 e 2004, na cidade de Porto Alegre.

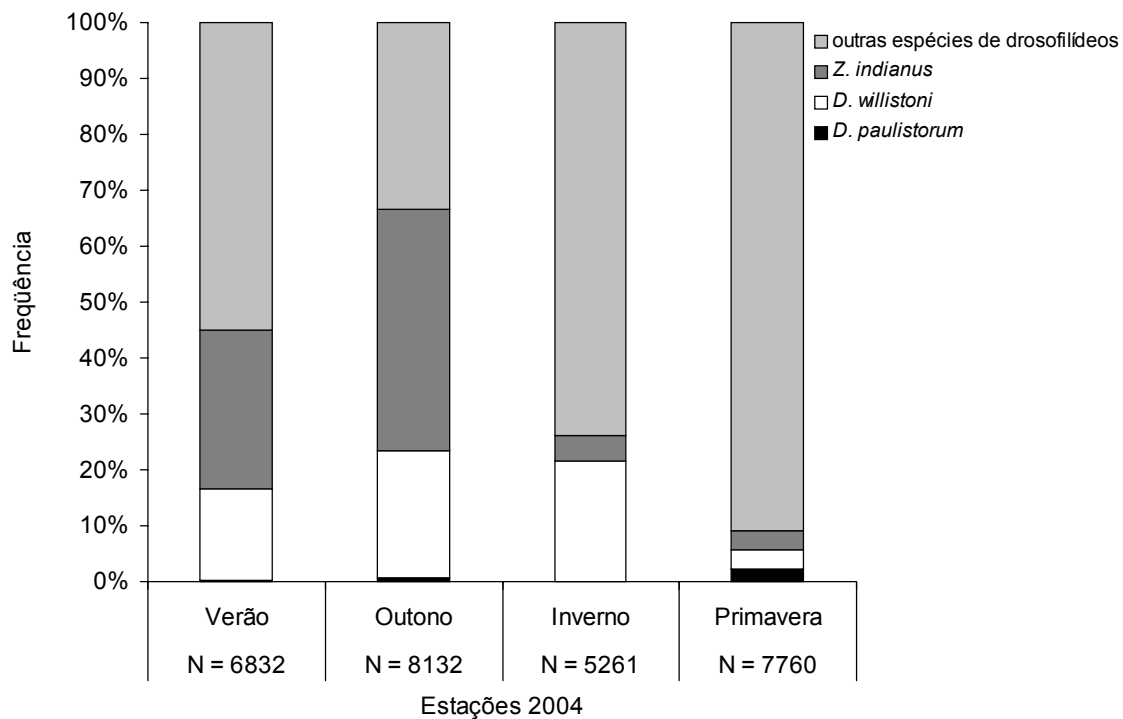


Figura 7. Frequência de *D. paulistorum*, *D. willistoni*, *Z. indianus* e outras espécies durante as quatro estações do ano de 2004 nos quatro pontos de estudos na cidade de Porto Alegre. N = número total de indivíduos.

CAPÍTULO VII

**First evidence of *Drosophila malerkotliana* in the extreme South of Brazil (Porto Alegre,
Rio Grande do Sul, Brazil)**

**Ana Cristina Lauer Garcia, Marco S. Gottschalk, Grazia F. Audino, Cláudia Rohde,
Victor H. Valiati and Vera L.S. Valente**

Trabalho publicado na revista *Drosophila Information Service*

ARTIGO EM ANEXO (PDF)

ARTIGO EM ANEXO (PDF)

ARTIGO EM ANEXO (PDF)

CAPÍTULO VIII

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido feitos por nosso grupo de pesquisa no Laboratório de *Drosophila* da UFRGS dentro de um projeto maior que consiste em estudar a evolução cromossômica do subgrupo da *D. willistoni*. Tal projeto baseia-se no fato de que os padrões de bandas dos cromossomos politênicos são espécie-específicos e que as diferenças observadas entre as populações são resultantes da ocorrência de inversões cromossômicas, consideradas eventos raros, porém bastante distribuídas em *Drosophila*. Nesse sentido, a homologia cromossômica entre *D. willistoni* e *D. paulistorum* foi primeiramente avaliada por Garcia e colaboradores (Dissertação de Mestrado, Garcia 2002), que concluíram que ambas espécies são bastante divergentes cromossomicamente. Durante o presente trabalho, foi dada seqüência a esses estudos, avaliando, sob o enfoque cromossômico, as divergências evolutivas entre as semi-espécies de *D. paulistorum* para os autossomos (Capítulos III e IV). Nossos resultados revelaram a proximidade evolutiva entre as semi-espécies, com poucas inversões fixadas envolvidas na diferenciação dos arranjos cromossômicos. No entanto, esses arranjos possibilitam que cada semi-espécie seja reconhecida pelo padrão cromossômico dos cromossomos politênicos, exceto entre Andino-Brasileira e a Orinocana, homoseqüenciais para todos os braços (Capítulo III). O conhecimento do padrão de bandas cromossômicas das semi-espécies abre novas possibilidades de estudo no sentido de verificar qual o papel dos

rearranjos cromossômicos no processo de especiação. O estudo da evolução do braço cromossômico IIR entre as espécies do subgrupo da *D. willistoni*, incluindo as semi-espécies de *D. paulistorum*, foi conclusivo no sentido de apresentar uma filogenia desse subgrupo (Capítulo IV) que se revelou compatível com estudos realizados com outros marcadores (Spassky 1971, Ayala 1975, Gleason et al. 1998, Tarrio et al. 2000). O polimorfismo cromossômico da semi-espécie Andino-Brasileira, a de mais ampla distribuição geográfica dentre as semi-espécies, também foi estudado. O primeiro obstáculo enfrentado para essa investigação foi a dificuldade de estabelecer homologia entre os arranjos detectados nos cromossomos politênicos dos indivíduos das nossas populações, com os descritos e disponíveis na literatura. Como único material de referência para a identificação dos cromossomos de *D. paulistorum*, dispúnhamos, até então, de um mapa desenhado em câmara clara elaborado por Kastritsis (1966b), além de algumas figuras de inversões detectadas no estado heterozigoto (Dobzhansky e Pavlovsky 1962, Kastritsis 1966b, 1967, 1969b, Santos e Valente 1990, Valiati e Valente 1997). Nessa etapa foi fundamental a confecção do primeiro fotomapa para a semi-espécie Andino-Brasileira (Capítulo II). Nosso fotomapa permitiu uma definição mais acurada das diferentes regiões cromossômicas e, com a divisão dos cromossomos em seções e subseções, foi possível a descrição detalhada dos pontos de quebra das inversões encontradas. A análise de diferentes populações geográficas permitiu a detecção, pela primeira vez para *D. paulistorum*, de arranjos cromossômicos presentes no estado homozigoto. Nossos resultados discordaram da observação de Kastritsis (1969b) de que a *D. paulistorum* seria o drosofilídeo mais polimórfico do gênero *Drosophila*. Vale salientar que o número de 85 inversões descritas pelo autor levou em consideração as configurações cromossômicas de híbridos produzidos a partir dos cruzamentos entre as diferentes semi-

espécies. No entanto, quando apenas o polimorfismo da semi-espécie Andino-Brasileira foi analisado, o autor registrou a presença de 13 inversões (Kastritsis 1967), um número próximo das 10 encontradas durante nosso estudo. O número de inversões cromossômicas da Andino-Brasileira, portanto, pode ser considerado baixo quando comparado às quase 50 inversões descritas por Rohde (2000) para diferentes populações de *D. willistoni*. Um ponto em comum entre nosso estudo e os trabalhos de Kastritsis (1966b, 1967, 1969b) foi o fato de detectarmos o cromossomo III como o mais polimórfico: das dez inversões por nós encontradas, sete estão localizadas neste cromossomo. A concentração de rearranjos em um determinado braço de um conjunto cromossômico ocorre em populações naturais de muitas espécies, tais como a *D. pseudoobscura* e *D. persimilis* (Dobzhansky 1944), *D. nebulosa* (Pavan 1946), *D. mediopunctata* (Ananina et al. 2002) entre outras. Em nosso estudo não foram encontradas inversões no cromossomo II (braços IIL e IIR), o que em parte foi também registrado por Kastritsis (1967), que não encontrou nenhuma inversão no braço IIR e apenas duas no IIL da semi-espécie Andino-Brasileira.

O uso conjunto dos três índices de polimorfismo cromossômico e o análise das freqüências das inversões (tanto homozigotas quanto heterozigotas), consideradas pela primeira vez para *D. paulistorum*, permitiu a detecção mais precisa das variações genéticas entre as populações naturais avaliadas. No entanto, conclusões mais definitivas sobre o número de inversões cromossômicas presentes em *D. paulistorum*, assim como novos avanços nos estudos de evolução cromossômica, dependem da obtenção de novas populações de todas as semi-espécies.

Apesar da existência de um número razoável de trabalhos enfocando aspectos ecológicos com o subgrupo da *D. willistoni* (Tidon et al. 1994, De Toni e Hofmann 1995,

Saavedra et al. 1995, Vilela e Mori 1999, Valiati e Valente 1996; Martins 2001; Medeiros e Klaczko 2004; Silva et al. 2005a,b, entre outros) poucos são aqueles em que os indivíduos desse subgrupo são identificados ao nível de espécie (Vilela e Mori 1999, Valiati e Valente 1996, Medeiros e Klaczko 2004). Isso pode ser facilmente entendido devido à extrema semelhança morfológica dessas espécies e ao fato de que muitas delas ocorrem em simpatria em grande parte da sua distribuição geográfica. Outro ponto a destacar é a abundância das espécies do subgrupo da *D. willistoni* na região Neotropical. Estudos recentes referentes à estrutura populacional e ecologia de espécies de *Drosophila* têm demonstrado que esse subgrupo pode representar até 80% dos espécimes coletados na região Amazônica (Martins 2001). Em vista dessa dificuldade, apresentamos um método eficiente e rápido para a identificação das espécies do subgrupo da *D. willistoni*, baseado na migração eletroforética da enzima Fosfatase ácida-1 (*AcpH-1*) que apresenta alelos diagnósticos para cada uma dessas espécies (Capítulo V). Embora Ayala e seus colaboradores tenham estudado o padrão de variação geográfica de um amplo número de enzimas, neste grupo de moscas (Ayala et al. 1970, Ayala et al. 1971, Ayala et al. 1972a, b, Ayala e Powell 1972a, b, Ayala e Tracey 1973, Ayala e Tracey 1974, Ayala et al. 1974a, b, c, Ayala 1975), nenhum dos 36 loci investigados foi espécie-específico. A enzima Fosfatase ácida-1 também foi investigada para esse propósito, mas em contraste com nossos resultados, os autores encontraram alelos compartilhados entre mais que uma espécie do subgrupo da *D. willistoni*. Acreditamos que a razão do nosso sucesso em distinguir de maneira eficaz essas espécies, pode ser explicada pela diferença na metodologia empregada por nós, tais como o tipo e concentração do gel, bem como o pH do gel e do tampão. Além disso, os resultados se baseiam na análise de um expressivo número amostral: 26 populações de *D. willistoni* (totalizando 5.059 isolinhagens),

21 populações de *D. paulistorum* (totalizando 842 isolinhagens) e demais populações das espécies *D. equinoxialis* (699 indivíduos), *D. tropicalis* (127 indivíduos) e *D. insularis* (132 indivíduos). A identificação das espécies foi corroborada pela análise do padrão de bandas dos cromossomos politênicos e pela análise da genitália dos machos (dados não apresentados).

Trabalhos ecológicos de identificação do subgrupo da *D. willistoni*, ao nível de espécie, são fundamentais para a compreensão da dinâmica populacional desses drosofilídeos. Um acompanhamento das oscilações da frequência da semi-espécie Andino-Brasileira e da espécie *D. willistoni*, que vivem em simpatria na cidade de Porto Alegre, sul do Brasil, vem sendo feito nos últimos anos por nosso grupo de pesquisa. Esses trabalhos demonstraram que *D. paulistorum* iniciou com sucesso a colonização do ambiente urbano a partir do ano de 1985, atingindo seu pico de frequência no ano de 1992. Dentre as razões apontadas para tal sucesso estaria a repartição de nichos de alimentação e ovoposição entre *D. paulistorum* e *D. willistoni*, o que evitaria a competição entre as duas espécies (Santos e Valente 1990, Valiati e Valente 1996). Dentro desse quadro surgiu a necessidade de traçar o panorama histórico da ocupação de *D. paulistorum* na cidade de Porto Alegre, quase vinte anos depois de seu primeiro registro nesse ambiente (Capítulo V). A partir de coletas sistemáticas de drosofilídeos realizadas durante as quatro estações ano de 2004, em diferentes locais da cidade, foi verificado um acentuado decréscimo na frequência de *D. paulistorum*. Enquanto a frequência da espécie durante os anos de 1986-87 e em 1992 era de 11% e 13% respectivamente, em 2004 esse número caiu para apenas 1,4%. A entrada da espécie invasora *Zaprionus indianus* na cidade de Porto Alegre, no ano 2000 (Castro e Valente 2001), poderia estar relacionada com esta redução de frequência. As coletas realizadas em 2004 revelaram um compartilhamento de recursos tróficos pela *D. paulistorum* e pela *D. willistoni* o que poderia

ser resultante do grande oportunismo na utilização dos recursos disponíveis pela *Z. indianus*. Dentre os 14 recursos tróficos avaliados, *Z. indianus* apenas não foi encontrada em um deles. O oportunismo da invasora poderia ser o responsável pelo deslocamento de *D. willistoni* para nichos onde *D. paulistorum* apresentava preferências no passado e que teriam propiciado o sucesso de sua colonização do ambiente urbano até a entrada de *Z. indianus*. Desse modo, atualmente, *Z. indianus* poderia ser a responsável indireta por uma provável competição entre *D. paulistorum* e *D. willistoni*. Nossa sugestão poderá vir a ser confirmada a partir de testes de competição larval entre essas espécies.

Outro resultado possibilitado pela coleta de drosofilídeos na região de Porto Alegre foi a análise do polimorfismo cromossômico da semi-espécie Andino-Brasileira e a comparação com os estudos prévios. Durante 1986-87 foram registradas 18 inversões cromossômicas para as populações da cidade de Porto Alegre. Alguns anos mais tarde, durante os anos de 1991-92, esse número chegou a 23. Os resultados desses estudos contrastam com o presente trabalho quando foram registradas apenas três inversões (Capítulo II). A expressiva redução populacional de *D. paulistorum* poderia explicar a alteração desse quadro, por efeito de deriva genética. Apenas as inversões mais frequentes estariam ainda presentes nos cromossomos da espécie. Nossos resultados se encaixam no modelo central-marginal da biologia evolutiva (revisão em Brussard 1984), o qual prediz que populações marginais do ponto de vista geográfico e ecológico, seriam isoladas, esparsas e cromossomicamente monomórficas (Mayr 1963, Lewontin e Hubby 1966), como é o caso da *D. paulistorum* em Porto Alegre.

Durante as coletas realizadas no outono de 2004, foi encontrada, pela primeira vez na cidade de Porto Alegre, a espécie invasora *Drosophila malerkotliana* (Capítulo VII). Nosso achado corresponde ao ponto mais meridional registrado para essa espécie. Apenas um

indivíduo macho emergiu de frutos de maracujá (*Passiflora sp.*) dentre os muitos frutos fermentados que foram coletados. A observação de que *D. malerkotliana* está explorando um recurso natural em um ambiente urbano pode ser uma evidência de que esta mosca está ainda estendendo sua distribuição geográfica no Brasil. Até nosso estudo, o limite geográfico mais ao sul para a espécie era o Estado de Santa Catarina, na Lagoa da Conceição (27°42'S) (De Toni e Hofmann, 1995). O quanto as populações dessa espécie serão capazes de se expandirem e quais as consequências desse drosofilídeo para as comunidade de nativas é matéria para estudos futuros.

RESUMO

Drosophila paulistorum, como os outros membros do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, pertence ao subgênero *Sophophora*, habitando uma área que se estende desde a Guatemala e Trinidad (Antilhas) até o sul do Brasil. Em muitas partes da América sul tropical, essa é a segunda espécie mais abundante do subgrupo da *D. willistoni*, composto por seis espécies crípticas: *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. tropicalis*, *D. equinoxialis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana*. O trabalho de Dobzhansky e Spassky (1959) demonstrou que *D. paulistorum* é, na verdade, uma superespécie composta de seis semi-espécies: Andino-Brasileira, Amazônica, Centro-Americana, Interior, Orinocana e Transicional. Linhagens dessas diferentes semi-espécies cruzam com dificuldade, e quando híbridos F1 são produzidos, as fêmeas são férteis e os machos são estéreis. O fato de *D. paulistorum* ser composta por semi-espécies deixa esse drosofilídeo em posição de destaque para realização de estudos evolutivos. Nas últimas décadas, membros do nosso grupo de pesquisa têm feito vários estudos sobre a evolução cromossômica do subgrupo da *D. willistoni*. Tal projeto baseia-se no fato de que o padrão de bandas dos cromossomos politênicos é espécie-específico e que as diferenças observadas entre as espécies são resultantes da ocorrência de inversões cromossômicas. Através da identificação dos pontos de quebras das inversões, feito sobre os fotomapas cromossômicos das espécies e semi-espécies, é possível estabelecer uma filogenia e inferir os eventos de reorganização cariotípica que resultaram na evolução cromossômica entre espécies próximas.

Inicialmente, apresentamos o primeiro fotomapa de referência dos cromossomos politênicos da semi-espécie Andino-Brasileira de *D. paulistorum*, em substituição ao mapa

desenhado de Kastritsis (1966), juntamente com a análise do polimorfismo cromossômico de populações de diferentes origens geográficas (Capítulo II). A partir desta investigação, foi possível avaliar a divergência evolutiva entre as semi-espécies de *D. paulistorum* com base nos arranjos e inversões presentes nos cromossomos II e III (Capítulo III). Nesse estudo foi detectada pouca reorganização cromossômica entre as semi-espécies, o que confirma que a relação evolutiva entre elas é mais próxima do que a encontrada nas demais espécies do subgrupo da *D. willistoni*. Na seqüência, apresentamos os resultados do estudo da evolução do braço cromossômico IIR entre as espécies do subgrupo da *D. willistoni* (Capítulo IV).

Todos esses resultados demonstram que os cromossomos politênicos são ainda excelentes marcadores, capazes de esclarecer a respeito dos diferentes níveis de relacionamento filogenético entre os membros desse subgrupo, composto por semi-espécies, subespécies e espécies crípticas.

Embora muitos trabalhos sobre ecologia de espécies Neotropicais de *Drosophila* sejam encontrados na literatura, poucos são os estudos em que indivíduos do subgrupo da *D. willistoni* são distinguidos ao nível de espécie. Isso provavelmente se deve à extrema semelhança morfológica das espécies e ao fato de que ocorrem em simpatria em grande parte da distribuição geográfica das espécies. Nossa contribuição para superar esta dificuldade foi estabelecer um método eficiente e rápido para a identificação das espécies do subgrupo da *D. willistoni*, baseado na migração eletroforética da enzima Fosfatase ácida-1 (*AcpH-1*), que apresenta alelos diagnósticos para cada uma das espécies (Capítulo V).

No Capítulo VI apresentamos os resultados do estudo ecológico de algumas populações urbanas da semi-espécie Andino-Brasileira de *D. paulistorum*, na cidade de Porto Alegre, Sul do Brasil, vinte anos após a sua detecção neste tipo de ambiente. Este estudo decorreu das

observações feitas quando se foi a campo coletar amostras recentes de *D. paulistorum* e se observou profundas modificações na fauna urbana de Drosophilidae em relação a trabalhos feitos em décadas anteriores. Foram avaliadas as oscilações das frequências de *D. paulistorum*, das espécies nativas e das espécies de Drosophilidae invasoras, em coletas sazonais feitas durante o ano de 2004. Os resultados indicam que *D. paulistorum* colonizou com sucesso o ambiente urbano de Porto Alegre entre os anos de 1986 e 1987, atingindo um pico de frequência provavelmente em 1992. Entretanto, em 2004, ou em anos próximos, essa espécie sofreu um decréscimo acentuado de sua abundância, provavelmente devido às alterações na composição das espécies, como o caso da introdução da invasora *Zaprionus indianus*. Por fim, no Capítulo VII apresentamos o registro mais meridional da espécie invasora *Drosophila malerkotliana*, na cidade de Porto Alegre, sul do Brasil.

ABSTRACT

Drosophila paulistorum, like the other members of the subgroup *willistoni* of *Drosophila*, forms part of the subgenus *Sophophora*, which flourishes in an extensive area extending from Guatemala and Trinidad (Antilles) to the South of Brazil. In various parts of tropical South America, it is the second most abundant species in the *D. willistoni* subgroup, and includes six sibling species: *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. tropicalis*, *D. equinoxialis*, *D. insularis* and *D. pavlovskiana*. However in a study by Dobzhansky and Spassky (1959) they demonstrated that *D. paulistorum* itself is, in fact, a superspecies composed by six semi-species: Andean-Brasilian, Amazonian, Centro-American, Interior, Orinocana e Transitional. Strains of such different semi-species rarely interbreed and on the rare occasions when hybrids are produced, the F1 females commonly are fertile and the males are sterile. The fact that *D. paulistorum* is a superspecies, makes this fly a prime candidate for evolutionary studies. In the last few decades, members of our research group have made several studies of the chromosomal evolution of the *Drosophila willistoni* subgroup, as part of a much larger project. This project was based on the regularity and species-specificity of the banding patterns of larval polytene chromosomes and on the fact that the differences observed between species resulted from different chromosomal inversions. Through the identification of the breaking points of inversions, suitably placed over polytene chromosome photomaps of the species and semispecies, it is possible to establish a phylogeny and to deduce the putative events of karyotype reorganization resulting in the chromosomal evolution among related species.

Initially, we present the first reference photomap of the chromosomes of the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum*, as an improvement over the *camera lucida* reference map drawn by Kastritsis in his 1966 study, as well as the analysis of the chromosomal polymorphism of populations from different geographic origin (Chapter II). These findings permit evaluation of the evolutionary divergence between the semi-species of *D. paulistorum* as far as the arrangements and inversions present in chromosomes II and III (Chapter III) are concerned. In the present study we detected an occurrence of small chromosomal reorganization between the semi-species, which confirms that the evolutionary relationship between them is closer than those found in the sibling species of the *D. willistoni* subgroup. Subsequently, we demonstrate the results of the evolution of the chromosomal arm IIR between species of the *D. willistoni* subgroup (Chapter IV).

All those findings show that the polytene chromosomes are indeed excellent markers, and can provide considerable information on all levels of phylogenetic relationships between the members of this subgroup, and its semispecies, subspecies and sibling species.

Although many ecological studies on the neotropical species of Drosophilidae are reported in the literature, not many distinguish the individuals of each *D. willistoni* subgroup at the species level. This is most probably due to the great, morphologic similarity of the species and to the fact that they live in sympatry in extensive areas of the geographical distribution of this species. To assist in the resolution of this difficulty, we demonstrate a rapid and efficient method of identifying the sibling species of the *D. willistoni* subgroup, based on the electrophoretic migration of the Acid phosphatase-1 (*AcpH-1*) enzyme, with diagnostic alleles for each species (Chapter V).

In Chapter VI, we present the results of the ecological study of some urban populations of the Andean-Brazilian semispecies of *D. paulistorum* collected in the city of Porto Alegre, South Brazil, twenty years after this semi-species had first been detected in this type of environment. This approach was taken because of observations made while endeavoring to sample recent populations of *D. paulistorum* - during the process we noted that major modifications in the urban fauna of *Drosophilidae*, had occurred since the first studies were performed some decades ago. The changes of the frequency of occurrence of *D. paulistorum*, of the remaining native species and of the invader species of *Drosophilidae*, were recorded in seasonal samplings during 2004. The results suggested that *D. paulistorum* had successfully colonized the Porto Alegre urban environment around 1986 and 1987 and attained its frequency peak probably in 1992. However, around the year of 2004, this species suffered a marked decrease in its abundance, probably due to alterations in the make-up of the urban assemblies of species due to events such as the introduction of the *Zaprionus indianus* invader. Finally, in Chapter VII, we document the most southerly finding to date of the invader species *Drosophila malerkotliana* in Porto Alegre city, South of Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amadon D (1966) The superspecies concept. *Syst Zool* 15:245-249.
- Ananina G, Peixoto AA, Souza WN and Klaczko LB (2002) Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:691-694.
- Ashburner M (1976) Aspects of polytene chromosome structure and function. *Allfrey* 1976: 85-91.
- Ayala FJ (1975) Genetic differentiation during the speciation process. *Evol Biol* 8: 1-78.
- Ayala FJ and Powell JR (1972a) Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1094-1096.
- Ayala FJ and Powell JR (1972b) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. *Biochem Genet* 7:331-345.
- Ayala FJ and Tracey ML (1973) Genetic differentiation and reproductive isolation between two subspecies of *Drosophila willistoni*. *J Heredity* 64: 120-124.
- Ayala FJ and Tracey ML (1974) Genetic differentiation within and between species of the *Drosophila willistoni* group. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 999-1003.
- Ayala FJ, Mourao CA, Pérez-Salas S, Richmond RC and Dobzhansky T (1970) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:225-232.
- Ayala FJ, Powell JR and Dobzhansky T (1971) Polymorphisms in continental and island populations of *Drosophila willistoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2480-2483.
- Ayala FJ, Powell JR and Tracey ML (1972a) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. *Genet Res* 20:19-42.

- Ayala FJ, Powell JR Tracey ML, Mourão CA and Perez-Salas S (1972 b) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. *Genetics* 70:113-139.
- Ayala FJ, Tracey ML, Barr LG and Ehrenfeld JG (1974a) Genetic and reproductive differentiation of *Drosophila equinoxialis caribbensis*. *Evolution* 28:24-41.
- Ayala FJ, Tracey ML, Barr LG, McDonald JF and Pérez-Salas S (1974b) Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics* 77: 343-384.
- Ayala FJ, Tracey ML, Hedgecock D and Richmond R (1974c) Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution* 28:576-592.
- Balbani EG (1890) Sur la structure intime du noyau de *Loxophyllum melegaris*. *Zool Anz* 13: 110-115, 132-136.
- Baldwin G (1982) Chromosomal polymorphism in species of the *Drosophila nasuta* complex in East and South East Asia. *Genetica* 60: 3-11.
- Berg DE and Howe MM (1989) *Mobile DNA*. American Society of Microbiology, Washington, 972 pp.
- Bicudo HEMC (1973) Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*. *Genetica* 44: 520-552.
- Biémont C and Aouar A (1987) Copy-number dependent transpositions and excisions of the *mdg-1* mobile element in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 58: 39-47.
- Brehm A and Krimbas CB (1990a) Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. III. Phylogenetic relationships in the *subobscura* cluster based on homologies of chromosome A. *Heredity* 65: 269- 275.

- Brehm A and Krimbas CB (1990b) The phylogeny of nine species of the *Drosophila obscura* group inferred by the banding homologies of chromosomal regions. II. Element E. Hereditas 113: 157-168.
- Brehm A and Krimbas CB (1991) Inversion polymorphism in the *Drosophila obscura*. J Hered 82: 110-117.
- Brcic DJ (1953) Chromosomal variation in natural populations of *Drosophila guaramunu*. Z Indukt Abstamm Vererbungs 85: 1-11.
- Brcic DJ (1970) Studies on the evolutionary biology of Chilean species of *Drosophila*. In: Hecht MK and Steere WC (eds) Essays in Evolution and Genetics in honor of Theodosius Dobzhansky. 1970: 401- 436.
- Brussard, PF.(1984). Geographic patterns and environmental gradients: the central-marginal models in *Drosophila* revisited Annu Rev Eco Syst 15: 25-64.
- Burla H, Da Cunha AB, Cordeiro AR, Dobzhansky T, Malogolowkin C and Pavan C (1949) The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. Evolution 3:300-314.
- Cáceres M, Puig M and Ruiz A (2001) Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. Genome Research 11: 1353-1364.
- Cáceres M, Ranz J.M, Barbadilla A, Long M and Ruiz A (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. Science 285: 415-418.
- Carson HL (1946) The selective elimination of inversion dicentric chromatids during meiosis in the eggs of *Sciara impatiens*. Genetics 31:95-113.
- Carson HL (1958) The population genetics of *Drosophila robusta*. Adv Genet 9:1-40.

- Carson HL (1959) Genetic conditions which promote or retard the formation of species. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 24:87-105.
- Carson HL and Kaneshiro KY (1976). *Drosophila* of Hawaii: Systematics and ecological genetics. A. Rev Ecol System 7: 311-345.
- Carson HL and Stalker HD (1949) Seasonal variation in gene arrangement frequencies over a three year period in *Drosophila robusta* Sturtevant. Evolution 3: 322-329.
- Castro FL and Valente VLS (2001) *Zaprionus indianus* is invading Drosophilid communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. Drosoph Inf Serv 84:15-17.
- Clayton FE and Wheeler MR (1975) A catalog of *Drosophila* metaphase chromosome configurations. In: King R C (Ed) Handbook of Genetics. Plenum Publisher Corporation, New York , pp 471-512.
- Collins M and Rubin GM (1984) Structure of chromosomal rearrangements induced by the FB transposable element in *Drosophila*. Nature 308: 323-327.
- Cordeiro AR and Dobzhansky T (1954) Combining ability of certain chromosomes in *Drosophila willistoni* and invalidation of the 'wild-type' concept. Am Nat 88:75-86.
- Cordeiro AR and Winge H (1995) Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levene L (ed) Genetics of natural populations: The continuing importance of Theodosius Dobzhansky. Columbia University Press, New York, pp: 262-280.
- Da Cunha AB (1950) Adaptative chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. Evolution 4:212-235.

- Da Cunha AB and Dobzhansky T (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution* 8:119-134.
- De Toni DC and Hofmann PRP (1995) Preliminary taxonomic survey of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) at Morro da Lagoa da Conceição; Santa Catarina Island, Brazil. *Rev Bras Biol* 55: 347-350.
- Diniz NM (1998) Filogenia cromossômica de espécies do subgrupo *fasciola* do grupo *repleta* do gênero *Drosophila*. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Dobzhansky (1965) 'Wild' and 'domestic' species of *Drosophila*. First International Union of Biological Sciences Symposia on General Biology, California, USA.
- Dobzhansky T (1941) Discovery of a predicted gene arrangement in *Drosophila azteca*. *Proc Natl Acad Sci USA* 27: 47-50.**
- Dobzhansky T (1944) Chromosomal races in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Publs Carnegie Instn* 554:47-144.**
- Dobzhansky T (1946) Complete reproductive isolation between two morphologically similar species of *Drosophila*. *Ecology* 27:205-211.**
- Dobzhansky T (1950) The chromosomes of *Drosophila willistoni*. *J Hered* 41:156-158.**
- Dobzhansky T (1957) Genetics of natural populations. XXVI Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution* 11:280-293.
- Dobzhansky T (1970) Genetics of the evolutionary process. Columbia University Press, New York, 505 pp.

- Dobzhansky T and Da Cunha AB (1955) Differentiation of nutritional preferences in Brazilian species of *Drosophila*. *Ecology* 36:34-39.
- Dobzhansky T and Mayr E (1944) Experiments on sexual isolation in *Drosophila*. I. Geographic Strains of *Drosophila willistoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* 30: 238-244.
- Dobzhansky T and Pavan C (1943) Studies on brazilian species of *Drosophila*. *Bolm Fac Filos Cienc S Paulo* 36:7-72.
- Dobzhansky T and Pavlovsky OA (1962) A comparative study of the chromosomes in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 13:196-218.
- Dobzhansky T and Pavlovsky OA (1967) Experiments on the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Genetics* 55:141-156.
- Dobzhansky T and Powell JR (1975) The *willistoni* group of *Drosophila*. In: King RC (ed) *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, vol.3, pp 587-622.
- Dobzhansky T and Spassky B (1959) *Drosophila paulistorum* a cluster of species in *statu nascendi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45:419-428.
- Dobzhansky T and Sturtevant AH (1938) Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 23: 28-64.
- Dobzhansky T, Burla H and da Cunha AB (1950) A comparative study of chromosomal polymorphism in sibling species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Am Nat* 84:229-246.
- Dobzhansky T, Ehman L and Pavovsky O (1957) *Drosophila insularis*, a new sibling species of the *willistoni* group. *Univ Texas Publ* 5721: 39-47.**

- Dobzhansky T, Pavlovsky O and Ehrman L (1969) Transitional populations of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 23:482-492.
- Duda O (1925) Die Costaricanischen Drosophiliden (Dipteren) des Ungarischen National Museums zu Budapest. *Ann Mus Nat Hung* 22:149-229.
- Eggleston WB, Rim NR and Lim JK (1996) Molecular characterization of *hobo*-mediated inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 647-656.
- Ehrman L (1965) Direct observation of sexual isolation between allopatric and between sympatric strains of the different *Drosophila paulistorum* races. *Evolution* 19:459-464.
- Ehrman L and Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, New York, pp 193-225.
- Ehrman L, Somerson NL and Gottlieb FJ (1987) Reproductive isolation in a Neotropical insect: Behavior and microbiology. In: Huettel MD (ed) *Evolutionary Genetics of Invertebrate Behavior*. Plenum Press, New York, pp 335.
- Fontdevila A (1992) Genetic instability and rapid speciation: are they coupled? *Genetica* 86:247-258.
- Freire-Maia N (1960) Peculiar gene arrangements in Brazilian natural populations of *Drosophila ananassae*. *Evolution* 15: 486-495.
- Garcia ACL (2002) Estudo da homologia cromossômica entre *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* Msc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Gleason JM, Griffith EC and Powell JR (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: Conflicts between species concepts? *Evolution* 52:1093-1103.

- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC and Gelbart WM (1998) Introdução à Genética. 6th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 856pp.
- Haffer J (1967) Speciation in Colombian forest birds west of the Andes. *Am Mus Novit* 2294:1- 57.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165:131-137.
- Hatzopoulos P, Monastirioti M, Yannopoulos G and Louis C (1987) The instability of the TE-like mutation Dp(2:2)GYL of *Drosophila melanogaster* is intimately associated with the *hobo* element. *The EMBO Journal* 6: 3091-3096.
- Heed WB and Russel JS (1971) Phylogeny and population structure in island and continental species of the *cardini* group of *Drosophila* studied by inversion analysis. *Univ Texas Pubs* 7403: 91-130.
- Hinton CW and Lucchesi JV (1960) A cytogenetic study of crossing over in inversion heterozygotes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 45: 87-94.
- Ho YT, Weber SM and Lim JK (1993) Interacting *hobo* transposons in an inbred strain and interaction regulation in hybrids of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134: 895-908.
- Hüettel RN and Bush GL (1972) Starch gel electrophoresis of tephritid proteins. In: Group on fruit flies (eds), A manual of techniques. International Biological Programme Press, pp 1-65.
- Jha AD and Rahman SMZ (1972) Cytogenetics of natural populations of *Drosophila*. I. Role of chromosomal inversions in the evolution of *bipunctinata* species complex. *Chromosoma* 37: 445-454.

- Jha AD and Rahman SMZ (1973) On crossing between *Drosophila bipectinata* and *Drosophila malerkotliana*. *Cytologia* 38: 425-436.
- Kastritsis CD (1966a) Cytological studies on some species of the *tripunctata* group. *Univ Texas Publs* 6615: 413-474.
- Kastritsis CD (1966b) A comparative chromosome study in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 19:208-222.
- Kastritsis CD (1967) A comparative study of the chromosomal polymorphs in the incipient species of the *Drosophila paulistorum* complex. *Chromosoma* 23:180-202.
- Kastritsis CD (1969a) The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. *J Hered* 60: 51-57.
- Kastritsis CD (1969b) A cytological study on some recently collected strains of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 23:663-675.
- Kastritsis CD and Dobzhansky T (1967) *Drosophila pavlovskiana*, a race or a species? *Am Midl Nat* 78:244-247.
- Kernaghan RP and Ehrman L (1970) An electron microscopic study of the etiology of hybrid sterility in *Drosophila paulistorum* I. Mycoplasma-like inclusions in the testes of sterile males. *Chromosoma* 29:291-304.
- Koller PC (1936) Structural hybridity in *Drosophila pseudoobscura*. *J Genet* 32: 79-102.
- Krimbas CB and Loukas M (1984) Evolution of the *obscura* group of *Drosophila* species. I. Salivary chromosomes and quantitative characters in *Drosophila subobscura* and two closely related species. *Heredity* 53: 469-482.

- Krimbas CB and Powell JR (1992) *Drosophila inversion polymorphism*. CRC Press, Florida, 568pp.
- Kusakabe S, Harada K and Mukai T (1990) The rare inversion with a *P* element at the breakpoint maintained in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 82: 111-115.
- Lambert DL (1978) The chromosomes of four species of the *nasuta* complex of *Drosophila*. II. Phylogenetic relationships. *Genetica* 48: 47- 53.
- Lemeunier F and Ashburner M (1976) Relationships within the *melanogaster* species group of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). II. Phylogenetic relationships between six species based upon polytene chromosome banding sequences. *Proc r Soc Lond* 193: 275-294.
- Lemeunier F and Ashburner M (1984) Relationships within the *melanogaster* species group of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). IV. The chromosome of two new species. *Chromosoma* 89: 343-351.
- Lewontin RC and Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. *Genetics* 54:595-609.
- Lim JK (1981) Site-specific intrachromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*: cytogenetic evidence for transposable elements. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 45: 553-560.
- Lim JK (1988) Intrachromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9153-9157.
- Lucchese ME, Flores FEV and Valente LSV (2002) *Drosophila* as bioindicator of air pollution: Preliminary evaluation of the wild species *D. willistoni*. *Rev Bras Bioc* 1:19-28.

- Lyttle TW and Haymer DS (1992) The role of the transposable element *hobo* in the origin of endemic inversions in wild populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 86: 113-126.
- Malogolowkin C (1952) Sobre a genitalia des 'Drosophilidae'(Diptera). *Rev Bras Biol* 12:79-96.
- Malogolowkin C (1963) The interrelationships of the incipient species within the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 17:187-193.
- Marcus MG and Detwyler TR (1972) Urbanization and environment in perspective In: TR Detwyler and MG Marcus (eds) Duxburg Press, California, pp 3-25.
- Martins MB (2001) Drosophilid fruit-fly guilds in forest fragments. In: Bierregaard RO, Gascon C, Lovejoy TE and Mesquita R (eds) *Lessons from Amazonia: the ecology and conservation of a fragmented forest*. Yale University Press, New Haven and London, pp 175-186.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge. 797 pp.
- Mayr E (1969) *Principles of Systematic Zoology*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, 428 pp.
- Medeiros HF, Klaczko LB (2004) How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forests of São Paulo, Brazil? Species lists of three forests remnants. *Biota Neotropica* 4: 1-12.
- Metz CW (1916) Chromosome studies on the Diptera. III. Additional types of chromosome groups in the Drosophilidae. *Am Nat* 50:587-599.

- Miller D (1977) Salivary gland chromosome variation in the *Drosophila affinis* sub-group. VI. Comparison of X, B and E chromosome patterns in *D. athabasca* and five related species. *J Hered* 68: 105-113.
- Miller DD (1939) Structure and variation of the chromosomes in *Drosophila algonquin*. *Genetics* 24: 699-708.
- Morgan TH (1912) Complete linkage in the second chromosome of the male of *Drosophila*. *Science* 36: 719-720.
- Morgan TH (1914) No crossing over in male of *Drosophila* of genes in the second and third pairs of chromosomes. *Biol Bull* 26: 195-204.
- Muller HJ (1940) Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: Huxley J (ed) *The New Systematics*. Clarendon Press, Oxford, pp 185-268.
- Narayanan N (1973) The phylogenetic relationships of the members of the *Drosophila robusta* group. *Genetics* 73: 319-350.
- Painter TS (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* 78: 585-586.
- Pasteur G (1970) A biometrical study on the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 24:156-168.
- Pataü K (1935). Chromosomen morphologie bei *Drosophila melanogaster* und *Drosophila simulans* und ihre genetische Bedeutung. *Naturwissenschaften* 23: 537-543.
- Patterson JT and Mainland GB (1944) The Drosophilidae of Mexico. *Univ Texas Publ* 4445:9-101.

- Patterson JT and Stone WS (1952) Evolution in the genus *Drosophila*. Macmillan, New York, 610 pp.
- Pavan C (1946) Chromosomal variation in *Drosophila nebulosa*. *Genetics* 31:546-557.
- Pérez-Salas S, Richmond RC, Pavlovsky O, Kasttritis CD, Ehrman L and Dobzhansky T (1970) The Interior semiespecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* 24:519-527.
- Poulick MD (1957) Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* 180: 1477-1479.
- Regner LP, Pereira MSO, Alonso CEV, Abdelhay E and Valente VLS (1996) Genomic distribution of *P* elements in *Drosophila willistoni* and a search for their relationship with chromosomal inversions. *J Hered* 87: 191-198.
- Ritchie MG and Gleason JM (1995) Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *J Evol Biol* 8:463-479.
- Rohde C (2000) Polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Rohde C, Degrandi TH, De Toni D and Valente VLS (2005) *Drosophila willistoni* polytene chromosomes I. Pericentric inversion on X chromosome. *Caryologia* 58: 249-254.
- Ruiz A and Wasserman M (1993) Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity* 70: 582-596.
- Ruszczuk A (1984) Influência da urbanização na distribuição, abundância e diversidade das borboletas (Lepidoptera) da cidade de Porto Alegre, Brasil. Msc. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Ruszczuk A (1986) Análise da cobertura vegetal da cidade de Porto Alegre, RS. Rev Brasil Bot 9: 225-229.
- Saavedra CCR, Callegari-Jacques SM, Napp M and Valente VLS (1995) A descriptive and analytical study of four neotropical drosophilid communities. J Zool Syst Evol Res 33: 62-74.
- Salzano FM (1954) Chromosomal relations in two species of *Drosophila*. Am Nat 88: 399-405.
- Santos RA and Valente VLS (1990) On the occurrence of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae) in an urban environment: ecological and cytogenetic observations. Evol Biol 4:253-268.
- Sheen FM, Lim JK and Simmons MJ (1993) Genetic instability in *Drosophila melanogaster* mediated by *hobo* transposable elements. Genetics 133: 315-334.
- Silva NM, Fantinel C, Valente VLS and Valiati VH (2005a) Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. Neotrop Entomol 34:363-374.
- Silva NM, Fantinel C, Valente VLS and Valiati, VH (2005b) Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Porto Alegre, southern of Brazil. Iheringia Sér Zool 95: 233-240.
- Sorsa V (1988) Polytene chromosomes in genetic research. Halsted Press, Chichester, England, 289pp.
- Spassky B (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. Univ. Texas Publs 5721:48-61.

- Spassky B, Richmond RC, Pérez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T and Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni* and the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25:129-143.
- Sperlich D and Pfriederich P (1986) Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, New York pp. 257-309.
- Stevens NM (1908) A study of the germ cells of certain Diptera, with reference to the heterochromosomes and the phenomenon of synapsis. *J Exp Zool* 5: 359-374.
- Stone WS (1955) Genetic and chromosomal variability in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 20: 256-269.
- Sturtevant AH (1916) Notes on North American *Drosophilidae* with descriptions of twenty-three new species. *Ann Entomol Soc Am* 9: 323-343.
- Sturtevant AH (1921) *The North American species of Drosophila*. Carnegie Institution Washington Publication. Carnegie Institution, Washington, 150 pp.
- Sturtevant AH and Dobzhansky T (1936a) Inversions in the third chromosome of wild races of *Drosophila pseudoobscura* and their use in the study of the history of the species. *Proc Natl Acad Sci USA* 22:448-450.
- Sturtevant AH and Dobzhansky T (1936b) Geographical distribution and cytology of sex-ratio in *Drosophila pseudoobscura* and related species. *Genetics* 26:517-541.
- Sturtevant AH and Novitski E (1941) The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* 26:517-541.

- Swift H (1962) Nucleic acids and cell morphology in Dipteran salivary glands. In Allen JM (ed) The molecular control of cellular activity. McGraw-Hill Book Co. New York. pp. 75-125.
- Tan CC (1935) Salivary gland chromosomes in the two races of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 20: 392-402.
- Tarrio R, Rodriguez-Trelles F and Ayala FJ (2000) Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: the *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. Mol Phylogenet Evol 16:344-349.
- Throckmorton LH (1982) The *virilis* species group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, London, pp 227-296.
- Tidon R, Vilela CR, Sene FM, Pereira MAQR (1994) The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipo, State of Minas Gerais, Brazil. Revta Bras Ent 38: 627-637.
- Townsend JI (1954) Cryptic subspeciation in *Drosophila* belonging to the subgenus *Sophophora*. Am Nat 88:339-351.
- Valiati VH (1999) Genética de populações marginais de *Drosophila willistoni* e *D. paulistorum* e avaliação de suas potencialidades para a produção de híbridos interespecíficos. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Valiati VH and Valente VLS (1996) Observations on ecological parameters of urban populations of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan (Diptera, Drosophilidae). Revta Bras Ent 40:225-231.

- Valiati VH and Valente VLS (1997) Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. Rev Bras Genet 20:567-581.
- Vilela CR and Mori L (1999) The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó: further notes. Revta Bras Ent 43: 319-328.
- Vuilleumier F (1965) Relationships and evolution within the Gracidae. Bull. Museum Com. Zool. Harvard Univ. 134:1-27.
- Wallace B (1984) A possible explanation for observed differences in the geographical distributions of chromosomal rearrangements of plants and *Drosophila*. Egypt J of Genetics and Cytology 13:121-136.
- Ward BL and Heed WB (1970) Chromosome phylogeny of *Drosophila pachea* and related species. J Hered 61:248-258.
- Ward BL, Starmer WT, Russell JR and Heed WB (1975) The correlation of climate and host plant morphology with a geographic gradient of an inversion polymorphism in *Drosophila pachaea*. Evolution 28: 565-575.
- Wasserman M (1954) Cytological studies of the *repleta* group. Univ Texas Publs 5422: 130-152.
- Wasserman M (1963) Cytology and phylogeny of *Drosophila*. Am Nat 97: 333-352.
- Wasserman M (1982) Evolution of *repleta* group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, London pp 61-139.

- Wasserman M (1992) Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: Krimbas CB and Powell JR (eds) *Drosophila* Inversion Polymorphism. CRC Press, Florida. pp 455-541.
- Wasserman M and Wilson FD (1957). Further studies on the *repleta* group. Univ Texas Publs 5721: 132- 156.
- Williamson DL, Ehrman L and Kernaghan RP (1971) Induction of sterility in *Drosophila paulistorum*: effect of cytoplasmic factors. Proc Natl Acad Sci U S A 68:2158-2160.
- Winge H (1965) Interespecific hybridization between the six cryptic species of *Drosophila willistoni* Group. Heredity 20: 9-19.
- Winge H (1971) Níveis de divergência evolutiva no grupo críptico da *Drosophila willistoni*. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Yamaguchi D (1973) Salivary gland chromosome relationship between *Drosophila bifasciata* and *D. imaii*. Cytologia 38: 603-614.