

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Zona de contato secundário entre as espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)**

Camila Kokudai Balieiro Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Zona de contato secundário entre as espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)**

Camila Kokudai Balieiro Santos

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maura Helena Manfrin

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Camila Kokudai Balieiro  
Zona de contato secundário entre as espécies cactofílicas  
*Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)  
Ribeirão Preto, 2009  
77 p.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências  
e Letras de Ribeirão Preto – USP Departamento de Biologia,  
Área: Biologia Comparada.  
Orientadora: Manfrin, Maura Helena

1. “cluster” *Drosophila buzzatii*. 2. Simpatria.  
3. Morfometria geométrica. 4. DNA mitocondrial. 5. IDH.

## Folha de Aprovação

Camila Kokudai Balieiro Santos

Zona de contato secundário entre as espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Ao meu marido José

Por ter me dado coragem para descobrir a força que existe dentro de mim,

Pelo estímulo contínuo e dedicação constante,

Pela garra, paciência inesgotável e amor incondicional,

Por completar a minha vida e fazer de mim uma pessoa melhor,

E por me dar, a cada dia, mais motivos para acreditar e amar...

**Dedico**

## Agradecimentos

- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maura Helena Manfrin, pela orientação dedicada, amizade e pela valiosa contribuição para meu crescimento intelectual.
- Ao Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, uma pessoa generosa, digna de muita admiração e respeito, pelos ensinamentos para toda a vida.
- Ao meu marido José Carvalho dos Santos, pela paciência, amor, lealdade, apoio incondicional, incentivo e por ser a pessoa mais maravilhosa que já apareceu na minha vida.
- Aos meus pais, Otair e Elza, pela vida, amor, dedicação, apoio, incentivo, força e por estarem sempre presentes em todos os momentos.
- Às minhas irmãs: Claudia, Daniele e Sabrina, pelo amor, incentivo e coragem.
- Aos meus sogros, Celso e Maria Bernadeth, por serem meus segundos pais e pelo apoio incondicional e às minhas cunhadas, Selma e Ana Claudia, pelo carinho de sempre.
- Aos amigos do laboratório de genética evolutiva:
  - Érica Cristina de Carvalho Silva Bernardi, minha quase irmã, pelo carinho, amizade, respeito, paciência, apoio em todos os momentos, por seu caráter inabalável e por tantas outras coisas boas que sua pessoa representa.
  - Fernando de Faria Franco, pela amizade, paciência, ajuda em todas as análises morfométricas e pela companhia sempre agradável e divertida.
  - Luís Eduardo Maestrelli Bizzo, pela amizade, paciência, companhia nos experimentos, nas coletas e nas discussões.
  - Cíntia Graziela Santos, pelo carinho sincero e por todas as palavras sábias, ditas nos momentos mais oportunos.
  - Mateus Henrique Santos, pela alegria, entusiasmo e pela capacidade de quebrar qualquer monotonia.
  - Rogério Pincela Mateus, pela importante colaboração, em muitas discussões.
  - Carlos, Rafael e Gislaine, pelo bom humor de sempre e pela companhia agradável.
  - Paulo Ricardo Epifânio, pelo apoio técnico, amizade e companheirismo.
- Ao Prof. Dr. Paulo Roberto P. Hofmann, pela colaboração nas coletas de drosofilídeos, realizadas no estado de Santa Catarina.

- À Elisabete M. B. Beira, pela ajuda na preparação dos géis de eletroforese de aloenzimas.
- Ao Mendelson Mazucato, pela ajuda nos seqüenciamentos.
- Ao Tiago Mauricio Franco, pela disponibilidade e ajuda nas análises morfométricas.
- Ao Prof. Ms. Marcelo Noronha Zini, pela competência, respeito e pelas palavras de incentivo, sempre oportunas.
- Ao Prof. Ms. Jean Carlo Zamboni, pela dedicação e pela contagiante paixão pela Evolução Biológica.
- À Regilaine Aparecida Debrino, pela paciência, incentivo nos momentos difíceis e apoio, sempre que necessário.
- À Zilda Marcolino Ravaneli, pelo amor quase materno, incentivo e coragem.
- À Luiza Mercedes Ap. Zampa, pelo incansável apoio, companheirismo e amizade sincera.
- Às amigas Cidinha, Giselda e Rosângela, pelo carinho, respeito, amizade e pela disponibilidade em ajudar, sempre que possível e necessário.
- Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela atenção e oportunidade.
- À Renata Andrade Cavalari, secretária da Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela gentileza, prontidão e competência.
- À CAPES, FINEP, FAPESP, CNPq e USP, pelo fornecimento de verbas para a manutenção do Laboratório de Genética Evolutiva.
- A Todas as pessoas que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.



Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...

E a vida é muito para ser insignificante.

(Charles Chaplin)

## Resumo

Santos, C.K.B. **Zona de contato secundário entre as espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae).** 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2009.

As espécies crípticas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, cactofílicas e pertencentes ao “cluster” *Drosophila buzzatii*, são alopátricas na maior parte de suas áreas de ocorrência. Entretanto, análises populacionais prévias descreveram a localidade de Florianópolis-SC como área de contato secundário, com populações de *D. serido* e *D. antonietae* em simpatria, sem formação de híbridos. Com a finalidade de testar esta hipótese, caracterizar as populações da localidade de Florianópolis-SC e identificar eventuais hospedeiros preferenciais para oviposição das duas espécies, uma amostra de indivíduos foi caracterizada através de análises eletroforéticas da proteína isocitrato desidrogenase (IDH); variação morfológica da asa e do edeago e seqüências do gene mitocondrial COI. Através das análises eletroforéticas, foram identificados os alelos característicos de *D. serido* na maior parte da amostra e não foram observados indivíduos híbridos para este marcador. A partir de necrose do cacto *Cereus hildmaniannus*, emergiram indivíduos de *D. serido* e *D. antonietae*, e a partir do cacto *Opuntia monacantha*, foi observada somente a emergência de indivíduos de *D. serido*. Através de caracteres quantitativos da morfologia dos edeagos, foram classificados corretamente 99,1% dos indivíduos da espécie *D. serido* e 90% dos indivíduos da espécie *D. antonietae* (Wilk's = 0,26836,  $p < 0,00001$ ), enquanto as análises discriminantes das asas classificaram corretamente 93,6% dos indivíduos da espécie *D. serido* e 86,2% dos indivíduos da espécie *D. antonietae* (Wilk's = 0,40619,  $p < 0,00001$ ). As análises morfométricas evidenciaram uma menor variação morfológica na população de *D. serido* de Florianópolis, em relação à população da localidade-tipo (Milagres-BA), sugerindo uma colonização e efeito do fundador ou seleção natural. Através das análises das seqüências do DNA mitocondrial, verificou-se a existência de haplótipos característicos da linhagem de *D. antonietae* em indivíduos com morfologia e alelos característicos de *D. serido*. Foram consideradas duas hipóteses para explicar o padrão observado: retenção de polimorfismo ancestral e eventos de introgressão assimétrica, passados ou atuais, de genes mitocondriais. Nesta amostra, a maior freqüência observada de *D. serido*, diferentemente de dados anteriores, sugere influência da sazonalidade na dinâmica desta área de contato, que pode estar relacionada à preferência e disponibilidade de cactos hospedeiros. Os resultados obtidos até o momento sugerem a existência de simpatria de populações de *D. serido* e *D. antonietae*, na localidade de Florianópolis-SC, além de possíveis eventos ancestrais de introgressão de genes mitocondriais.

Palavras-chave: “cluster” *Drosophila buzzatii*. Simpatria. Morfometria geométrica. DNA mitocondrial. IDH.

## Abstract

Santos, C.K.B. **Zone of secondary contact between the cactophilic species *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)**. 2009. 77 sheets. Dissertation (Master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2009.

The sibling species *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* are cactophilic and belong to the *Drosophila buzzatii* "cluster". Its populations are allopatric in most of its geographical range; however, preliminary analysis described the locality of Florianópolis-SC as a secondary contact zone, with populations of *D. serido* and *D. antonietae* in sympatry, without hybridization. In order to test this hypothesis, the goals of this research were to characterize the populations of Florianópolis and identify possibly preferential cacti hosts for oviposition of the two species. For such, a sample of individuals was characterized by electroforetic analysis of the isocitrate dehydrogenase protein (IDH), morphological variation of the wing and the aedeagus and sequences of the COI mitochondrial gene. By electrophoretic analysis, the characteristic alleles of *D. serido* were identified in most of the sample and hybrid individuals for this marker were not observed. From necrosis of cactus *Cereus hildmaniannus*, the emergence of individuals of *D. serido* and *D. antonietae* was observed, and from the cactus *Opuntia monacantha*, only individuals of *D. serido* have emerged. Through quantitative traits of aedeagus morphology, 99,1% of *D. serido* and 90% of *D. antonietae* individuals were correctly classified (Wilk's = 0,26836,  $p < 0,00001$ ), while the discriminant analysis of wings correctly classified 93,6% of *D. serido* and 86,2% of *D. antonietae* individuals (Wilk's = 0,40619,  $p < 0,00001$ ). The morphometric analysis showed less morphological variation in the populations of *D. serido* from Florianópolis, in relation to the populations of its type-locality (Milagres-BA), suggesting a colonization and founder effect or natural selection. The sequences of the COI mitochondrial gene showed that mitochondrial haplotypes characteristic of *D. antonietae* were found in individuals with morphology and IDH alleles characteristic of *D. serido*. There are two possible explanations to explain the observed pattern: retention of ancestral polymorphism and events of asymmetrical introgression of mitochondrial haplotypes, current or past. The higher frequency of *D. serido* observed, unlike previous data, suggests the influence of seasonality in the dynamics of the contact zone, which may be related to the preference and availability of cacti hosts. The available results suggest the existence of sympatry of populations of *D. serido* and *D. antonietae* in the locality of Florianópolis, with possible ancient events of introgression of mitochondrial genes.

Key words: *Drosophila buzzatii* "cluster". Sympatry. Geometric morphometry. Mitochondrial DNA. IDH.

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1- Zonas de Contato Secundário .....	12
1.2- Hibridação e Introgessão .....	13
1.3- Grupo repleta - “cluster” <i>Drosophila buzzatii</i> .....	15
1.4- A Espécie <i>Drosophila serido</i> .....	17
1.4.1- Populações do Nordeste .....	17
1.4.2- Populações do Litoral .....	18
1.5- A Espécie <i>Drosophila antonietae</i> .....	19
1.6- Zona de Contato Secundário entre <i>Drosophila serido</i> e <i>Drosophila antonietae</i> .....	20
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1- Material Biológico .....	24
3.2- Análise Eletroforética .....	25
3.2.1- Preparação das Amostras .....	25
3.2.2- Sistema Eletroforético .....	25
3.2.3- Sistema Enzimático .....	26
3.3- Análises Morfométricas das Asas .....	26
3.4 – Análises Morfométricas dos Edeagos .....	27
3.5- Análises Estatísticas .....	29
3.6- DNA Mitocondrial .....	29
3.6.1 - Indivíduos Amostrados .....	29
3.6.2 - Extração de DNA Genômico .....	29
3.6.3 - Isolamento do Gene Mitocondrial COI .....	30
3.6.4 - Eletroforese em Gel de Agarose 0,8% .....	30
3.6.5 - Purificação dos Fragmentos de DNA para Seqüenciamento .....	31
3.6.6 - Seqüenciamento Direto .....	31
3.6.7 - Análises das Seqüências de DNA .....	31

<b>4- RESULTADOS</b> .....	33
4.1- Variabilidade Alélica da Aloenzima IDH .....	33
4.2- Análise Morfométrica das Asas .....	34
4.2.1- Análise Discriminante das Populações .....	36
4.3- Análise Morfométrica dos Edeagos .....	39
4.3.1- Análise Discriminante das Populações .....	42
4.4- DNA Mitocondrial .....	44
4.5- Análises Totais .....	49
<b>5- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
<b>APÊNDICE</b> .....	77

## 1- Introdução

### 1.1- Zonas de Contato Secundário

Zonas de contato secundário são regiões de encontro entre duas espécies que divergiram em alopatria, sendo consideradas laboratórios naturais e fontes importantes de informações para estudos genéticos e evolutivos, permitindo análises de hibridação e introgressão, manutenção da coesão genética, isolamento reprodutivo e estrutura de populações (Hewitt, 1988; Howard, 1993; Moore e Price, 1993; Cain *et al.*, 1999; Marshall *et al.*, 2002; Rieseberg e Buerkle, 2002; Campbell, 2004; Lexer *et al.*, 2004). Geralmente, estas áreas são geograficamente estreitas, muitas vezes em mosaico, reconhecidas por populações que apresentam alterações fenotípicas ou genotípicas em relação a táxons distintos (Harrison, 1990; Jiggins e Mallet, 2000).

O contato secundário entre populações que possuem isolamento reprodutivo parcial pode resultar em diferentes possibilidades: extinção de uma das duas populações, coexistência estável com hibridação, fusão das duas populações ou um aumento no isolamento reprodutivo e formação de espécies distintas (Barton e Hewitt, 1981; Bullini e Nascetti, 1990; Liou e Price, 1994; Rhymer e Simberloff, 1996).

Dados da literatura sugerem que zonas de contato secundário variam desde a presença de populações de duas espécies em simpatria até diferentes graus de mistura de genoma parental, sendo que estes padrões podem refletir o grau de manutenção da coesão genômica das espécies quando em contato (Taylor e Hebert, 1993; Shoemaker *et al.*, 1996; Coyer *et al.*, 2007; Nettel *et al.*, 2008; Ganem *et al.*, 2008; Ruegg, 2008).

Segundo alguns autores, a extensão e o padrão de troca de genes em uma zona de contato podem ser descritos por dois tipos de seleção: endógena e exógena (Barton e Hewitt, 1985; Arnold, 1997). Seleção endógena refere-se à seleção contra genótipos híbridos; neste caso, a zona de contato é mantida pelo balanço entre a seleção contra os genótipos híbridos e a dispersão de genótipos parentais, sendo denominada zona de tensão (Barton e Hewitt, 1985; Alexandrino *et al.*, 2005). Seleção exógena refere-se à seleção natural diferencial, com a formação de clinas para caracteres associados com variação ambiental (Moore e Price, 1993; Ross e Harrison, 2002).

Estudos mostram que pares de espécies simpátricas tendem a exibir uma discriminação para acasalamentos conspecíficos mais forte que pares de espécies alopátricas de mesma divergência genética (Coyne e Orr, 1989, 1997; Howard, 1993; Butlin, 1995; Noor, 1995; Massie e Markow, 2005). Descrito primeiramente por Dobzhansky, em 1937, este padrão recebe o nome de reforço, ou seja, seleção natural intensificando o isolamento sexual entre espécies simpátricas, reduzindo a formação de híbridos de menor valor adaptativo (Servedio e Noor, 2003; Servedio, 2004). Este padrão pode ser conseqüência de uma divergência populacional, denominada “character displacement” ecológico, que é uma diferenciação em uma série de características comportamentais, morfológicas, fisiológicas e ecológicas (Losos, 2000; Dayan e Simberloff, 2005), que ocorre em populações simpátricas, provavelmente reduzindo a competição interespecífica e permitindo a coexistência entre duas espécies (Schluter e McPhail, 1992; Grant, 1994), podendo levá-las a um isolamento pré-zigótico como resposta correlacionada (Rice e Salt, 1990; Howard, 1993).

O estabelecimento e a interrupção do contato entre espécies podem resultar de mudanças na distribuição geográfica dos táxons, em resposta a mudanças climáticas (Alves *et al.*, 2008). Na Europa, por exemplo, infere-se que a presença de áreas de contato para muitos animais e plantas seja conseqüência das oscilações climáticas durante os períodos glaciais do Quaternário (Hewitt, 2000; Hofreiter *et al.*, 2004). Durante estes períodos, populações ancestrais teriam se separado e divergido em alopatria em refúgios distintos (Hewitt, 1996). Nos períodos interglaciais, populações de várias espécies teriam expandido suas áreas de distribuição, e zonas de contato secundário teriam se formado (Barton e Hewitt 1985; Hewitt 2004), tendo como conseqüência desde um isolamento reprodutivo completo entre estas populações até a formação de zonas híbridas estáveis (Grant e Grant, 1992; Arnold, 1997, 2006; Howard e Berlocher, 1998).

## **1.2- Híbridação e Introgressão**

Híbridação introgressiva é definida como a transferência de material genético de uma espécie para outra através de repetidos retrocruzamentos entre híbridos e espécies parentais (Anderson e Hubricht, 1938; Rieseberg e Wendel, 1993).

Os avanços no campo da genômica permitiram uma definição de introgressão em um nível de detalhes sem precedentes (Arnold, 2006), de modo que a híbridação

introgressiva se tornou um fenômeno bem estudado na Biologia Evolutiva. Além disso, uma série de análises moleculares tem sido utilizada para avaliar o possível impacto de eventos de introgressão. Estes estudos suportam duas principais conclusões: a introgressão é muito mais freqüente do que se pensava e pode desempenhar um importante papel na evolução adaptativa (Arnold *et al.*, 2008).

Em *Drosophila*, a hibridação interespecífica é considerada um fenômeno raro na natureza, com relação a outros grupos estudados, que apresentam uma freqüência de espécies intecruzantes bastante variável (Grant e Grant, 1992b; Lachaise *et al.*, 2000; Mallet, 2005; Descimon e Mallet, 2008). Este quadro sugere que a hibridação interespecífica representa um processo grupo-específico, ou seja, que ocorre mais frequentemente em determinados grupos. Todavia, os grupos taxonômicos utilizados como modelo em pesquisas não são escolhidos aleatoriamente, e poderia haver um viés nos dados disponíveis, devido à preferência de pesquisadores por determinados grupos, os quais seriam super-representados, enquanto a taxa de introgressão de outros grupos permaneceria desconhecida.

Schwenk *et al.* (2008) fizeram um teste de correlação entre o número de registros de híbridos com o número estimado de espécies descritas em cada grupo taxonômico, e concluíram que a taxa de hibridação interespecífica é homogênea entre grupos animais, havendo apenas alguns desvios deste padrão, e estimaram que a taxa de hibridação seria de aproximadamente 1%, o que seria suficiente para causar mudanças na arquitetura genética das espécies, representando um impacto na origem e na história de linhagens evolutivas. (Schwenk *et al.*, 2008).

A demonstração de introgressão, em populações naturais, é problemática, pois podem estar envolvidas sucessivas gerações de retrocruzamento entre híbridos e espécies parentais. Além disso, duas espécies que não se inter cruzam no presente, podem tê-lo feito no passado, com algum evento de introgressão (Mallet, 2005). Um fator complicante, é que existem, no mínimo, duas explicações alternativas para uma aparente introgressão: similesiomorfia, quando um estado de caráter plesiomórfico é compartilhado por dois ou mais táxons e evolução convergente (Alves *et al.*, 2008).

Estudos de hibridação que não utilizam técnicas moleculares podem apresentar algumas limitações. A detecção de introgressão, baseada em caracteres morfológicos, é uma tarefa difícil, pois o híbrido frequentemente se assemelha a um dos parentais (Byrne e Anderson, 1994; Soto *et al.*, 2007; Harper e Hart, 2007).



Alguns estudos de introgressão, utilizando caracteres morfológicos (Seehausen *et al.*, 1997; Crespín *et al.*, 1999; Cansian e Sene, 2000) e análises de sons (Lein e Corbin, 1990), identificam híbridos através de caracteres que são intermediários entre os parentais, o que pode significar apenas uma variação natural dentro do táxon, e não um indício de hibridação. Além disso, a determinação de uma forma como sendo intermediária pode ser subjetiva, podendo diferir entre pesquisadores.

O desenvolvimento de marcadores, através da genética molecular, facilitou o estudo de hibridação e introgressão. Marcadores moleculares são independentes e têm modos simples de herança. Além disso, o número de marcadores genéticos potencialmente disponíveis excede o número de caracteres morfológicos e podem ser usados em estudos de fluxo gênico nuclear e citoplasmático.

O DNA mitocondrial tem sido muito utilizado para evidenciar diferentes níveis de introgressão (Rieseberg e Brunsfeld, 1992; Rieseberg e Wendel, 1993; Ballard e Whitlock, 2004). Em um levantamento bibliográfico, envolvendo estudos filogenéticos e filogeográficos, Funk e Omland (2003) concluíram que 23% das espécies animais documentadas possuem DNA mitocondrial não monofilético, devido à introgressão ou manutenção de polimorfismo ancestral.

As aloenzimas também têm sido utilizadas para a detecção de introgressão, podendo indicar a presença de alelos característicos de uma espécie em outra, além de uma estimativa da frequência com que estes eventos ocorrem. (Dowling e Hoeh, 1991; Jiggins *et al.*, 1997; Spaak, 1997; Morales, 2001; Cianchi *et al.*, 2003).

### **1.3- Grupo *repleta* - “Cluster” *Drosophila buzzatii***

O grupo *repleta* é formado por aproximadamente 100 espécies nominais, constituindo um dos maiores grupos dentro do gênero *Drosophila* (Vilela, 1983; Wasserman, 1992; Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Alguns complexos deste grupo são encontrados em áreas áridas ou semi-áridas e desertos do continente americano, onde vivem associados a várias espécies de cactos (Sene *et al.*, 1982; Heed e Mangan, 1986; Wasserman, 1992). Esta associação ecológica e a grande quantidade de informações disponíveis na literatura sobre este grupo fazem com que o mesmo seja um excelente material biológico para estudos genéticos, sistemáticos e ecológicos.

O grupo *repleta* está dividido em subgrupos, complexos e “clusters”; dentre eles, o “cluster” *Drosophila buzzatii* é composto atualmente por sete espécies:

*Drosophila buzzatii* (Patterson e Wheeler, 1942), *D. serido* (Vilela e Sene, 1977), *D. borborema* (Vilela e Sene, 1977), *D. koepferae* (Fontdevila *et al.*, 1988), *D. seriema* (Tidon-Sklorz e Sene, 1995), *D. gouveai* (Tidon-Sklorz e Sene, 2001) e *D. antonietae* (Tidon-Sklorz e Sene, 2001).

As espécies do “cluster” *Drosophila buzzatii* são cactofílicas, utilizando tecidos de cactos em decomposição como fonte de alimentação exclusiva para suas larvas (Pereira *et al.*, 1983); são endêmicas do Continente Americano, com exceção de *D. buzzatii*, que foi introduzida em outros continentes junto com o cacto hospedeiro *Opuntia ficus-indica* (Barker *et al.*, 1985). Este grupo é monofilético (Manfrin e Sene, 2006), e a morfologia da terminália externa do macho (edeagos) é o caráter diagnóstico para identificação de suas espécies (Vilela, 1983; Silva e Sene, 1991).

Em termos históricos, as análises populacionais das espécies do “cluster” *buzzatii* indicaram associação geográfica e genética significativa na distribuição das espécies (Manfrin e Sene, 2006), sugerindo eventos vicariantes, associados com geomorfologia, na diversificação de suas espécies. Análises populacionais, realizadas através de uma proposta filogeográfica, sugeriram expansão de área e fluxo gênico restrito pela distância como principais eventos responsáveis pela distribuição atual das suas populações (De Brito *et al.*, 2002a, b; Morales, 2005; Manfrin e Sene, 2006). Provavelmente, esta dinâmica populacional está associada com as expansões e retrações dos cactos durante os paleoeventos climáticos dos ciclos glaciais (Sene *et al.*, 1988, Ab’Saber, 1977).

A evolução e a divergência de algumas espécies do “cluster” *Drosophila buzzatii* podem estar relacionadas às suas histórias de utilização de diferentes cactos hospedeiros (Hasson *et al.*, 1992; Fanara *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2007a, c). Mudanças de cacto hospedeiro podem acelerar a divergência em características associadas à utilização deste recurso, como sobrevivência, sistemas sensoriais, tempo de desenvolvimento e de oviposição, (Fanara e Hasson, 2001; McBride, 2007), além de poder causar, como consequência direta ou como subproduto, a evolução de isolamento sexual entre populações (Etges *et al.*, 2006; Coyne e Orr, 2004).

A associação destas espécies com os cactos oferece uma oportunidade para a investigação do significado de fatores ecológicos na evolução, e tem, pelo menos, duas consequências. A primeira é que a distribuição atual de suas populações está determinada pela ocorrência das cactáceas na América do Sul, o que inclui o

Domínio da Caatinga, do Chaco e, entre estas áreas, um grande número de populações isoladas, as quais são, geralmente, reduzidas em tamanho (Manfrin e Sene, 2006). A segunda consequência é que o processo de diferenciação dentro do “cluster” pode estar relacionado com a expansão e retração de áreas de vegetação aberta na América do Sul durante mudanças climáticas, como aquelas promovidas pelos períodos glaciais (Ab’ Saber, 1977).

Além disso, por estarem em diferentes estágios de divergência, as espécies do “cluster” *D. buzzatii* podem ser modelos úteis para a investigação de padrões de divergência interespecífica, em estudos de adaptação e isolamento reprodutivo em pares de espécies próximas ou distantes (Manfrin e Sene, 2006; Soto *et al.*, 2007).

#### **1.4- A Espécie *Drosophila serido***

A espécie *Drosophila serido* (Vilela e Sene, 1977), apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo no nordeste do Brasil e ao longo da costa atlântica até o estado de Santa Catarina (Silva e Sene, 1991; Ruiz *et al.*, 2000) (Figura 1); possui o morfotipo “A” de edeago (Silva e Sene, 1991) e está associada a diferentes gêneros e espécies de cactos, tais como: *Cephalocereus piauhyensis*, *Cereus hildmaniannus*, *Cereus fernambucensis*, *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia monacantha* e *Opuntia vulgaris* (Pereira *et al.*, 1983; Ruiz *et al.*, 2000; Manfrin e Sene, 2006). *Drosophila serido* possui a inversão cromossômica fixa  $2x^7$  (Wasserman e Richardson, 1987).

As análises cariotípicas (Baimai *et al.*, 1983), de inversões cromossômicas polimórficas (Tosi e Sene, 1989; Ruiz *et al.*, 2000), da diversidade haplotípica mitocondrial (Manfrin *et al.*, 2001; De Brito *et al.*, 2002a; Morales, 2005) e de hidrocarbonetos da cutícula (Oliveira, 2008) sugerem a existência de dois grupos populacionais nesta espécie: as populações do nordeste e as populações do litoral.

##### **1.4.1- Populações do Nordeste**

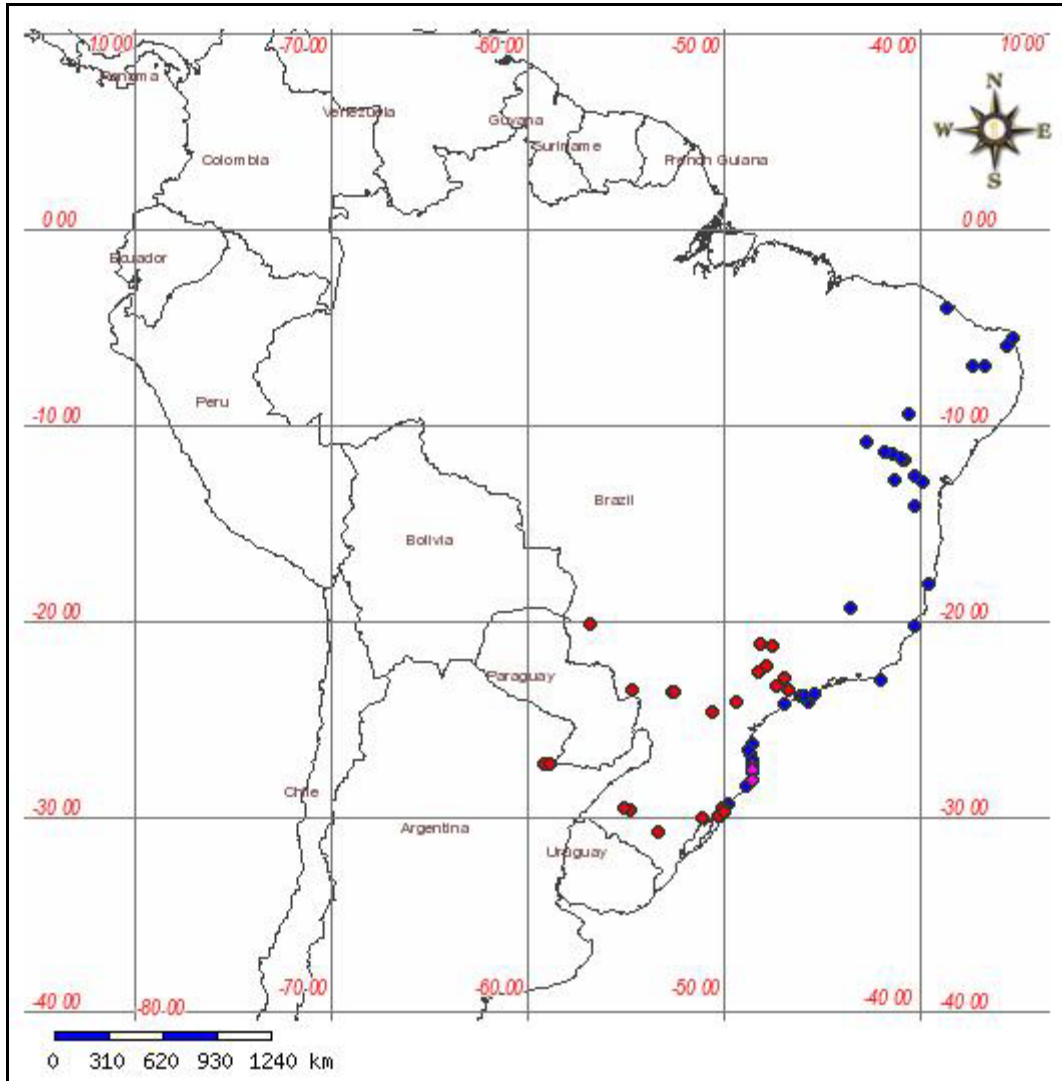
As populações do nordeste da espécie *Drosophila serido* possuem cromossomos metafásicos tipo I (Baimai *et al.*, 1983) e apresentam as inversões cromossômicas polimórficas  $2a^8$ ,  $2b^8$ ,  $2c^8$  e  $2d^8$  (Tosi e Sene, 1989; Ruiz *et al.*, 2000), sendo consideradas homogêneas para a maioria dos marcadores utilizados até o momento (Baimai *et al.*, 1983; Ruiz *et al.*, 2000; Morales, 2005; Silva e Sene, 1991). A análise da variabilidade haplotípica mitocondrial mostrou que as

populações de *D. serido* da caatinga, interior do estado da Bahia, compartilham haplótipos com as populações do litoral do estado de Santa Catarina (Morales, 2005). Os principais fatores apontados para explicar esta distribuição foram expansões de área das populações do interior da Bahia, colonizando o litoral e, no litoral, fluxo gênico restrito devido a isolamento por distância.

#### **1.4.2- Populações do Litoral**

As populações de *D. serido*, presentes ao longo da costa atlântica brasileira, apresentam uma complexidade evolutiva, sugerida pela não congruência e politipia observada em diversos marcadores utilizados (Baimai *et al.*, 1983; Esguícero e Manfrin, 2005; Ruiz *et al.*, 2000 e Morales, 2005). As populações litorâneas apresentam as inversões cromossômicas polimórficas  $2y^9$ ,  $2x^8$  e  $2w^8$ . Com relação a placas metafásicas, foram descritos: cromossomos metafásicos tipo III em Arraial do Cabo-RJ, tipo IV em Peruíbe-SP e um novo tipo em Florianópolis-SC (Baimai *et al.*, 1983, Biffi *et al.*, 2001). A análise da variabilidade haplotípica mitocondrial agrupou as populações do estado de São Paulo até o nordeste, sendo sugerido fluxo gênico entre as populações do estado de São Paulo e Rio de Janeiro, mas isolamento entre estas e as populações de Mucuri, litoral Sul da Bahia. Estas divisões populacionais coincidem com a divisão da costa em macrocompartimentos geológicos, sugerindo eventos de isolamento geográfico na diferenciação de suas populações (Morales, 2005).

Considerando a distribuição geográfica de *D. serido*, foram propostas duas hipóteses para a sua ocorrência no nordeste e ao longo da costa atlântica brasileira (De Brito *et al.*, 2002). Em uma delas, as populações teriam expandido suas áreas de ocorrência do nordeste em direção ao sul pelo litoral e, devido a eventos vicariantes, teriam se tornado populações isoladas e diferenciadas; a outra possibilidade considera eventos independentes de colonização da costa a partir de populações do interior, especialmente da Serra do Espinhaço, através dos vales de rios que formam um corredor de dispersão, conectando as populações do interior do Brasil à costa atlântica (Manfrin e Sene, 2006).



**Figura 1.** Distribuição geográfica conhecida de populações das espécies *Drosophila serido* (em azul), *Drosophila antonietae* (em vermelho) e as duas espécies em simpatria (em margenta).

### 1.5- A Espécie *Drosophila antonietae*

As populações de *Drosophila antonietae* (Tidon-Sklorz e Sene, 2001) ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil e ao norte da borda leste do Chaco Argentino (Silva e Sene, 1991) (Figura 1). Possuem o morfotipo “D” de edeago e estão associadas principalmente ao cacto *Cereus hildmaniannus* (Pereira *et al.*, 1983), embora, em localidades do litoral do Rio Grande do Sul, Ruiz *et al.* (2000) já tenham identificado indivíduos desta espécie emergindo de *Opuntia monacantha*.

As informações de marcadores independentes sugerem a existência de fluxo gênico entre as populações desta espécie (Monteiro e Sene, 1995; Tidon-Sklorz e Sene, 2001; Machado, 2003; Mateus e Sene, 2003). Segundo estes autores, o fato dessas populações estarem associadas ao cacto *Cereus hildmaniannus*, que está

distribuído, principalmente, ao longo do curso dos rios, possibilitaria a existência de fluxo gênico entre as populações de *D. antonietae*, homogeneizando suas populações.

Como as populações de *Drosophila serido*, as populações de *Drosophila antonietae* apresentam a inversão cromossômica fixa  $2x^7$  (Ruiz *et al.*, 2000). As inversões cromossômicas polimórficas encontradas foram:  $2y^8$ ,  $2z^8$  e 5e (Ruiz *et al.*, 2000). O arranjo cromossômico  $2x^7y^8$  foi encontrado nas populações de Sertãozinho-SP, Campinas-SP, Rio Ligeiro-PR, Santiago-RS e Guaritas-RS, sendo que nessas duas últimas localidades também foi observada a ocorrência da inversão 5e. O arranjo cromossômico  $2x^7z^8$  foi encontrado nas populações de Campinas-SP, Santiago-RS, Guaritas-RS, Osório-RS, Tramandaí-RS, Arroio Teixeira-RS e Capão da Canoa-RS (Ruiz *et al.*, 2000). Todas as populações analisadas até o momento apresentam placa metafásica tipo V (Baimai *et al.*, 1983).

A análise da diversidade haplotípica mitocondrial do gene citocromo oxidase I sugeriu a divisão das populações de *Drosophila antonietae* em dois grupos: um formado por populações da área norte da distribuição da espécie e outro formado por populações da área sul, incluindo o interior e a costa dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Inferências filogeográficas sugeriram expansão de área de ocorrência das populações, a partir do interior do estado do Rio Grande do Sul em direção à costa atlântica brasileira, colonizando o litoral do estado do Rio Grande do Sul, e expansão da área de ocorrência em direção ao norte, colonizando o litoral do estado de Santa Catarina, seguindo as populações de cactos pelas dunas desses dois estados brasileiros (De Brito *et al.*, 2002a).

#### **1.6- Zona de Contato Secundário entre *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae***

As espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* são alopátricas na maior parte de suas áreas de ocorrência. Entretanto, análises de populações de *Drosophila*, na região costeira dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, identificaram uma área de contato entre elas, devido à observação de indivíduos, em simpatria, com inversões polimórficas características de cada uma destas espécies (Ruiz *et al.*, 2000). Além destes dados, análises dos edeagos de indivíduos destas populações mostraram a presença de um tipo morfológico intermediário entre os morfotipos A e D, característicos das espécies *D. serido* e *D. antonietae*,

respectivamente (Cansian e Sene, 2000). A análise conjunta destes marcadores independentes sugeriu que esta região é uma área de contato secundário, com formação de híbridos entre as duas espécies (Manfrin e Sene, 2006). Para o entendimento da dinâmica evolutiva desta região, posteriormente, suas populações foram analisadas através de variabilidade eletroforética de proteínas e haplotípica de DNA mitocondrial.

A análise da variabilidade eletroforética de proteínas mostrou uma alta similaridade entre as populações dessa região (Morales, 2001). Porém, as análises das proteínas isocitrato desidrogenase (IDH) e peptidase (PEP) mostraram a presença, mutuamente exclusiva, de homozigotos para alelos diagnósticos da espécie *D. serido* e *D. antonietae* (Morales, 2001, 2005; Mateus e Sene, 2007).

As análises da variação haplotípica do DNA mitocondrial mostraram a presença de haplótipos mitocondriais característicos de *D. serido*, pelo litoral, até a localidade de Arroio Teixeira-RS, e a presença de haplótipos mitocondriais característicos de *D. antonietae* até a localidade de Governador Celso Ramos-SC. Entre estas duas localidades, estes haplótipos em simpatria foram encontrados nas localidades de Governador Celso Ramos-SC, Florianópolis-SC, Garopaba-SC e em Arroio Teixeira-RS. As populações de *D. antonietae* de Garopaba, Laguna, Governador Celso Ramos e Florianópolis, em uma análise genealógica, formaram um clado considerado jovem, em processo de espalhamento geográfico pelo litoral, a partir do Rio Grande do Sul (Morales, 2005).

Ruiz *et al.* (2000) observaram que seis linhagens da localidade da Praia da Joaquina (Florianópolis-SC) eram monomórficas para o arranjo  $2x^7y^9x^8w^8$ , característico de *D. serido*. No mesmo trabalho, a análise dos cromossomos metafásicos mostrou linhagens com placas metafásicas V (Baimai *et al.*, 1983), características de *D. antonietae*. Assim, concluiu-se que as populações de Florianópolis-SC eram formadas por indivíduos com inversões cromossômicas de *D. serido* e indivíduos com placas metafásicas de *D. antonietae*.

Biffi *et al.* (2001) ampliaram as análises metafásicas, estudando 11 isolinhagens da localidade de Florianópolis-SC, e observaram que 10 destas apresentavam placa metafásica V, característica de *D. antonietae*, e apenas uma apresentava um novo tipo de metafásico, que difere do tipo V por apresentar microcromossomos maiores e pelo cromossomo Y submetacêntrico. Em nenhuma das linhagens analisadas foi encontrada placa metafásica heterocariotípica.

Estas informações sugerem uma área de contato de aproximadamente 130 quilômetros de distância ao longo da costa atlântica brasileira. A análise concomitante destes dados sugere que esta área de contato foi estabelecida pela colonização do litoral sul por populações da espécie *D. serido*, a partir da região nordeste brasileira, encontrando populações da espécie *D. antonietae*, que colonizaram esta região a partir do interior do estado do Rio Grande do Sul, em direção ao norte (De Brito *et al.*, 2002; Morales, 2005; Manfrin e Sene, 2006). Provavelmente, a colonização deste litoral por estas duas espécies é recente, pois as planícies costeiras foram formadas com as regressões e transgressões marinhas dos últimos 10.000 anos (Vilwoc *et al.*, 1986), sendo que a última transgressão marinha ocorreu há 5.100 anos (Hesp *et al.*, 2007).

Considerando todas as informações disponíveis, esta região do litoral do Brasil foi descrita como uma área de contato secundário entre as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*. Para a localidade de Florianópolis-SC, foi elaborada a hipótese de região de simpatria entre estas espécies, sem formação de híbridos. Desta forma, a análise concomitante de vários marcadores, que possuam informações diagnósticas para cada espécie, unindo informações históricas e recentes de um mesmo indivíduo, é uma estratégia importante para a identificação e avaliação da hipótese de simpatria e possíveis eventos de introgressão, atuais ou passados, que determinaram a dinâmica desta área de contato.



## 2- OBJETIVOS

- Caracterizar as populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* da localidade de Florianópolis-SC, através da variação morfológica da asa e do edeago, de haplótipos mitocondriais e por análise eletroforética da proteína isocitrato desidrogenase (IDH).
- Avaliar indícios de possíveis hospedeiros preferenciais para oviposição das espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, com relação aos cactos *Opuntia monacantha* e *Cereus hildmaniannus*, na localidade de Florianópolis-SC.
- Identificar possíveis eventos de hibridação e introgressão para caracterizar a dinâmica populacional envolvida na presente área de contato.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Material Biológico

Os indivíduos analisados durante o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos em duas coletas: em março de 2003 e em dezembro de 2006, na localidade de Florianópolis-SC (27°06'30"S, 45°41'50"W).

Na coleta de março de 2003 (código N8), os indivíduos foram coletados utilizando-se armadilhas fechadas, contendo como isca uma mistura de banana, laranja e fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), colocadas próximas às cactáceas, onde permaneceram por dois ou três dias. Após este período, com auxílio de rede entomológica, os indivíduos foram coletados e transferidos para frascos de vidro, contendo meio de cultura. No laboratório, os indivíduos machos foram identificados por análise morfológica da terminália masculina (edeago) (Vilela, 1983).

Na coleta de dezembro de 2006, foram coletados cinco cladódios em decomposição: 4 da espécie *Opuntia monacantha* (códigos N59cac1, N61cac6, N61cac7 e N61cac8) e 1 da espécie *Cereus hildmaniannus* (código N61cac5). Os cladódios foram levados para o laboratório, envoltos individualmente em jornais e devidamente identificados. No laboratório, estes cladódios, colocados em terrários, foram observados para registro da emergência de moscas. As moscas que emergiram destes cladódios foram retiradas com aspirador, identificadas e congeladas para as análises posteriores.

Cada indivíduo foi caracterizado através da variação morfológica da asa e do edeago, seqüências do DNA mitocondrial e por análise eletroforética da proteína isocitrato desidrogenase (IDH).

Para a reclassificação dos indivíduos nas análises discriminantes das asas e dos edeagos, foram incluídos nas análises, como referência, 20 indivíduos de Milagres-BA (12°52'12"S, 39°51'32"W) e 20 de Serrana-SP (21°15'00"S, 47°34'00"W), localidades-tipo de *D. serido* e *D. antonietae*, respectivamente.

## 3.2- Análise Eletroforética

### 3.2.1- Preparação das Amostras

Nas análises eletroforéticas, foram utilizados abdômen e tórax de 147 indivíduos. Os espécimes de *Drosophila* foram macerados individualmente em 30 µL de água destilada e deionizada; este homogeneizado foi absorvido por um papel de filtro (4 X 7 mm) e aplicado em um gel de penetrose 14%, com dimensões de 24 cm x 11 cm x 8 mm, utilizando o sistema eletroforético TC1 (Seção 3.2.2). Em cada gel foram colocadas 25 amostras, sendo três provenientes de indivíduos da isolinhagem J92A91M, da espécie *D. serido*, caracterizada pelos alelos 1,05/1,05 (Morales, 2001) e três da isolinhagem J41P1M, da espécie *D. antonietae*, caracterizada pelos alelos 1,00/1,00 (Mateus e Sene, 2007), utilizados como referência para o posicionamento e identificação dos eletromorfos.

As amostras foram submetidas à eletroforese, em câmara fria, durante 5 horas; a voltagem foi mantida constante na fonte a partir do momento em que atingiu um valor de 3 V/cm no gel. A miliamperagem na fonte foi variável.

Com o auxílio de espaçadores e o uso de um fio de nylon, o gel foi cortado ao meio. Uma fatia foi retirada e transferida para um recipiente de vidro, para receber a solução contendo o substrato e os corantes específicos para a enzima. Após a aplicação do corante, o gel foi transferido para uma estufa a 38°C, sem luz por, aproximadamente, 10 minutos. O gel foi digitalizado e a imagem armazenada em computador.

Posteriormente, a identificação dos indivíduos, por meio das análises eletroforéticas, foi testada, com base na variação morfológica dos caracteres asa e edeago.

### 3.2.2- Sistema Eletroforético

O sistema eletroforético utilizado foi TC1 (modificado de Castanheira e Contel, 1995), sendo constituído por:

- tampão de eletrodos: Tris-Citrato pH 7,2 (Tris 0,340 M; Ácido Cítrico 0,103 M).
- tampão do gel: Tris-Citrato pH 7,6 (Tris 0,022 M; Ácido Cítrico 0,006 M).

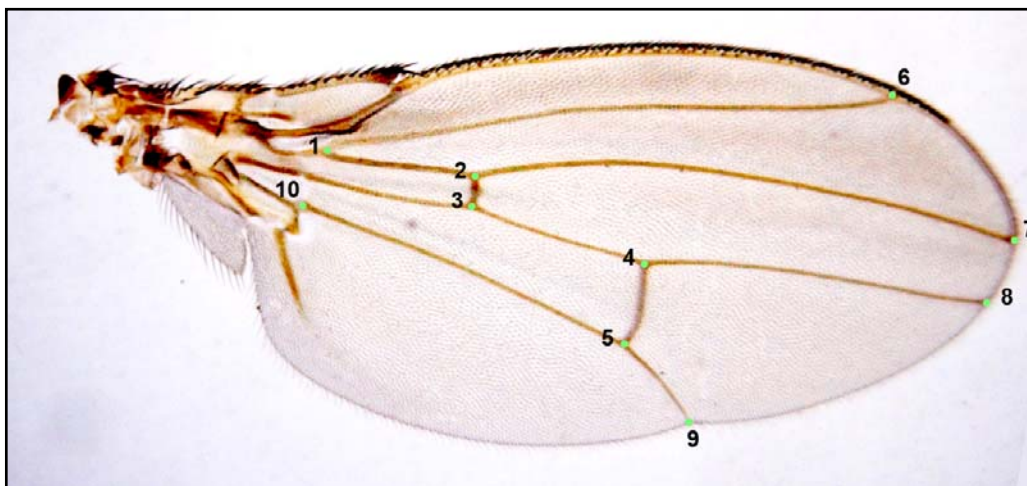
### 3.2.3- Sistema Enzimático

O sistema enzimático utilizado foi isocitrato desidrogenase (IDH), que consiste em: 10 mL de tampão Tris-HCL 0,1 M, pH 7,5; 10 mg de ácido DL-isocítrico; 2 mg de NADP; 2 mg de MTT; 1000 µl de MgCL<sub>2</sub> 1%; 0,6 mg de PMS; 3 mg de EDTA e solução aquosa de ágar 2% até dobrar o volume.

### 3.3- Análise Morfométrica das Asas

Foram utilizadas 138 asas direitas, de indivíduos machos, nas análises de morfometria geométrica. As asas foram dissecadas e fixadas em lâminas histológicas, sob lamínulas, vedadas com esmalte e, depois, visualizadas em um microscópio (Axioplan2 Zeiss). As imagens, ampliadas 50X, foram digitalizadas, utilizando o sistema de captura de imagem digital Axiovision Zeiss, e armazenadas em um computador.

Através do programa *TPSdig* 1.31 (Rohlf, 2001), foram digitalizados dez pontos de referência em cada asa (Figura 2). As variáveis de forma foram obtidas com a utilização do método de Procrustes mínimos quadrados generalizados (Rohlf e Slice, 1990; Bookstein, 1991, 1996; Rohlf e Marcus, 1993; Auffray *et al.*, 1996; Dryden e Mardia, 1998; Klingenberg *et al.*, 2002), que elimina variações no tamanho, posição e orientação. Retirando-se esses três efeitos, as diferenças observadas puderam ser atribuídas somente à forma. Através do programa *TPSRelw* (Rohlf 2003), 16 deformações relativas (relative warps) foram geradas, sendo, então, utilizadas como variável independente nas análises morfométricas. Foi utilizada uma única medida de tamanho, o centróide, calculado através da raiz quadrada da soma da distância ao quadrado entre cada ponto de referência e o centróide de cada asa (Dryden e Mardia, 1998).



**Figura 2.** Imagem representativa da asa de *Drosophila serido*, mostrando a seqüência dos 10 pontos de referência marcados em cada asa. Imagem ampliada 50X.

### 3.4- Análise Morfométrica dos Edeagos

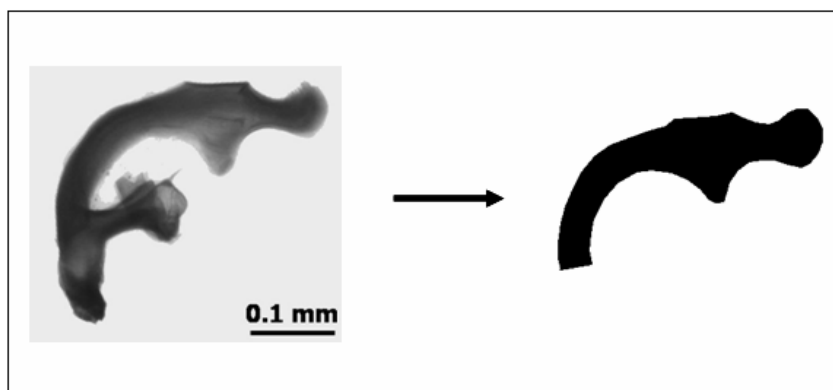
Foram utilizados 142 edeagos para as análises morfométricas. A preparação de lâminas permanentes dos edeagos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Kaneshiro (1969). A genitália masculina (*hipandrium*, *epandrium* e *aedeagus*), retirada da extremidade do abdômen da mosca, foi colocada em uma solução de KOH 10%, e submetida à fervura (banho-maria) durante 15 minutos. Posteriormente, o material foi lavado com água destilada. Para a coloração, a genitália foi transferida para uma solução de Gage (fuccina ácida e ácido acético glacial (4:1) e submetida à fervura (banho-maria) por dois minutos, sendo, finalmente, lavada com etanol 95%. Após estes procedimentos, a genitália foi dissecada e o edeago isolado foi colocado sobre uma gota de Bálsamo do Canadá, previamente depositada na lâmina. Sobre este material, foi colocada uma lamínula, a qual foi pressionada levemente para se obter a posição lateral do edeago na lâmina. Os edeagos foram visualizados em um microscópio (Axioplan2 Zeiss). As imagens, ampliadas 100X, foram digitalizadas, utilizando o sistema de captura de imagem digital Axiovision Zeiss, e armazenadas em um computador. As imagens digitais dos edeagos foram contornadas em um editor de imagens (Jasc Paint Shop Pro 8). Foi considerada nas análises a parte distal do edeago, que é a porção do órgão efetivamente envolvida na cópula, por se tratar da região mais variável da estrutura (Figura 3).

Para a quantificação morfológica, foi realizada a análise elíptica de Fourier, utilizada no estudo de contornos fechados complexos (Kuhl e Giardina, 1982). Em linhas gerais, esta técnica ajusta cada contorno, através de uma soma

potencialmente infinita de funções trigonométricas (senos e cossenos) de comprimento de onda decrescentes, denominadas harmônicas, cada qual composta por quatro coeficientes. O método propõe a decomposição do contorno pela variação em coordenadas  $x$  e  $y$ , separadamente, como funções paramétricas da distância em corda cumulativa ( $t$ ) ao longo do contorno. Estas duas variáveis são, então, expandidas como séries de Fourier.

A orientação do tamanho e da forma do contorno foi padronizada de acordo com o tamanho e alinhamento da primeira elipse da harmônica, que corresponde à primeira aproximação de Fourier para a informação do contorno (Lestrel, 1997). Desta forma, a representação da estrutura analisada é baseada somente nas propriedades internas do contorno (a forma).

O número de harmônicas consideradas na análise define a precisão da descrição do contorno (Liu *et al.*, 1996). Foram consideradas 25 harmônicas, compostas por 100 coeficientes, os quais foram utilizados em uma matriz de variância e covariância na análise de componentes principais, que permite uma sumarização das informações, acessadas nos coeficientes, e a redução da dimensionalidade das variáveis em um número menor de componentes principais (PC). Cada PC é considerado uma variável quantitativa de forma, e foi utilizada como variável independente na análise morfométrica. Apenas os componentes principais que explicaram mais de 1% da variação da forma foram considerados. A área do contorno foi utilizada como medida de tamanho. Os coeficientes de Fourier e as variáveis quantitativas foram obtidos utilizando-se o programa SHAPE 1.2 (Iwata e Ukai, 2002).



**Figura 3.** Vista lateral de edeago de *Drosophila serido* e a área do contorno da porção do órgão considerada na análise discriminante.

### 3.5- Análises Estatísticas

Os dados de morfometria geométrica foram processados mediante análises discriminantes lineares no software STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2001) e SPSS 15.0 (SPSS Inc.), para detectar o grau de divergência morfológica entre os indivíduos, através das medidas geradas. A análise discriminante foi realizada através de três testes. O teste de Wilk's  $\lambda$  verificou a significância estatística da discriminação entre os grupos, tratando-se de um teste geral para verificar a diferença entre o conjunto de medidas; quanto menor o valor do Wilk's  $\lambda$  (variando entre 0 e 1) gerado pelo teste, maior será o grau de separação dos grupos. Outro teste fornecido pela análise foi a taxa de autoclassificação. Neste teste, foi fornecida a taxa de classificação correta dos indivíduos, em seus respectivos grupos de origem, com base unicamente na média multivariada de suas medidas. Um terceiro teste foi a análise discriminante com procedimento *stepwise*. Este teste verificou quais são as variáveis mais importantes na discriminação dos grupos.

### 3.6- DNA Mitocondrial

#### 3.6.1- Indivíduos Amostrados

Para as análises da variação haplotípica do DNA mitocondrial, foram selecionados 12 indivíduos, cujas análises aloenzimáticas e morfológicas foram congruentes, classificando-os como *D. serido* ou *D. antonietae*. Além destes, foram selecionados 5 indivíduos que apresentaram alguma incongruência com relação a estes marcadores (mais detalhes no apêndice B). Como referência, foram incluídas nas análises 179 seqüências de *D. serido* e *D. antonietae* de Morales (2005). (Apêndice A).

#### 3.6.2- Extração de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de cabeças de indivíduos machos, isoladamente. Em um tubo de microcentrifuga, contendo 120  $\mu$ L de EDTA, 0,5 M e 500  $\mu$ L de solução de lise de núcleo (Promega), o indivíduo foi macerado e homogeneizado. Depois de adicionados 18  $\mu$ L de Proteinase K 20 mg/mL ao homogeneizado, a amostra foi incubada à 65°C por duas horas. Após este período, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de precipitação de proteínas (Promega) à amostra, que foi agitada

vigorosamente por 20 segundos. O tubo de microcentrífuga, contendo a amostra, foi colocado no gelo por cinco minutos e, em seguida, centrifugado por quatro minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo tubo contendo 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, sendo centrifugado a 14.000 rpm por um minuto para a precipitação do DNA. Para lavagem do DNA, foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e a amostra centrifugada a 14.000 rpm por mais um minuto. O etanol foi descartado e, depois de totalmente seco, o DNA foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de água bi-destilada autoclavada, e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6.3- Isolamento do Gene Mitocondrial COI

O gene mitocondrial da Citocromo Oxidase I (COI) foi isolado e amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi feita em um Termociclador PE Applied Biosystems (DNA Thermal Cyclor 480). Cada amostra continha, em média, 2  $\mu\text{L}$  de DNA; 200  $\mu\text{M}$  de dNTP; 0,4  $\mu\text{M}$  de cada um dos *primers*; 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão; 1U de *Taq* polimerase (Promega) e água estéril para completar 15  $\mu\text{L}$  de volume final.

Os pares de *primers* utilizados para amplificar e seqüenciar o gene COI foram TY-J-1460: 5'TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC3' (*forward*) e C1-N-2191: 5'CCCGGTAAAATTTAAATATAAACTTC3' (*reverse*) (Simon *et al.*, 1994). As condições da PCR para amplificação foram: 1 min 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$  e 30 ciclos de 40 s a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 40 s a  $46^{\circ}\text{C}$  e 2 min a  $72^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6.4- Eletroforese em Gel de Agarose 0,8%

O resultado da amplificação foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para a preparação do gel, 0,8 g de agarose foi diluída em 100 mL de Tampão TBE 1X a  $100^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente. A solução foi despejada sobre placa horizontal, e após a solidificação do gel, a placa foi transferida para a cuba de eletroforese, contendo o mesmo tampão de fusão da agarose. A eletroforese foi realizada em 80 mA, durante cerca de uma hora. O gel foi corado com uma solução de brometo de etídio em tampão TBE 1X. O DNA contido no gel foi visualizado por meio de exposição à luz UV, utilizando-se um transiluminador.



### 3.6.5- Purificação dos Fragmentos de DNA para Seqüenciamento

Os produtos da PCR do gene mitocondrial COI foram purificados com o conjunto de reagentes *ExoSAP-IT* (Amersham Biosciences Part of GE Healthcare), seguindo-se as instruções do fabricante. Para cada 5 µL do produto da PCR, foram adicionados 2 µL de *ExoSAP-IT*. Em seguida, essa mistura foi submetida a banho térmico nas seguintes condições: 15 min a 37°C e 15 min a 80°C.

### 3.6.6- Seqüenciamento Direto

Para a reação de seqüenciamento, foi usado o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), que utiliza o protocolo de seqüenciamento de Sanger *et al.* (1977). Cada amostra a ser seqüenciada continha 2,0 µL de BigDye, o qual contém os nucleotídeos e as enzimas necessárias à reação; 7 µL de DNA purificado e 3 µL de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*).

As amostras foram submetidas à PCR nas seguintes condições: 2 s a 96°C e 25 ciclos de 10 s a 96°C; 5 s a 50°C e 4 min a 60°C.

A reação de precipitação envolveu várias lavagens do DNA. Primeiramente, foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% aos tubos de microcentrífuga, contendo as reações de seqüenciamento, que foram agitados e deixados em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, cada amostra foi centrifugada à 14.000 rpm por 45 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, cada tubo recebeu 200 µL de etanol 70% resfriado, sendo novamente agitados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA novamente lavado com etanol 70% resfriado. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C, até a completa evaporação do álcool.

As amostras foram seqüenciadas em um seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377.

### 3.6.7 – Análises das Seqüências de DNA

As seqüências obtidas foram comparadas, corrigidas e editadas manualmente com o auxílio do programa CHROMAS LITE versão 2.0. Os alinhamentos múltiplos das seqüências foram gerados no programa CLUSTAL W versão 1.8 (Thompson *et al.*, 1994).

As análises comparativas foram feitas tendo como base seqüências previamente obtidas para as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Apêndice A). As redes de haplótipos foram construídas pelo programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Variabilidade Alélica da Aloenzima IDH

Foram analisados 66 indivíduos coletados na natureza (código N8), dos quais 62 eram homozigotos para o alelo 1,05, característico de *Drosophila serido*, e 4 eram homozigotos para o alelo 1,00, característico de *Drosophila antonietae* (Tabela 1, Figura 4).

Do cladódio em decomposição do cacto *Cereus hildmaniannus*, emergiram 47 indivíduos, sendo que 41 foram caracterizados pelo alelo 1,05 e 6 pelo alelo 1,00 (Tabela 2).

Dos 4 cladódios de *Opuntia monacantha*, emergiram 34 indivíduos, todos caracterizados pelo alelo 1,05 (Tabela 2).

Não foram observados indivíduos heterozigotos para os alelos 1,00 e 1,05 do gene da IDH.

**Tabela 1.** Número de indivíduos analisados, localidade de procedência e seus respectivos genótipos e freqüências para a enzima isocitrato desidrogenase (IDH).

Localidade	Código	Genótipos	Freqüência	Nº de indivíduos
Florianópolis-SC	N8	1,00/1,00	0,06	4
		1,05/1,05	0,94	62
<b>Total</b>				66

**Tabela 2.** Genótipos e freqüências dos indivíduos que emergiram dos cactos *Cereus hildmaniannus* e *Opuntia monacantha*, da localidade de Florianópolis-SC.

Código	Cacto	Genótipos	Freqüência	Nº de Indivíduos
N59cac1	<i>Opuntia monacantha</i>	1.05/1.05	1,00	5
N61cac6	<i>Opuntia monacantha</i>	1.05/1.05	1,00	3
N61cac7	<i>Opuntia monacantha</i>	1.05/1.05	1,00	7
N61cac8	<i>Opuntia monacantha</i>	1.05/1.05	1,00	19
N61cac5	<i>Cereus hildmaniannus</i>	1.05/1.05	0,93	41
		1.00/1.00	0,07	6
<b>Total</b>				81



**Figura 4.** Imagem digitalizada de gel de penetrose 14%, após reação para marcadores da enzima isocitrato desidrogenase (IDH). Os poços 1, 12, 18 e 24 representam os alelos 1,00/1,00, característicos da espécie *Drosophila antonietae*. Os poços 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23 e 25 representam os alelos 1,05/1,05, característicos da espécie *Drosophila serido*.

#### 4.2- Análise Morfométrica das Asas

Foi analisada a variação morfológica das asas de 138 indivíduos machos, através de análises discriminantes. Para isso, foram geradas 16 Deformações Relativas (Relative Warps), pelo programa *TPSRe/w*, que foram capazes de explicar 100% da variação total da forma das asas e foram utilizadas como variáveis independentes nas análises multivariadas. As Deformações Relativas 1, 2, 3, 7, 8, 11, 13 e 15 foram significativas para a discriminação das espécies, como representado pela tabela 3.

De acordo com a análise de variância multivariada (MANOVA), diferenças significativas foram encontradas entre as espécies (Wilks' Lambda: 0,40619,  $p < 0,00001$ ). As funções lineares discriminantes geradas foram capazes de classificar corretamente 96,4% de todos os indivíduos (Tabela 4) e 92,1% dos indivíduos foram corretamente identificados nos testes de validação cruzada (Tabela 5).

**Tabela 3.** Variáveis (Deformações Relativas), geradas pelo programa *TPSRelw*, utilizadas nas análises discriminantes das asas; valores dos testes de Wilk e nível de significância (p); proporção de variação independente e variação cumulativa das variáveis. Em destaque, estão representadas as variáveis que foram significativas para a discriminação das espécies *D. serido* e *D. antonietae*. Wilks' Lambda: 0,40619,  $p < 0,00001$ .

Variável	Wilks' - Lambda	p-level	Varição (%)	Cumulativo (%)
RelW1	0,477734	0,000011	35,49%	35,49%
RelW2	0,497519	0,000001	20,87%	56,36%
RelW3	0,433468	0,005318	12,96%	69,32%
RelW4	0,418644	0,05744	9,46%	78,78%
RelW5	0,407195	0,586231	5,43%	84,20%
RelW6	0,407629	0,515225	4,15%	88,35%
RelW7	0,517	0,0000001	2,49%	90,84%
RelW8	0,508767	0,0000001	2,20%	93,04%
RelW9	0,407467	0,539756	1,62%	94,65%
RelW10	0,416827	0,078782	1,32%	95,97%
RelW11	0,423147	0,027038	1,16%	97,14%
RelW12	0,406488	0,766271	1,00%	98,13%
RelW13	0,423455	0,025712	0,75%	98,89%
RelW14	0,41547	0,100338	0,50%	99,39%
RelW15	0,419882	0,046522	0,39%	99,78%
RelW16	0,406197	0,956903	0,22%	100,00%

**Tabela 4.** Reclassificação correta de indivíduos, de acordo com as análises discriminantes das asas. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual de indivíduos corretamente classificados. 96,4% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

	<i>D. serido</i>	<i>D. antonietae</i>
<i>D. serido</i>	108 (98,2%)	2 (1,8%)
<i>D. antonietae</i>	3 (10,3%)	26 (89,7%)

**Tabela 5.** Identificação de indivíduos, por validação cruzada, de acordo com a análise discriminante das asas. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual de indivíduos corretamente classificados. 92,1% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

	<b><i>D. serido</i></b>	<b><i>D. antonietae</i></b>
<b><i>D. serido</i></b>	103 (93,6%)	7 (6,4%)
<b><i>D. antonietae</i></b>	4 (13,8%)	25 (86,2%)

#### 4.2.1- Análise Discriminante das Populações

Para esta análise, foi feita uma comparação entre as asas das populações de *D. serido* e *D. antonietae*, da localidade de Florianópolis, com as populações de suas respectivas localidades-tipo.

A figura 5 representa a distribuição gráfica que combina os valores de cada indivíduo, gerados pela análise discriminante, sobre as medidas morfométricas das asas das populações analisadas.

As funções lineares discriminantes geradas foram capazes de classificar corretamente 92% de todos os indivíduos (Tabela 6) e 86,2% dos indivíduos foram corretamente identificados nos testes de validação cruzada (Tabela 7). (Wilks' Lambda: 0,1297;  $p < 0,00001$ ).

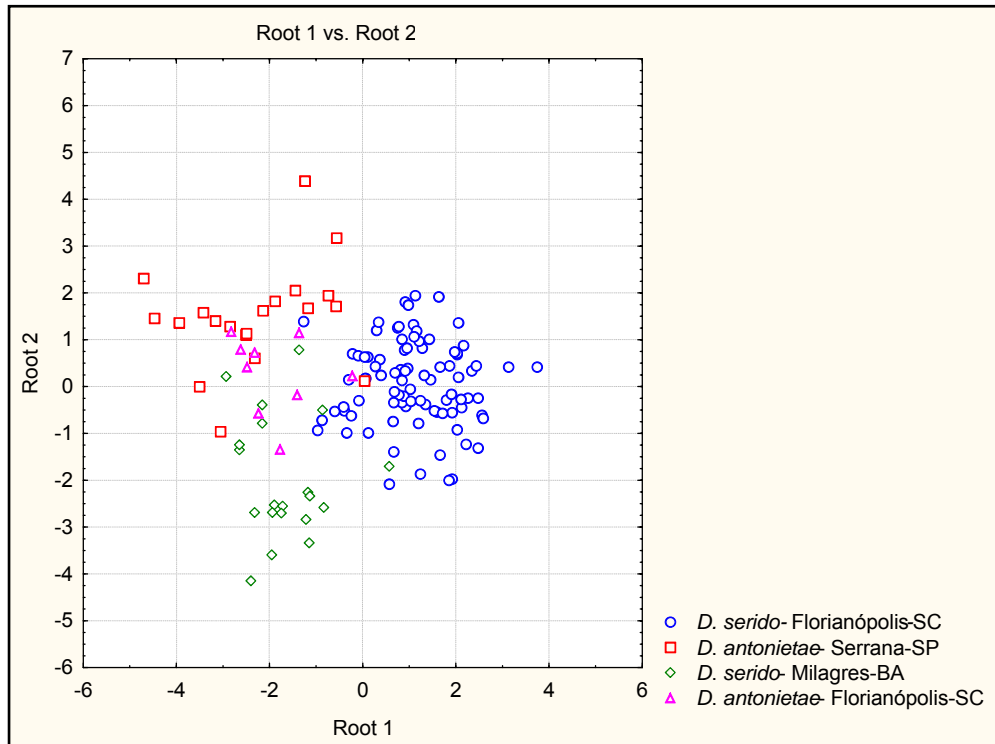
A figura 6 representa a variabilidade da morfologia das asas das populações, calculada a partir das deformações relativas (RelW) 1, 2 e 3. A população de *D. serido* de Florianópolis apresentou uma variabilidade menor em relação à população de Milagres, e de acordo com RelW 1 e 3, a variabilidade destas duas populações se sobrepõe. A população de *D. antonietae* de Florianópolis apresentou uma variabilidade maior em relação à população de Serrana. Foi observada sobreposição na variabilidade morfológica das asas das populações de *D. serido* e *D. antonietae* nas 3 variáveis.

**Tabela 6.** Reclassificação correta dos indivíduos, de acordo com as análises discriminantes das asas. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual dos indivíduos corretamente classificados. 92% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

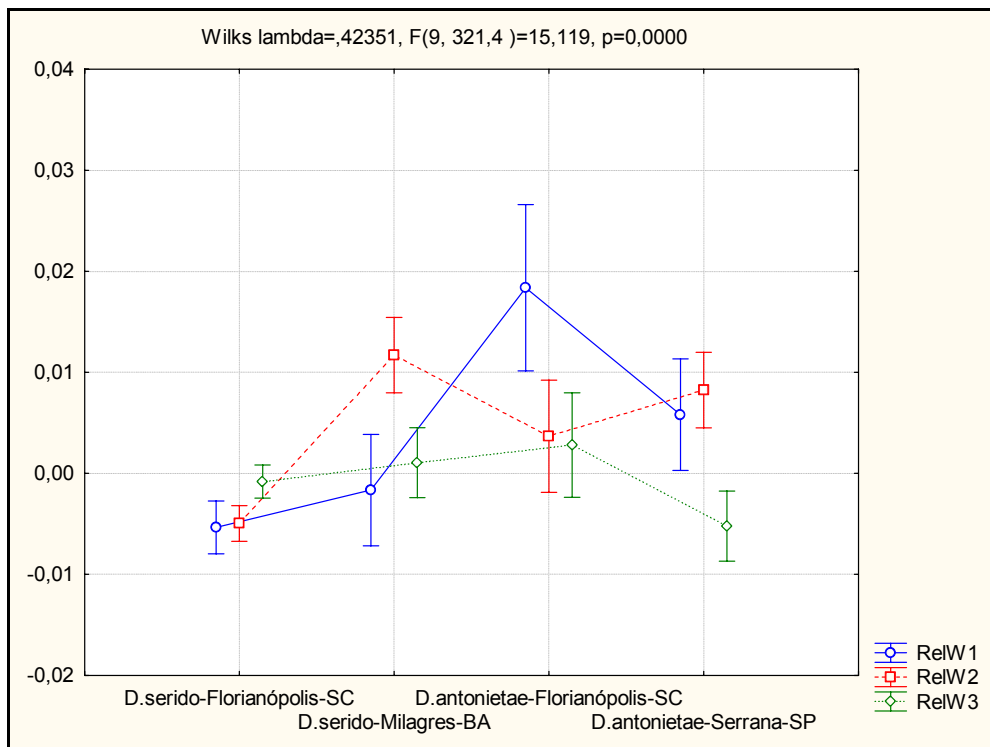
	<i>D. serido</i> Milagres-BA	<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC
<i>D. serido</i> Milagres-BA	16 (80%)	2 (10%)	2 (10%)	0 (0%)
<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	2 (2,2 %)	86 (96,6%)	1 (1,1%)	0 (0%)
<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	1 (5%)	2 (10%)	17 (85%)	0 (0%)
<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC	0 (0%)	1 (11,1%)	0 (0%)	8 (88,9%)

**Tabela 7.** Identificação de indivíduos, por validação cruzada, de acordo com as análises discriminantes das asas. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual de indivíduos corretamente classificados. 86,2% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

	<i>D. serido</i> Milagres-BA	<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC
<i>D. serido</i> Milagres-BA	14 (70%)	2 (10%)	4 (20%)	0 (0%)
<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	3 (3,4 %)	84 (94,4%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)
<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	2 (10%)	3 (15%)	15 (75%)	0 (0%)
<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC	0 (0%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	6 (66,7%)



**Figura 5.** Diagrama com a distribuição gráfica dos valores individuais, gerados pela análise discriminante, sobre as medidas morfométricas das asas das populações analisadas.



**Figura 6.** Representação gráfica da variabilidade da morfologia da asa das populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* de Florianópolis-SC e das respectivas localidades-tipo, calculada a partir das deformações relativas 1, 2 e 3. As barras verticais indicam um intervalo de confiança de 95%.



### 4.3- Análise Morfométrica dos Edeagos

Foi analisada a variação morfológica dos edeagos de 142 indivíduos, através de análises discriminantes. Para isso, foram gerados 96 componentes principais (PCs) independentes, pelo programa SHAPE 1.2. Foram utilizados 10 PCs, que juntos explicaram 93,19% da variação total da forma dos edeagos (Tabela 8). A figura 7 representa as variações da forma dos contornos dos edeagos de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, calculadas a partir dos 10 componentes principais.

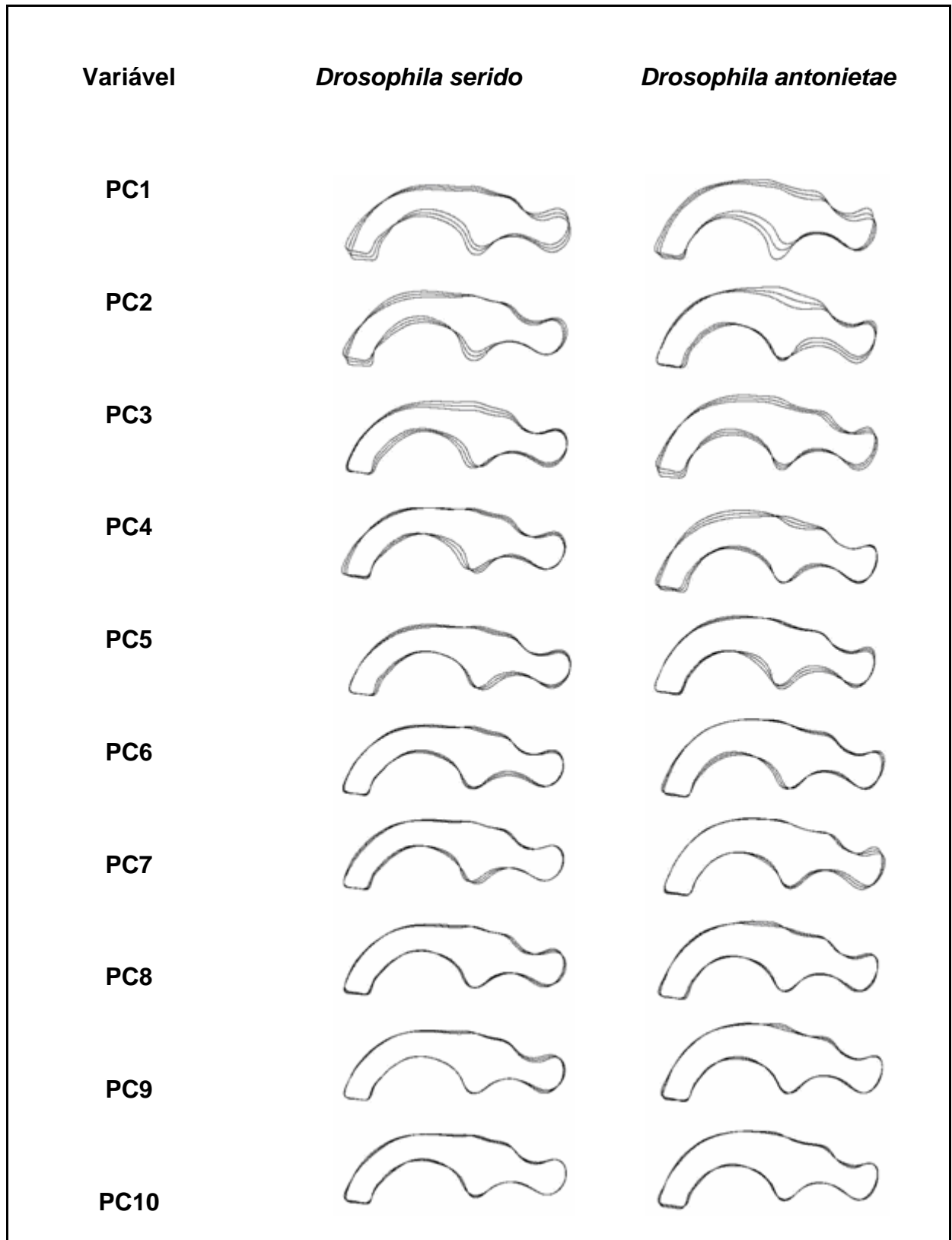
De acordo com a MANOVA, diferenças significativas foram encontradas entre as espécies (Wilks' Lambda: 0,26836;  $p < 0,00001$ ). As funções lineares discriminantes geradas e os testes de validação cruzada foram capazes de classificar corretamente 97,2% de todos os indivíduos (Tabela 9).

**Tabela 8.** Relação dos 10 componentes principais (PCs), gerados pelo programa SHAPE 1.2, utilizados nas análises discriminantes dos edeagos; valores dos testes de Wilk e nível de significância (p); proporção de variação independente e variação cumulativa dos PCs. Em destaque, estão representadas as variáveis que foram significativas para a discriminação das espécies *D. serido* e *D. antonietae*. Wilks' Lambda: 0,26836,  $p < 0,00001$ .

Variável	Wilks' - Lambda	p-level	Variação (%)	Cumulativo (%)
PC1	0,276483	0,049325	30,9681	30,9681
PC2	0,283332	0,008001	23,2163	54,1844
PC3	0,51947	0,0000001	13,9053	68,0897
PC4	0,301201	0,000110	8,0893	76,179
PC5	0,284577	0,005834	6,8063	82,9853
PC6	0,276201	0,053381	3,2838	86,2691
PC7	0,268356	0,989603	2,2581	88,5271
PC8	0,275343	0,068069	1,9534	90,4805
PC9	0,270141	0,354087	1,5262	92,0068
PC10	0,292529	0,000831	1,1787	93,1855

**Tabela 9.** Identificação dos indivíduos, por validação cruzada, de acordo com as análises discriminantes dos edeagos. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual de indivíduos corretamente classificados. 97,2% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

	<b><i>D. serido</i></b>	<b><i>D. antonietae</i></b>
<b><i>D. serido</i></b>	111 (99,1%)	1 (0,9%)
<b><i>D. antonietae</i></b>	3 (10%)	27 (90%)



**Figura 7.** Variação da forma dos contornos dos edeagos de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, calculada a partir dos 10 componentes principais, com sobreposição do formato médio e desvio padrão de cada PC.

### 4.3.1- Análise Discriminante das Populações

As funções lineares discriminantes dos edeagos foram capazes de classificar corretamente 88% de todos os indivíduos (Tabela 10) e 82,4% dos indivíduos foram corretamente identificados nos testes de validação cruzada (Tabela 11). (Wilks' Lambda: 0,11283;  $p < 0,0000$ ).

A figura 8 representa a distribuição gráfica que combina os valores de cada indivíduo, gerados pela análise discriminante, sobre as medidas morfométricas dos edeagos das populações analisadas.

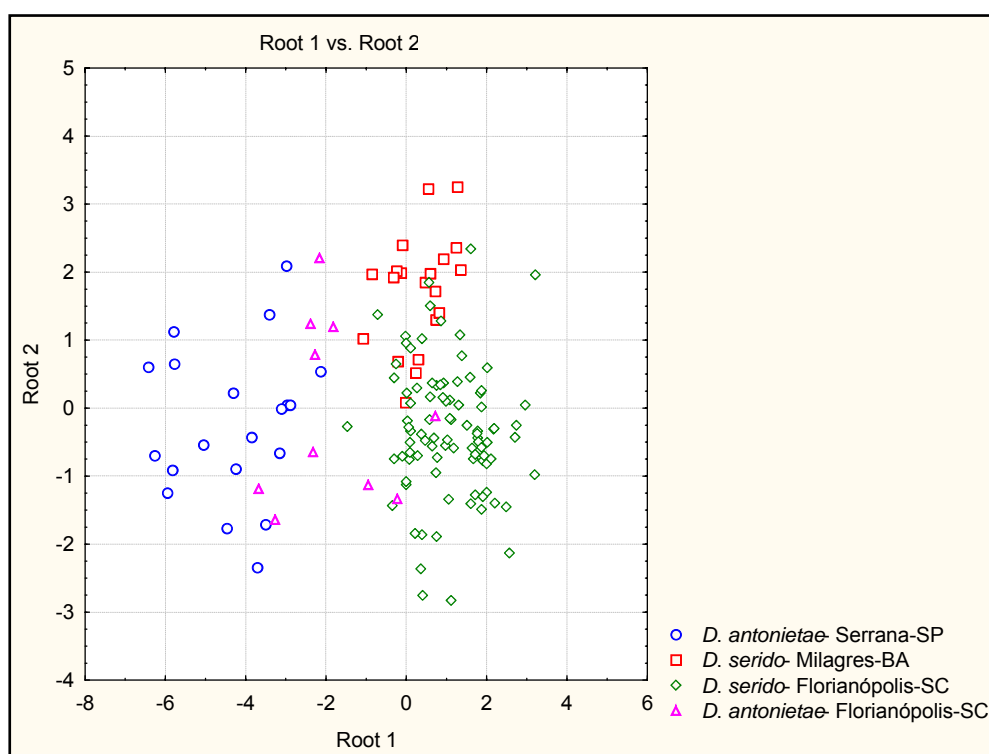
A figura 9 representa a variabilidade da morfologia dos edeagos das populações, calculada a partir dos componentes principais (PC) 1, 2 e 3. A população de *D. serido* de Florianópolis apresentou uma variabilidade menor em relação à população de Milagres, e de acordo com o PC 3, a variabilidade destas duas populações se sobrepõe. O PC 3 foi a variável mais significativa, capaz de discriminar completamente as duas espécies. A população de *D. antonietae* de Florianópolis apresentou uma variabilidade maior em relação à população de Serrana.

**Tabela 10.** Reclassificação correta dos indivíduos, de acordo com as análises discriminantes dos edeagos. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual de indivíduos corretamente classificados. 88% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

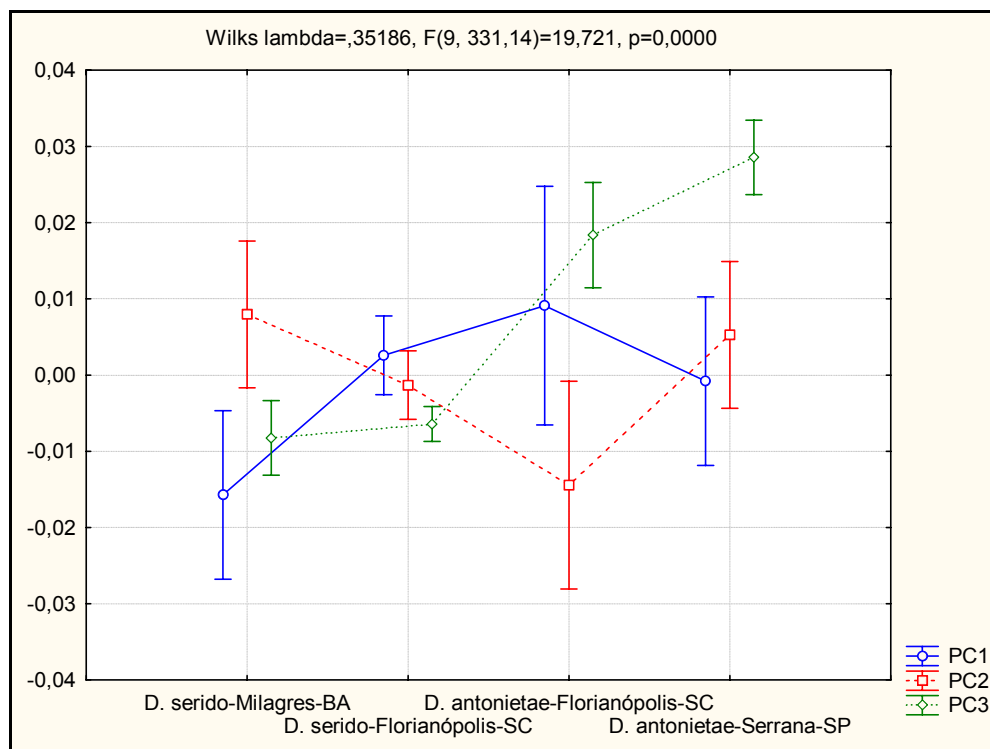
	<i>D. serido</i> Milagres-BA	<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC
<i>D. serido</i> Milagres-BA	13 (65%)	6 (30%)	0 (0%)	1 (5%)
<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	4 (4,3 %)	87 (94,6%)	0 (0%)	1 (1,1%)
<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	0 (0%)	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)
<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC	0 (0%)	3 (30%)	1 (10%)	6 (60%)

**Tabela 11.** Identificação dos indivíduos, por validação cruzada, de acordo com as análises discriminantes dos eedeagos. Em destaque, estão representados o número e o valor percentual de indivíduos corretamente classificados. 82,4% de todos os indivíduos foram corretamente classificados.

	<i>D. serido</i> Milagres-BA	<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC
<i>D. serido</i> Milagres-BA	11 (55%)	8 (40%)	0 (0%)	1 (5%)
<i>D. serido</i> Florianópolis-SC	7 (7,6%)	84 (91,3%)	0 (0%)	1 (1,1%)
<i>D. antonietae</i> Serrana-SP	0 (0%)	0 (0%)	17 (85%)	3 (15%)
<i>D. antonietae</i> Florianópolis-SC	0 (0%)	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)



**Figura 8.** Diagrama com a distribuição gráfica dos valores individuais, gerados pela análise discriminante, sobre as medidas morfométricas dos eedeagos das populações analisadas.



**Figura 9.** Representação gráfica da variabilidade da morfologia dos edeagos das populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* de Florianópolis-SC e das respectivas localidades-tipo, calculada a partir dos componentes principais 1, 2 e 3. As barras verticais indicam um intervalo de confiança de 95%.

#### 4.4- DNA Mitocondrial

A genealogia de 196 seqüências do DNA mitocondrial foi obtida com o auxílio do programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Foram geradas duas redes de haplótipos não enraizadas, indicando a existência de duas linhagens evolutivas distintas, que representam as linhagens de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*.

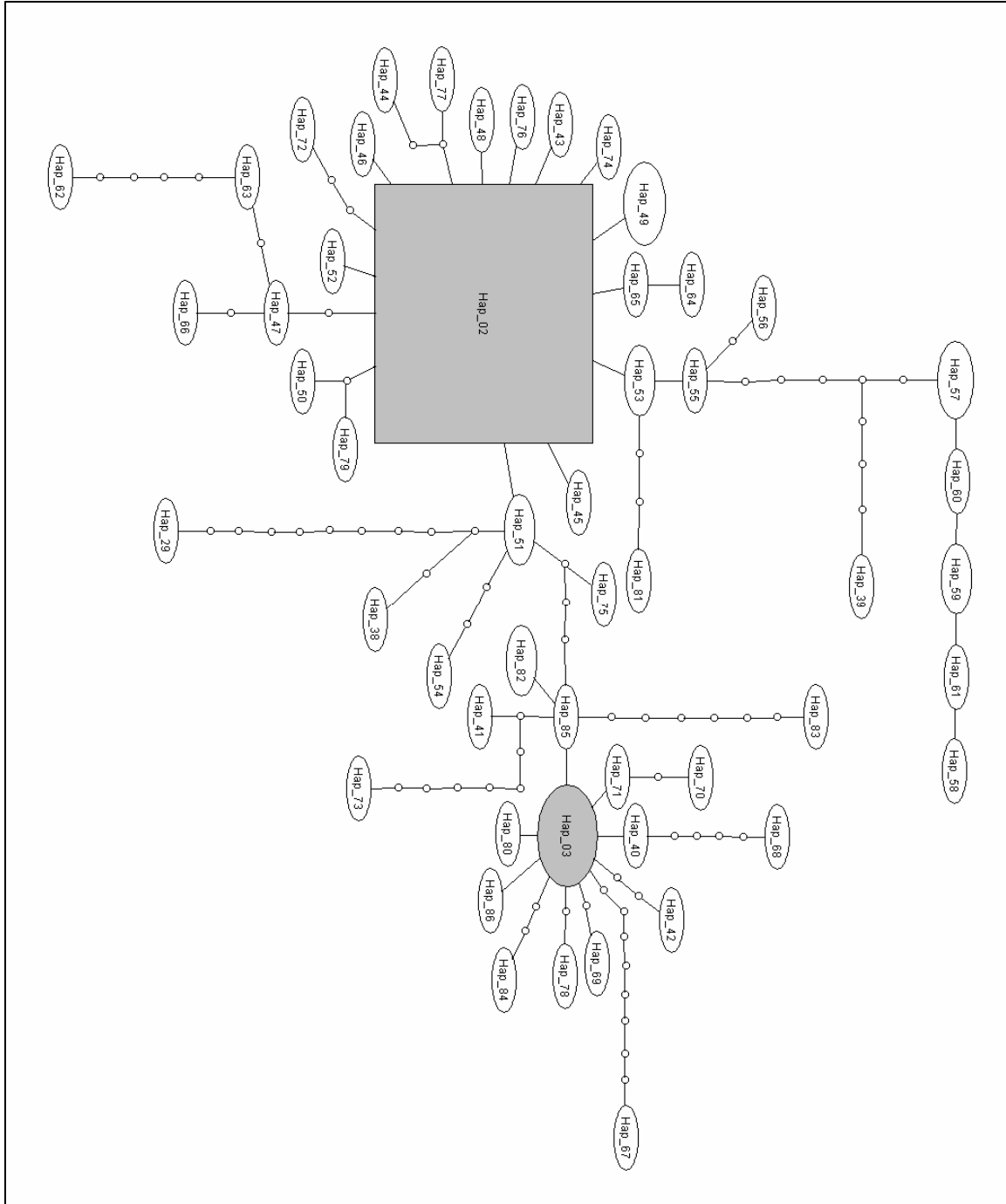
Neste trabalho, foram analisadas as seqüências de 17 indivíduos e foram identificados 3 haplótipos. Sete indivíduos apresentaram o haplótipo 1 (Hap 1) (Figura 10), característico da linhagem evolutiva de *D. serido*, que de acordo com Morales (2005), está presente nas localidades de Florianópolis-SC, Praia Grande-SC, Governador Celso Ramos-SC, Camboriú-SC, Milagres-BA, Manoel Vitorino-BA, Itaberaba-BA e Mucuri-BA, constituindo o haplótipo mais freqüente desta espécie.

Foram identificados dois haplótipos característicos da linhagem evolutiva de *D. antonietae*: os haplótipos 2 e 3 (Hap 2 e Hap 3) (Figura 11). Sete indivíduos apresentaram o haplótipo 2, que está presente nas localidades de Florianópolis-SC, Armação-SC, Laguna-SC, Arroio Teixeira-RS, Cornélios-RS, Tramandaí-RS, Osório-

RS, Santiago-RS e Viamão-RS (Morales, 2005). Três indivíduos apresentaram o haplótipo 3 e foram caracterizados pelos alelos 1,05/1,05 para a enzima IDH, característico de *D. serido*. Este haplótipo está presente nas localidades de Florianópolis-SC e Garopaba-SC, ambas descritas como área de simpatria de haplótipos mitocondriais de *D. serido* e *D. antonietae* por Morales (2005). As seqüências dos 3 haplótipos encontrados são mostradas na figura 12.







**Figura 11.** Rede de haplótipos não enraizada para *D. antonietae*, gerada através das seqüências do gene mitocondrial COI, de Morales (2005), com o auxílio do programa TCS v. 1.21. O quadrado e a elipse, em destaque, representam a freqüência e possível genealogia dos haplótipos 2 e 3, de Morales (2005) e obtidos neste trabalho, sendo que o haplótipo 2 apresenta a maior probabilidade de ser o mais antigo dentro da genealogia (output weight = 0.1541). Cada linha da rede representa um único passo mutacional; haplótipos são representados por números dentro de elipses, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que os possuem; os círculos vazios indicam haplótipos hipotéticos, que são intermediários necessários entre os que foram amostrados, mas que não foram observados na amostra.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
HAP. 1  TTGGAAC TTTATACTTTATTTTCGGAGCTTGAGCCGGAATAGTAGGAACATCTTTAAGAATTTTAATTCGTGCTGAATTAGGCCATCCTGGAGCTTTAAT
HAP. 2  .....T.....T.....C.....C.....
HAP. 3  .....T.....T.....C.....C.....

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HAP. 1  TGGTGATGATCAAATTTACAACGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTAAATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGA
HAP. 2  ...C.....C.....G.....
HAP. 3  ...C.....C.....G..G.....

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
HAP. 1  TTAGTTCCTTTAATGTTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCTCGAATAAATAATAAGTTTTTGGCTTCTACCTCCTGCTTTAACACTTTTATTAGTAA
HAP. 2  .....A.....T.....A.....C.....
HAP. 3  .....A.....A.....C.....

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
HAP. 1  GCAGTATAGTGGAAAATGGAGCTGGAACAGGGTGAACGTTTACCCTCCCCTATCTTCCGGTATTGCACACGGTGGTGCTTCAGTAGATTTAGCTATTTT
HAP. 2  .....T.....T.....
HAP. 3  .....T.....T.....

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
HAP. 1  CTCTTTACACCTTGCCGGAATTTCTTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGATCGAATG
HAP. 2  .....T..A.....C.....C.....A
HAP. 3  .....T.....C.....A

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
HAP. 1  CCTTTATTTGTATGATCAGTTGTAATTACTGCTTTATTACTTCTTTTATCTTTACCAGTTTGTAGCCGGGGCAATTACTATACTTTTAACTGATCGTAATT
HAP. 2  .....G.....C.....T.....
HAP. 3  .....G.....C.....

      610     620     630     640
HAP. 1  TAAATACTTCTTTTTCGACCCAGCAGGTGGAGGAGACCC
HAP. 2  .....T.....
HAP. 3  .....

```

**Figura 11.** Seqüência dos 3 haplótipos obtidos neste trabalho, a partir do seqüenciamento das 640 bases da primeira metade de gene mitocondrial COI. O haplótipo 1 representa a espécie *Drosophila serido* e os haplótipos 2 e 3 representam a espécie *Drosophila antonietae*.

#### **4.5- Análises Totais**

Dos indivíduos analisados neste trabalho, 100 foram caracterizados, concomitantemente, pela variação alélica da aloenzima IDH e pela variação morfológica da asa e do edeago, para avaliar a congruência nos agrupamento taxonômico definidos por estes marcadores. Destes, 17 indivíduos também foram caracterizados pela variação haplotípica mitocondrial do gene COI.

De acordo com as análises aloenzimáticas, apenas um indivíduo não foi agrupado em concordância com os caracteres morfológicos.

Tendo como parâmetro o agrupamento taxonômico definido pelas análises aloenzimáticas, o número de indivíduos com agrupamento discordante foi: 4 indivíduos, de acordo com as análises morfométricas das asas; 3 indivíduos, de acordo com as análises morfométricas dos edeagos e 2 indivíduos, de acordo com a variabilidade haplotípica mitocondrial.

A tabela 12 apresenta os resultados das análises para identificação dos indivíduos amostrados, de acordo com a respectiva técnica utilizada.

**Tabela 12.** Identificação dos indivíduos de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, da localidade de Florianópolis, através de análises eletroforéticas da proteína isocitrato desidrogenase (IDH), variação morfológica da asa e do edeago e seqüências do gene mitocondrial COI. N8: código da coleta de março de 2003. N59 e N61: códigos de coleta de cladódios de dezembro de 2006.

<b>Amostra</b>	<b>Asa</b>	<b>Edeago</b>	<b>Aloenzima (IDH)</b>	<b>mtDNA (COI)</b>
N8-26	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-29	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-30	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N8-31	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-34	-	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-35	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-42	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-44	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-48	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-53	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-54	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-56	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-61	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-66	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. antonietae</i>	
N8-67	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-68	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-79	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-80	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-81	-	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	
N8-84	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-86	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-94	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-95	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-96	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-97	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N8-98	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-99	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-100	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-101	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-105	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-106	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-107	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-109	<i>D. antonietae</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N8-111	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-112	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-113	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-114	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-115	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-116	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-119	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-120	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-121	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-122	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	

continua

<b>Amostra</b>	<b>Asa</b>	<b>Edeago</b>	<b>Aloenzima (IDH)</b>	<b>mtDNA (COI)</b>
N8-123	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-124	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	
N8-125	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-126	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-127	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-128	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-132	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-135	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-136	<i>D. serido</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N8-139	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N8-141	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N59cac1-2	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N59cac1-3	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N59cac1-4	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N59cac1-5	-	<i>D. antonietae</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N61cac5-13	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-14	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-15	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-16	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-17	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-18	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N61cac5-19	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-20	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-21	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac5-22	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac5-23	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-24	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-25	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-26	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-28	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-29	<i>D. antonietae</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac5-43	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac5-54	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac5-55	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-56	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-57	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac5-58	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac5-59	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac6-1	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N61cac6-3	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac7-1	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac7-2	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>
N61cac7-3	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-1	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-2	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-4	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	

continuação

<b>Amostra</b>	<b>Asa</b>	<b>Edeago</b>	<b>Aloenzima (IDH)</b>	<b>mtDNA (COI)</b>
N61cac8-6	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-8	<i>D. antonietae</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac8-9	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. antonietae</i>
N61cac8-10	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-11	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-12	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-13	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-14	-	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-15	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-16	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-17	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-18	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	
N61cac8-19	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	<i>D. serido</i>	

conclusão

## 5- Discussão e Conclusões

As espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, cactofílicas e pertencentes ao “cluster” *Drosophila buzzatii*, são alopátricas na maior parte de suas áreas de ocorrência. Entretanto, análises populacionais prévias descreveram a localidade de Florianópolis-SC como área de contato secundário, com populações de *D. serido* e *D. antonietae* em simpatria, sem formação de híbridos. Com a finalidade de testar esta hipótese, foram analisados indivíduos provenientes da localidade de Florianópolis-SC, a partir da variação morfológica da asa e do edeago, das análises eletroforéticas da proteína isocitrato desidrogenase (IDH) e seqüências do DNA mitocondrial.

Os resultados das análises aloenzimáticas mostraram que o alelo 1,05, característicos de *D. serido*, foi identificado em uma freqüência maior em relação ao alelo 1,00, característico de *D. antonietae*, na localidade de Florianópolis-SC (94% e 6%, respectivamente). Análises prévias, de indivíduos coletados em março de 1998, mostraram um padrão diferente, com uma freqüência maior do alelo 1,00 (84%) em relação ao alelo 1,05 (16%). (Morales, 2001). Esta variação pode sugerir uma influência da sazonalidade na dinâmica desta área de contato.

A flutuação na abundância de indivíduos de uma espécie pode estar diretamente relacionada à exposição a diferentes condições climáticas, como temperatura, umidade e intensidade luminosa, além de variação na disponibilidade de recursos alimentares durante o ano. Os padrões sazonais de ocorrência de cada espécie são produtos de um longo e contínuo processo de adaptação às condições ambientais as quais a espécie está exposta (Pinheiro *et al.*, 2002; Tidon, 2006; De Toni *et al.*, 2007). Para as espécies *D. serido* e *D. antonietae*, esta sazonalidade pode estar relacionada a fatores como preferência e disponibilidade de sítios de oviposição, relacionados às diferentes espécies de cactos, um recurso vital para manutenção de suas populações.

Entre as espécies de *Drosophila* cactofílicas, existe um exemplo bem conhecido de flutuação populacional sazonal. As espécies *Drosophila pachea*, *D. mettleri* e *D. nigrospiracula*, associadas a diferentes espécies de cactos colunares, são simpátricas no deserto de Sonora, na América do Norte. Estas espécies apresentam diferenciação sazonal considerável na distribuição espacial e temporal dos recursos alimentares e no tamanho populacional típico, relacionada com o tamanho e espessura dos cactos hospedeiros (Breitmeyer e Markow, 1998).

Em sua área de ocorrência, populações de *D. serido* são encontradas em áreas com diferentes espécies de cactos, mas existem poucos registros de emergência desta espécie nestes diferentes cactos. Alguns registros mostram emergência de indivíduos a partir do cacto *Cereus fernambucensis*, no litoral do estado de São Paulo (Pereira *et al.*, 1983) e no litoral do estado do Rio Grande do Sul foram observadas emergências a partir dos cactos *Cereus hildmaniannus* e *Opuntia monacantha* (Ruiz *et al.*, 2000). Neste trabalho foi observada a emergência de *D. serido*, em uma frequência alta, em ambas as espécies de cactos *O. monacantha* e *C. hildmaniannus*, os quais ocorrem em simpatria na localidade de Florianópolis. Estes dados sugerem ausência de preferência da espécie *D. serido* para oviposição nestes cactos (Tabela 2).

*Drosophila antonietae*, em sua área de ocorrência, está associada ao cacto *C. hildmaniannus* (Pereira *et al.*, 1983), embora em localidades do litoral do Rio Grande do Sul tenham sido identificados indivíduos que emergiram de *O. monacantha* (Ruiz *et al.*, 2000). As análises eletroforéticas mostraram que, na amostra analisada, espécimes de *D. antonietae* emergiram somente do cacto *C. hildmaniannus*, em uma frequência baixa.

De qualquer forma, a aparente preferência de *D. antonietae* pela utilização do cacto hospedeiro *Cereus hildmaniannus*, como sítio de oviposição, pode ser melhor entendida através de estudos ecológicos adicionais, para verificar quais fatores influenciariam esta especificidade e as possíveis conseqüências desta especificidade para a história evolutiva das duas espécies na presente área de contato.

Entre as espécies do “cluster” *Drosophila buzzatii*, o padrão de utilização da planta hospedeira tem sido bem estudado em *D. buzzatii* e *D. koepferae* (Fanara *et al.*, 2004, 2006; Carreira *et al.*, 2006, 2008; Soto *et al.*, 2007, 2008). Neste caso, sabe-se que existe certa sobreposição de nicho entre estas espécies na natureza, havendo, porém, preferência de *D. buzzatii* por cladódios de *Opuntia* e de *D. koepferae* por cladódios de *Cereus* e *Trichocereus* (Hasson *et al.*, 1992). Além disso, alguns resultados mostram que a utilização destas diferentes espécies de cactos hospedeiros interferem em caracteres de vida das espécies, alterando de forma significativa o tamanho e a forma do edeago e asas em espécies do cluster *D. buzzatii* (Fanara *et al.*, 1999; 2004; Soto *et al.*, 2007).



A evolução e a divergência das espécies do “cluster” *D. buzzatii* estão, aparentemente, relacionadas à história de utilização de diferentes sítios de oviposição (Hasson *et al.*, 1992; Fanara *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2007a, c). Mudanças de cacto hospedeiro podem acelerar a divergência em características associadas à utilização deste novo recurso, como sobrevivência, sistemas sensoriais, tempo de desenvolvimento e de oviposição, (Fanara e Hasson, 2001; McBride, 2007; Markow e O’Grady, 2005), além de poder causar, como consequência direta ou como subproduto, a evolução de isolamento sexual entre populações (Coyne e Orr, 2004; Etges *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foram encontrados os alelos da enzima IDH apenas em homozigose. A provável ausência de indivíduos heterozigotos, atualmente, sugere que as populações de *D. serido* e *D. antonietae* estão em simpatria na localidade de Florianópolis, isoladas reprodutivamente. Este resultado corrobora dados de Morales (2001, 2005) e Bizzo (em preparação), obtidos em toda a extensão da área de contato descrita para populações das espécies *D. serido* e *D. antonietae*.

Entre as espécies do “cluster” *D. buzzatii* foram identificadas, até o momento, várias populações de diferentes espécies em simpatria (Silva e Sene, 1991; Franco *et al.*, 2008); porém, não foram descritos indivíduos híbridos, o que é um indício da existência de isolamento reprodutivo entre estas espécies na natureza. No laboratório, porém, o acasalamento entre alguns pares de espécies é possível: machos de *D. buzzatii* são capazes de fertilizar fêmeas de *D. koepferae*, produzindo machos estéreis e fêmeas férteis, as quais podem se retrocruzar com machos de *D. buzzatii* (Naveira e Fontdevila, 1986). Indivíduos de populações de *D. antonietae*, de Puerto Tirol-Argentina, e *D. serido*, de Arraial do Cabo-RJ, podem se cruzar e produzir F1 fértil, com viabilidade inferior (Bizzo, 1983). Já os cruzamentos entre *D. antonietae*, de Serrana-SP, e *D. serido*, de Milagres-BA, indicam F1 viável, com machos apresentando disgenesia gonadal e fêmeas aparentemente normais e férteis em retrocruzamentos (Morales, dados não publicados). Análises de isolamento reprodutivo em laboratório, envolvendo diferentes espécies do “cluster” *D. buzzatii*, mostraram variação na fertilidade e fecundidade entre as linhagens, além de alguns cruzamentos completamente estéreis, e produção de híbridos F1 que não deixaram F2 (Madi-Ravazzi *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2002, 2006).

As variações morfométricas, entre e dentro dos grupos de organismos, refletem a expressão de um fenótipo resultante de um controle poligênico integrado, que é

alterado durante a cladogênese e a evolução dos grupos (Falconer, 1989). Além disso, muitos fatores epigenéticos e ambientais podem afetar a formação de uma estrutura (Atchley *et al.*, 1992), o que torna difícil a identificação das causas da divergência morfológica entre populações e espécies. Alguns casos ilustram a relação entre características morfológicas e variáveis ambientais: as mudanças sazonais no tamanho da asa em *D. melanogaster* (Sevenster e Van Halphen, 1993), e a influência da temperatura e do tipo de substrato larval no tamanho e na forma do edeago de diversas espécies de *Drosophila* (Andrade *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007, Soto *et al.*, 2008).

Os resultados das análises morfométricas de asas e edeagos deste projeto permitiram a identificação e agrupamento da maioria dos indivíduos da área de contato, em concordância com suas descrições taxonômicas, em *D. serido* e *D. antonietae*.

A abordagem morfométrica, utilizando pontos de referência, é eficiente nas análises de asas de insetos, pois estas são, em geral, estruturas bidimensionais, caracterizadas pela presença de marcos anatômicos resultantes de intersecções de veias, facilmente identificáveis. A análise morfométrica das asas tem sido muito utilizada na discriminação de espécies crípticas (Moraes *et al.*, 2004a, 2004b; Esgúicero, 2006) e detecção de variação intra-específica (Hass e Tolley, 1998; Moraes e Sene, 2004c). Desta forma, esta estrutura tem se mostrado um caráter adequado para o uso em estudos evolutivos. No presente projeto, a identificação de indivíduos, por validação cruzada, de acordo com a análise discriminante das asas, foi capaz de agrupar corretamente 93,6% dos indivíduos da espécie *D. serido* e 86,2% dos indivíduos da espécie *D. antonietae*.

Nas análises das asas das populações de Florianópolis e Serrana, alguns indivíduos identificados como pertencentes a *D. antonietae*, considerando a variação alélica enzimática, foram considerados mais semelhantes às populações de *D. serido* do que com a população da mesma espécie. Estes dados concordam com os resultados encontrados por Franco *et al.* (2008), em análises de asas de algumas espécies do “cluster” *D. buzzatii*, que sugerem que, embora haja pronunciada diferenciação morfológica na asa das espécies analisadas, a variabilidade intra-específica é maior do que a variação interespecífica, sendo este marcador, portanto, menos consistente para identificação das espécies do “cluster” *D. buzzatii*, em relação ao edeago.

Os métodos para contornos são, muitas vezes, aplicados quando não existem marcos anatômicos homólogos claramente identificáveis e precisos (Mc Lellan e Endler, 1998; Monteiro e Reis, 1999; Rohlf, 1990a). A análise do contorno do edeago pode revelar aspectos da forma que não são capturados pelos marcos anatômicos, como a curvatura e rugosidade, tendo sido aplicada com sucesso na análise da forma de edeagos de *Drosophila* pertencentes ao “cluster” *D. buzzatii* (Franco *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2007). Através da técnica de morfometria geométrica aplicada aos edeagos, foram geradas funções lineares discriminantes, que foram capazes de classificar corretamente 99,1% dos indivíduos da espécie *D. serido* e 90% dos indivíduos da espécie *D. antonietae*.

A população de *D. serido* da localidade de Florianópolis apresentou menor variação morfológica nos edeagos, podendo ser diferenciada da população de Milagres-BA, localidade-tipo da espécie. Uma possível explicação para esta menor variação morfológica é uma colonização da localidade de Florianópolis e efeito do fundador, corroborando dados de análises de diversidade haplotípica mitocondrial, que sugerem colonização do litoral brasileiro, a partir de expansões de área das populações do interior da Bahia (Morales, 2005). De fato, populações pequenas tendem a apresentar diversidade genética menor, quando comparada às populações grandes (Frankham, 1996; Gitzendanner e Soltis, 2000). Outra possibilidade para esta diferenciação observada é ser o resultado de *character displacement* no fenótipo do macho, devido à seleção favorecendo acasalamentos conspecíficos nesta área de contato, o que caracteriza um processo de reforço do isolamento reprodutivo, podendo reduzir a amplitude de fenótipos aceitos pelas fêmeas (Noor, 1999).

A reclassificação dos grupos nas análises morfométricas foi congruente com o agrupamento taxonômico definido pelas análises aloenzimáticas na maior parte da amostra, corroborando a hipótese de existência de populações de *D. serido* e *D. antonietae* em simpatria, na localidade de Florianópolis.

Para as análises das seqüências do gene mitocondrial COI, foram selecionados 17 indivíduos, considerando amostras que foram totalmente congruentes com os demais marcadores e amostras que apresentaram alguma incongruência. Foram identificados três haplótipos: o haplótipo 1, característico da linhagem evolutiva de *D. serido*, e os haplótipos 2 e 3, característicos da linhagem evolutiva de *D. antonietae*.

O haplótipo 1 está presente nas localidades de Florianópolis-SC, Praia Grande-SC, Governador Celso Ramos-SC e Camboriú-SC, além de ser compartilhado por indivíduos provenientes das localidades de Milagres-BA, Manoel Vitorino-BA, Itaberaba-BA e Mucuri-BA (Morales, 2005), constituindo o haplótipo mais freqüente de *D. serido*. Os principais fatores apontados para explicar esta distribuição foram expansões de área das populações do interior da Bahia, em direção ao litoral e, no litoral, fluxo gênico restrito, devido a isolamento por distância (Morales, 2005).

O haplótipo 2 está presente nas localidades de Florianópolis-SC, Armação-SC, Laguna-SC, Arroio Teixeira-RS, Cornélios-RS, Tramandaí-RS, Osório-RS, Santiago-RS e Viamão-RS (Morales, 2005). De Brito *et al.* (2002a) e Morales (2005) sugeriram uma expansão de área de ocorrência das populações do interior do estado do Rio Grande do Sul em direção à costa atlântica brasileira, colonizando o litoral do estado do Rio Grande do Sul, e expansão da área de ocorrência em direção ao norte, até o litoral do estado de Santa Catarina, seguindo as populações de cactos pelas dunas desses dois estados brasileiros. Os dados geomorfológicos indicam que a formação desta planície costeira é recente, datada da era Cenozóica, e foi diretamente afetada pelas regressões e transgressões marinhas dos últimos 10.000 anos (Villwock *et al.*, 1986), sendo que a última transgressão marinha ocorreu há 5.100 anos (Hesp *et al.*, 2007).

O haplótipo 3, neste trabalho, é representado por três indivíduos, que apresentaram alelos da enzima IDH e caracteres morfológicos característicos da espécie *D. serido*. Este haplótipo foi alocado na rede de *D. antonietae*, e está presente nas localidades de Florianópolis-SC e Garopaba-SC, ambas descritas como área de simpatria de haplótipos mitocondriais de *D. serido* e *D. antonietae* (Morales, 2005). Os indivíduos de Garopaba não foram caracterizados por marcadores morfológicos ou aloenzimáticos, de forma que não se pode afirmar se o mesmo padrão de discordância entre os marcadores se repete nesta localidade.

Análises moleculares mostram que muitos pares de espécies filogeneticamente próximas compartilham alguns genes, potencialmente devido à retenção de polimorfismo ancestral ou eventos de hibridação, seguidos de introgressão (Avice, 2000; Machado *et al.*, 2002; Funk e Omland, 2003; Charlesworth *et al.*, 2005; Mallet, 2005). Alguns critérios para distinguir hipóteses de polimorfismo ancestral e introgressão de genes mitocondriais foram criados, apesar de freqüentemente se mostrarem inadequados (Schneider-Broussard *et al.*, 1998), de modo que ainda não

existem métodos diagnósticos amplamente aceitos (Holder *et al.*, 2001; Funk e Omland, 2003). A distinção entre polimorfismo ancestral e introgressão se torna difícil, pois ambos podem produzir topologias similares em árvores de genes (Holder *et al.*, 2001) e, em muitos casos, não se pode rejeitar estatisticamente uma das hipóteses.

Considerando que as espécies *D.serido* e *D.antonietae* são filogeneticamente próximas e compartilham a inversão fixa  $2x^7$ , a incongruência entre os marcadores pode ser explicada por retenção de polimorfismo ancestral. Entretanto, esta hipótese pode ser favorecida quando o haplótipo compartilhado é ancestral, enquanto os haplótipos espécie-específicos são derivados (Baker *et al.*, 2003; Donnelly *et al.*, 2004; Omland *et al.*, 2006). O haplótipo 3, encontrado neste trabalho, não é considerado ancestral, portanto, não apoiando a hipótese de polimorfismo ancestral. Porém, outros critérios devem ser avaliados para que esta hipótese seja rejeitada.

Uma abordagem utilizada para explicar o compartilhamento de haplótipos por espécies diferentes é a comparação entre populações simpátricas e alopátricas. Sob a hipótese de polimorfismo ancestral, não são necessárias predições a respeito da distribuição geográfica das linhagens, enquanto sob a hipótese de introgressão, espera-se que esta seja mais comum se as duas espécies estejam em simpatria, pela maior facilidade de ocorrência de hibridação, principalmente quando a capacidade de dispersão dos organismos é baixa. (Hare e Avise, 1998; Kulikova *et al.*, 2004, 2005). Este padrão foi observado, pois a incongruência envolvendo o haplótipo 3 foi encontrado apenas em duas localidades, onde as populações de *D. serido* e *D. antonietae* são simpátricas.

Similarmente, em uma área de simpatria de duas espécies de besouros do gênero *Ochthebius*, indivíduos híbridos não foram identificados em análises aloenzimáticas, sugerindo a existência de isolamento reprodutivo entre as populações. Porém, foi identificado o compartilhamento de alelos característicos apenas em populações simpátricas, o que foi interpretado como evidência de fluxo gênico ancestral (Urbanelli, 2002; Urbanelli e Porretta, 2008).

Outro critério muito utilizado é a comparação entre DNA mitocondrial e nuclear. A ausência de polimorfismo compartilhado de genes nucleares tem sido interpretada como tempo de divergência longo entre as espécies, com introgressão do DNA mitocondrial (Ballard, 2000), enquanto o extensivo compartilhamento de genes nucleares tem sido interpretado como evidência de divergência recente e retenção

de polimorfismo ancestral (Wilson *et al.*, 2000; Sefc *et al.*, 2005). No presente trabalho, entretanto, este critério não pode ser avaliado, pois não temos, até o momento, haplótipos nucleares para as populações destas áreas.

Deste modo, a presença do haplótipo 3 nas populações de *D. serido* pode ser devido a eventos de introgressão de genes mitocondriais de *D. antonietae*, como resultado de eventos de hibridação passados.

Após um evento de introgressão, seguido por isolamento entre as populações por muito tempo, o compartilhamento de haplótipos entre duas espécies pode não ser observado, devido às mutações que eventualmente possam ter ocorrido nos mesmos. Desta forma, o haplótipo característico de *D. antonietae* foi observado na espécie *D. serido*, ainda que este haplótipo não seja idêntico a qualquer outro dentro da rede (Funk e Omland, 2003).

A introgressão de genes mitocondriais é mais comum que a de genes nucleares (Rieseberg e Soltis, 1991; Whittemore e Schaal, 1991; Dorado *et al.*, 1992; Arnold, 1993; Bernatchez *et al.*, 1995), e algumas explicações citadas são relacionadas a processos de desequilíbrio citonuclear (Arnold, 1993), esterilidade de híbridos machos (Aubert e Solignac, 1990) e ao menor tamanho populacional efetivo do DNA mitocondrial, por ser haplóide e possuir herança matrilinea (Awise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Moore, 1995).

Nas espécies *Drosophila santomea* e *Drosophila yakuba*, foi encontrada uma extensiva introgressão de genes mitocondriais, embora exista grande diferenciação entre elas, de acordo com marcadores nucleares (Bachtrog *et al.*, 2006). Introgressão unidirecional de genes mitocondriais foi identificada em espécies do gênero *Anopheles* (Donnelly *et al.*, 2004), besouros do gênero *carabus* (Sota, 2002; Takami e Suzuki, 2005), sapos do gênero *Rana* (Plötner *et al.*, 2008), estrelas do mar do gênero *Asterias* (Harper e Hart, 2007), entre outros exemplos.

No “cluster” *D. buzzatii*, indícios de introgressão foram identificados entre algumas espécies. Foi verificada a presença de polimorfismos compartilhados entre as espécies *D. koepferae* e *D. buzzatii*, o que foi interpretado como indicador de eventos de fluxo gênico interespecífico, ancestral ou atual (Gómez e Hasson, 2003; Piccinali *et al.*, 2004). Análises de variação haplotípica mitocondrial sugerem introgressão unidirecional de DNA mitocondrial de uma população de *D. antonietae* para *D. gouveai*, enquanto análises de loci de DNA satélites destas populações não mostraram qualquer indício de introgressão de genes nucleares (Manfrin *et al.*, 2001;

DeBrito *et al.*, 2002a; Franco *et al.*, 2006). Evidências de introgressão de haplótipos mitocondriais também foram encontradas nas espécies *D. serido*, *D. gouveai*, *D. seriema* e *D. borborema*, embora nenhum indício de introgressão do gene nuclear *period* tenha sido identificado (Franco *et al.*, 2008).

Os indícios de introgressão de haplótipos mitocondriais e a aparente ausência de fluxo gênico atual entre as populações de *D. serido* e *D. antonietae* evidenciam a hipótese de reforço do isolamento reprodutivo nesta área de contato secundário. O padrão de discriminação para acasalamentos conspecíficos, maior em populações simpátricas, pode ser conseqüência de uma divergência populacional, denominada “character displacement” ecológico (Losos, 2000; Dayan e Simberloff, 2005), que ocorre em populações simpátricas, provavelmente reduzindo a competição interespecífica, permitindo a coexistência entre duas espécies (Schluter e McPhail, 1992; Grant, 1994).

Os dados disponíveis sugerem que os processos que determinaram a formação desta área de contato são múltiplos, e, provavelmente, sobrepostos, envolvendo fatores ecológicos, históricos, genéticos e geomorfológicos na dinâmica desta região. Os padrões distintos encontrados para os diferentes marcadores utilizados nesta área de contato podem sugerir vários eventos de contato e separação entre as populações destas espécies, envolvendo diferentes conseqüências relacionadas a possíveis eventos históricos de fluxo gênico e introgressão entre as populações.

Os resultados obtidos até o momento sugerem a existência de simpatria entre as populações de *D. serido* e *D. antonietae*, na localidade de Florianópolis-SC, além de possíveis eventos ancestrais de introgressão de genes mitocondriais nesta localidade.

A história evolutiva das espécies *D. serido* e *D. antonietae* e a formação da área de contato entre elas é muito complexa, tanto que à medida que novos estudos são realizados, novas perguntas surgem, evidenciando a importância de novas investigações sobre este problema biológico.

## REFERÊNCIAS

- AB' SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas** v. 3, p. 1-19. 1977.
- ALVES, P. C.; MELO-FERREIRA, J.; FREITAS, H.; BOURSOT, P. The ubiquitous mountain hare mitochondria: multiple introgressive hybridization in hares, genus *Lepus*. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 363, p. 2831–2839. 2008.
- ANDERSON, E.; HUBRICHT, L. Hybridization in *Tradescantia*: the evidence for introgressive hybridization. **Am. J. Bot.** v. 25, p. 396–402. 1938.
- ANDRADE, C. A. C.; HATADANI, L. M.; KLACZKO, L. B. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: effect of the temperature. **J. Therm. Biol.** v. 30, p. 518-523. 2005.
- ARNOLD, J. Cytonuclear disequilibria in hybrid zones. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 24, p. 521-554. 1993.
- ARNOLD, M. L. **Natural Hybridization and Evolution**. New York: Oxford Univ. Press. 1997.
- ARNOLD, M. L. **Evolution through genetic exchange**. Oxford Univ. Press, New York. 2006.
- ATCHLEY, W. R.; COWLEY, D. E.; VOGI, C.; MCLELLANT, E. Evolutionary divergence, shape change, and genetic correlation structure in the rodent mandible. **Syst. Biol.** v. 41, p. 196–221. 1992.
- AUBERT, J.; SOLIGNAC, M. Experimental evidence for mitochondrial DNA introgression between *Drosophila* species. **Evolution**. v. 44, p.1272-1282. 1990.
- AUFFRAY, J. C.; ALIBERT, P.; RENAUD, S. Fluctuating asymmetry in *Mus musculus* subspecific hybridization. Marcus LF (ed). **Advances in morphometrics**. Plenum Press, New York. 1996.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGAL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 18, p. 489–522. 1987.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, 447 p. 2000.
- BACHTROG, D.; THORNTON, K.; CLARK, A.; ANDOLFATTO, P. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. **Evolution**. v. 60, p. 292–302. 2006.



- BAIMAI, V.; SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R. Heterochromatin and Karyotypic differentiation of some neotropical cactus-breeding species of the *Drosophila repleta* species group. **Genetica** v. 60, p. 81-92. 1983.
- BAKER, J. M.; LÓPEZ-MEDRANO, E.; NAVARRO-SIGUENZA, A. G.; ROJAS-SOTO, O. R.; OMLAND, K. E. **Recent speciation in the Orchard Oriole group: divergence of *Icterus spuriosus spuriosus* and *Icterus spuriosus fuertesii***. *Auk*. In press. 2003.
- BALLARD, J. W. O. When one is not enough: introgression of mitochondrial DNA in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** v. 17, p. 1126–1130. 2000.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Mol. Ecol.** v. 13, p. 729–744. 2004.
- BARKER, J. S. F.; SENE, F. M.; EAST, P. D.; PEREIRA, M. A. Q. R. Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. **Genetica** v. 67, p. 161-170. 1985.
- BARTON, N. H.; HEWITT, G.M. The genetic basis of hybrid inviability in the grasshopper *Podisma pedestris*. **Heredity**. v. 47, p. 367–383. 1981.
- BARTON, N. H.; HEWITT, G. M. Analysis of hybrid zones **Ann. Rev. Ecol. Syst.** v. 16, p. 113-148. 1985.
- BERNATCHEZ, L.; GLKMET, H.; WILSON, C.; DANZMANN, R. G. Fixation of introgressed mitochondrial genome of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in an allopatric population of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 52, p. 179-185. 1995.
- BIFFI, F.; KUHN, G. C. S.; MORALES, A. C.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. Padrão cariotípico de uma área de contato entre as espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (grupo *repleta*). In Congresso Brasileiro de Genética, 49. **Resumo**. 2001.
- BIZZO, N. M. V. **Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em *Drosophila serido***. 1983. 71 f. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 1983.
- BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**. Cambridge University Press, Cambridge. 1991
- BOOKSTEIN, F. L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bull. Math. Biol.** v. 58, p. 313–365. 1996.
- BREITMEYER, C. M.; MARKOW, T.A. Resource availability and population size in cactophilic *Drosophila*. **Funct. Ecol.** v. 12, p. 14–21. 1998.
- BULLINI, L.; NASCETTI, G. Speciation by hybridization in phasmids and other insects. **Can. J. Zool.** v. 68, p. 1747–1760. 1990.

- BUTLIN, R. K. Reinforcement: an idea evolving. **Trends Ecol. Evol.** v. 10, p. 432-434. 1995.
- BYRNE, M.; ANDERSON, M. J. Hybridization of sympatric *Patiriella* species (Echinodermata: Asteroidea) in New South Wales. **Evolution.** v. 48, p. 564-76. 1994.
- CAIN, M. L.; ANDREASEN, V.; HOWARD, D. J. Reinforcing selection is effective under a relatively broad set of conditions in a mosaic hybrid zone. **Evolution** v. 53, p. 1343-1353. 1999.
- CAMPBELL, D. R. Natural selection in Ipomopsis hybrid zones: implications for ecological speciation. **New Phytol.** v. 161, p. 83-90. 2004.
- CANSIAN, A. M.; SENE, F. M. Padrões de cortes sonoras, inversões cromossômicas e morfometria multivariada de populações naturais de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (grupo *repleta*) nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Genet. Mol. Biol.** v. 23, p. 129. 2000.
- CARREIRA, V. P.; SOTO, I. M.; FANARA, J. J.; HASSON, E. A study of wing morphology and fluctuating asymmetry in interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. **Genetica.** v. 133, p. 1-11. 2008.
- CARREIRA, V. P.; SOTO, I. M.; HASSON, E. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. **J. Evol. Biol.** v. 19, p. 1275-1282. 2006.
- CASTANHEIRA, E. B.; CONTEL, E. P. B. Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): Evidence of postranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. **Biochem. Genet.** v. 33, p. 365. 1995.
- CHARLESWORTH, B.; BARTOLOMÉ, C.; NOEL, V. The detection of shared and ancestral polymorphisms. **Genet. Res.** v. 86, p. 149-157. 2005.
- CIANCHI, R.; UNGARO, A.; MARINI, M.; BULLINI, L. Differential patterns of hybridization and introgression between the swallowtails *Papilio machaon* and *P. hospiton* from Sardinia and Corsica islands (Lepidoptera: Papilionidae). **Molec. Ecol.** v. 12, p. 1461-1471. 2003.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.** v. 9, p. 1657-1660. 2000.
- COYER, J. A.; HOARAU, G.; STAM, W. T.; OLSEN, J. L. Hybridization and introgression in a mixed population of the intertidal seaweeds *Fucus evanescens* and *F. serratus*. **J. Evol. Biol.** v. 20, p. 2322-2333. 2007.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. Patterns of speciation in *Drosophila*. **Evolution.** v. 43, p. 362-381. 1989b.

- COYNE, J. A.; ORR, H. A. Patterns of speciation in *Drosophila* revisited. **Evolution**. v. 51, p. 295-303. 1997.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. **Speciation**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 2004.
- CRESPIN, L.; BERREBI, P.; LEBRETON, J. D. Asymmetrical introgression in a freshwater fish hybrid zone as revealed by a morphological index of hybridization. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 67, p. 57-72. 1999.
- DAYAN, T.; SIMBERLOFF, D. Ecological and community wide character displacement: the next generation. **Ecol. Lett.** v. 8, p. 875-894. 2005.
- DE BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Nested Cladistic Analysis of Brazilian Populations of *Drosophila serido*. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 22, p. 131-143. 2002a.
- DE BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Mitochondrial DNA Phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genet. Mol. Biol.** v. 25, p. 161-171. 2002b.
- DE TONI, D. C; HALK, M. S. G; CORDEIRO, J.; HOFMANN, P. P. R; VALENTE, V. L. S. Study of the Drosophilidae (Diptera) Communities on Atlantic Forest Islands of Santa Catarina State, Brazil. **Neotrop. Entomol.** v. 36, p. 356-375. 2007.
- DONNELLY, M. J.; PINTO, J.; GIROD, R.; BESANSKY, N.J.; LEHMANN, T. Revisiting the role of introgression vs shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. **Heredity**. v. 92, p. 61-68. 2004.
- DORADO, O.; RIESEBERG, L. H.; ARIAS, D. Chloroplast DNA introgression in southern California sunflowers. **Evolution**. v. 46, p. 566-572. 1992.
- DOWLING, T. E.; HOEH, W. R. The Extent of Introgression Outside the Contact Zone between *Notropis cornutus* and *Notropis chrysocephalus* (Teleostei: Cyprinidae) **Evolution**. v. 45, p. 944-956. 1991.
- DRYDEN, I. L.; MARDIA, K. V. **Statistical shape analysis**. Wiley, Chichester. 1998.
- ESGUÍCERO, A. L. H.; MANFRIN, M. H. Variações morfométricas entre populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). In Congresso Brasileiro de Genética, 51. **Resumo**. 2005.
- ESGUÍCERO, A. L. H. **Estudo taxonômico e evolutivo em populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)**. 2006. 38 f. Dissertação de Mestrado, Depto. Biologia-FFCLRP. Área de Biologia Comparada. Universidade de São Paulo. 2006.

- ETGES, W. J.; VEENSTRA, C. L.; JACKSON, L. L. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. **J. Chem. Ecol.** v. 32, p. 2629-2646. 2006.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 2. ed., London: Longman. 1989.
- FANARA, J. J.; FOLGUERA, G.; FERNÁNDEZ IRIARTE, P.; MENSCH, J.; HASSON, E. Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. **J. Evol. Biol.** v. 9, p. 900-908. 2006.
- FANARA, J. J.; FONTDEVILA, A.; HASSON, E. Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. **Evol. Ecol.** v. 13, p. 173-190. 1999.
- FANARA, J. J.; HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. **Evolution.** v. 55, p. 2615-2619. 2001.
- FANARA, J. J.; MENSCH, J.; FOLGUERA, G.; HASSON, E. Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* reared in different natural hosts. **Evol. Ecol.** v. 18, p. 203-214. 2004.
- FONTDEVILA, A.; PLA, C.; HASSON, E.; WASSERMAN, M.; SANCHEZ, A.; NAVEIRA, H.; RUIZ, A. *Drosophila koepferae*, a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. **Ann. Entomol. Soc. America** v. 81, p. 380-385. 1988.
- FRANCO, F. F.; KUHN, G. C. S.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Conservation of pBuM-2 satellite DNA sequences among geographically isolated *Drosophila gouveai* populations from Brazil. **Genetica.** v. 128, p. 287-295. 2006.
- FRANCO, F. F.; SENE, F.M.; MANFRIN, M. H. Padrões contrastantes entre morfologia do edeago e asa em espécies de *Drosophila* cactofílicas. In Congresso Brasileiro de Genética, 54. **Resumo**. 2008.
- FRANCO, F. F.; SENE, F. M.; MAZUCATO, M.; MANFRIN, M. H. Filogeografia de espécies de *Drosophila* cactofílicas e endêmicas da América do Sul inferida pelos genes mitocondrial COI e nuclear *period*. In Congresso Brasileiro de Genética, 54. **Resumo**. 2008.
- FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. **Conserv. Biol.** v. 10. p. 1500–1508. 1996.
- FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 34, p. 397-423. 2003.

- GANEM, G.; LITEL, C.; LENORMAND, T. Variation in mate preference across a house mouse hybrid zone. **Heredity**. v.100, p. 594-601. 2008.
- GITZENDANNER, M. A; SOLTIS, P. S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. **Am. J. Bot.** v. 87, p. 783-792. 2000.
- GÓMEZ, G. A; HASSON, E. Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatii*. **Mol. Biol. Evol.** v. 20, p. 410–423. 2003.
- GRANT, P. R.; GRANT, B. R. Hybridization of bird species. **Science** v. 256, p. 193-197. 1992b.
- GRANT, P. R. Ecological character displacement. **Science** v. 266, p. 746–747. 1994.
- HAAS, H. L.; TOLLEY, K. A. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the fruit fly, *Drosophila lummei*. **J. Zool.** v. 245, p. 197-203. 1998.
- HARE, M. P.; AVISE, J. C. Population structure in the American oyster as inferred by nuclear gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.** v. 15, p. 119-128. 1998.
- HARPER, F. M.; HART, M. W. Morphological and phylogenetic evidence for hybridization and introgression in a sea star secondary contact zone. **Invert. Biol.** v. 126, p. 373-384. 2007.
- HARRISON, R. G. Hybrid Zones: windows on the evolutionary process. **Oxford Surv. Evol. Biol.** v. 7, p. 68-128. 1990.
- HASSON, E.; NAVEIRA, H.; FONTDEVILA, A. The breeding sites of the Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila repleta* group). **Rev. Chil. Hist. Nat.** v. 65, p. 319-326. 1992.
- HEED, W. B.; MANGAN, R. L. **Community ecology of the Sonoran Desert Drosophila. In the Genetics and Biology of Drosophila.** v. 3, editado por M. Ashburner, H.L. Carson e J.N. Thompson, Jr. Academic Press, NY. 1986.
- HESP, P. A.; DILLENBURG, S. R.; BARBOZA, E. G.; CLEROT, L. C. P.; TOMAZELLI, L. J.; ZOUAIN, R. N. A. Morphology of the Itapeva to Tramandai transgressive dunefield barrier system and mid-to late Holocene sea level change. **Earth Surf. Process Landf.** v. 32, p. 407-414. 2007.
- HEWITT, G. M. Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. **Trends Ecol. Evol.** v. 3, p. 158-167. 1988.
- HEWITT, G. M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 58, p. 247-276. 1996.
- HEWITT, G. M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature.** v. 405, p. 907–913. 2000.

- HEWITT, G. M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. **Proc. R. Soc. Lond., B.** v. 359, p. 183-195. 2004.
- HIGGIE, M.; CHENOWETH, S.; BLOWS, M. W. Natural selection and the reinforcement of mate recognition. **Science.** v. 290, p. 519-521. 2000.
- HOFREITER, M.; SERRE, D.; ROHLAND, N.; RABEDER, G.; NAGEL, D.; CONARD, N.; MUNZEL, S.; PAABO, S. Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** ,v. 101, p. 12963–12968. 2004.
- HOLDER, M. T.; ANDERSON, J. A.; HOLLOWAY, A. K. Difficulties in detecting hybridization. **Syst. Biol.** v. 50, p. 978–982. 2001.
- HOWARD, D. J. Reinforcement: origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. In R. G. Harrison, ed. **Hybrid zones and the evolutionary process.** p. 46-69. Oxford Univ. Press, New York. 1993.
- HOWARD, D. J; BERLOCHER, S.H. **Endless Forms: Species and Speciation.** Oxford University Press, New York. 1998.
- IWATA, H.; UKAI, Y. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic fourier descriptors. **J. Hered.** v. 93, p. 384-385. 2002.
- JIGGINS, C. D.; KING, P.; MCMILLAN, W. O.; MALLETT, J. The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone. **Heredity.** v. 79, p. 495-505. 1997.
- JIGGINS, C. D.; MALLETT, J. Bimodal hybrid zones and speciation. **Trends Ecol. Evolution** v. 15, p. 250-255. 2000.
- KANESHIRO, K. Y. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. **Univ. Texas Publ.** v. 6918, p. 55-70. 1969.
- KLINGENBERG, C. P.; BARLUENGA, M. MEYER, A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. **Evolution.** v. 56, p. 1909-1920. 2002
- KUHL, F. P.; GIARDINA, C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **CVGIP.** v. 18, p. 236-258. 1982.
- KULIKOVA, I. V.; DROVETSKI, S. V.; GIBSON, D. D.; HARRIGAN, R. J.; ROHWER, S.; SORENSON, M. D.; WINKER, K.; ZHURAVLEV, Y. N.; McCracken, K. G. Phylogeography of the Mallard (*Anas platyrhynchos*): hybridization, dispersal, and lineage sorting contribute to complex geographic structure. **Auk.** v. 122, p. 949-965. 2005.

- KULIKOVA, I. V.; ZHURAVLEV, Y. N.; MCCRACKEN, K. G. Asymmetric hybridization and sex-biased gene flow between Eastern spot-billed ducks (*Anas zonorhyncha*) and mallards (*A. platyrhynchos*) in the Russian Far East. **Auk**. v. 121, p. 930-949. 2004.
- LACHAISE, D.; HARRY, M.; SOLIGNAC, M.; LEMEUNIER, F.; BÉNASSI, V.; CARIOU, M.L. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from São Tomé. **Proc. R. Soc. Lond., B**. v. 267, p. 1487-1495. 2000.
- LEIN, M. R.; CORBIN, K. W. Song and plumage phenotypes in a contact zone between subspecies of the white-crowned sparrow *Zonotrichia leucophrys*. **Can. J. Zool.** v. 68, p. 2625-2629. 1990.
- LESTREL, P. E. **Fourier descriptors and their applications in biology**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 480 p. 1997.
- LEXER, C.; HEINZE, B.; ALIA, R.; RIESEBERG, L. H. Hybrid zones as a tool for identifying adaptive genetic variation in outbreeding forest trees: lessons from wild annual sunflowers (*Helianthus* spp.). **J. Forest Ecol.** v. 197, p. 49-64. 2004.
- LIU, L. W.; RICE, T. D. Speciation by reinforcement of premating isolation. **Evolution**. v. 48, p.1451-1459. 1994.
- LIU, J.; MERCER, J. M.; STAM, L. F.; GIBSON, G. C.; ZENG, Z. B.; LAURIE, C. C. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. **Genetics**. v. 142, p. 1129-1145. 1996.
- LOSOS, J. B. Ecological character displacement and the study of adaptation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 5693–5695. 2000.
- MACHADO, L. P. B.; CASTRO, J. P.; MADI-RAVAZZI, L. Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). **Braz. J. Biol.** v. 62, p. 601-608. 2002.
- MACHADO, L. P. B.; MADI-RAVAZZI, L.; TADEI, W.J. Reproductive relationships and degree of synapsis in the polytene chromosomes of the *Drosophila buzzatii* species cluster. **Braz. J. Biol.** v. 66, p. 279-293. 2006.
- MADI-RAVAZZI, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, J. A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. **Cytobios.** v. 89, p. 21-30. 1997.
- MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends Ecol. Evol.** v. 20, p. 229-237. 2005.

- MANFRIN, M. H.; BRITO, R. O. A.; SENE, F. M. Systematics and Evolution of *Drosophila buzzatii* (diptera, Drosophilidae) "cluster" using mtDNA. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 94(3), p. 333-346. 2001.
- MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Cactophilic *Drosophila* in South America: a Model for Evolutionary studies. **Genetica** v. 126, p. 57-75. 2006.
- MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. Evolution genetics of reproductive behavior in *Drosophila*. **Annu. Rev. Genet.** v. 39, p. 263–291. 2005.
- MARSHALL, J. L.; ARNOLD, M. L.; HOWARD, D. J. Reinforcement: the road not taken. **Trends Ecol. Evol.** v. 17, p. 558–563. 2002.
- MASSIE, K. R.; MARKOW, T. A. Sympatry, allopatry and sexual isolation between *Drosophila mojavensis* and *D. arizonae*. **Hereditas**. v. 142, p. 51-55. 2005.
- MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and Spatial Allozyme Variation in the South American Cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae) **Biochem. Genet.** v. 41, p. 219-233. 2003.
- MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Population genetic study of allozyme variation in natural populations of *Drosophila antonietae* (Insecta, Diptera). **J. Zool. Syst. Evol.** v. 45, p. 136-143. 2007.
- McBRIDE, C. S. Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host-specialization in *Drosophila sechellia*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 104, p. 4996-5001. 2007.
- McLELLAN, T.; ENDLER, J. A. The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects. **Syst. Biol.** v. 47, p. 264–281. 1998.
- MONTEIRO, L.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica**. Holos Editora. 188 p. 1999.
- MONTEIRO, S. G.; SENE, F. M. Estudo morfométrico de populações de *Drosophila serido* das regiões central e sul do Brasil. **Rev. Bras.Genet.** v. 18, p. 283. 1995.
- MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: the mitochondrial- gene trees versus nuclear gene-trees. **Evolution** v. 49, p. 718-726. 1995.
- MOORE, W. S.; PRICE, J. T. Nature of selection in the northern flicker hybrid zone and its implications for speciation theory. In: Harrison RG (ed). **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford University Press: Oxford. p. 196-225. 1993.
- MORAES, E. M.; MANFRIN, M. H.; LAUS, A. C.; ROSADA, R. S. ; BOMFIN, S. C; SENE, F. M. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. **Heredity** v. 92, p. 466-473. 2004a.



- MORAES, E. M.; SPRESSOLA, V. L.; PRADO, P. R. R.; COSTA, L. F.; SENE, F. M. Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **J. Zool. Syst. Evol.** v. 42, p. 154-158. 2004b.
- MORAES, E. M.; SENE, F. M. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. **Genetica** v. 121, p. 119-123. 2004c.
- MORALES, A. C. **Dinâmica populacional em uma zona de contato entre espécies cactofílicas de *Drosophila* nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.** 2001. 62 f. Dissertação de Mestrado, Depto. Biologia-FFCLRP. Área de Biologia Comparada. Universidade de São Paulo. 2001.
- MORALES, A. C. **Análise histórico-evolutiva de populações das espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae).** 2005. 110 f. Tese de Doutorado. Depto. Biologia-FFCLRP. Área de Biologia Comparada. Universidade de São Paulo. 2005.
- MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** v. 18, p. 192-269. 1987.
- NAVEIRA, H.; FONTDEVILA, A. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. The genetic basis of sterility in hybrids between *D. buzzatii* and its sibling *D. serido* from Argentina. **Genetics.** v. 114, p. 841-857. 1986.
- NETTEL, A.; DODD, R. S.; AFZAL-RAFII, Z.; TOVILLA-HERNÁNDEZ, C. Genetic diversity enhanced by ancient introgression and secondary contact in East Pacific black mangroves. **Mol. Ecol.** v.17, p. 2680-2690. 2008.
- NOOR, M. A. F. Speciation driven by natural selection in *Drosophila*. **Nature.** v. 375, p. 674-675. 1995.
- NOOR, M. A. F. Reinforcement and other consequences of sympatry. **Heredity.** v. 83, p. 503-508. 1999.
- OLIVEIRA, C. C. **Causes for sexual isolation in the *Drosophila buzzatii* species cluster.** 2008. 151 f. Dissertation. University of Arkansas, United States of America. 2008.
- OMLAND, K. E.; BAKER, J. M.; PETERS, J. L. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of old and new world Holarctic ravens (*Corvus corax*). **Mol. Ecol.** v. 15, p. 795–808. 2006.
- PATTERSON, J. T.; WHEELER, M. R. Description of new species of the subgenera *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. **Univ. Tex. Publs.** v. 4213, p. 67-109. 1942.
- PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C.; SENE, F. M. Notes on breeding and feeding site of some of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Cienc.Cult.** São Paulo. v. 35, p. 1313-1319. 1983.

- PICCINALI, R.; AGUADE, M.; HASSON, E. Comparative molecular population genetics of the Xdh locus in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. **Mol. Biol. Evol.** v. 21, p. 141–152. 2004.
- PINHEIRO, F.; DINIZ, I. R.; COELHO, D.; BANDEIRA, M. P. S. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian cerrado. **Austral Ecol.** v. 27, p. 132–136. 2002.
- PLÖTNER, J.; UZZELL, T.; BEERLI, P.; SPOLSKY, C.; OHST, T.; LITVINCHUK, S. N.; GUEX, G. D.; REYER, H. U.; HOTZ, H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs. **J. Evol. Biol.** v. 21, p. 668–681. 2008.
- RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** v. 27, p. 83–109. 1996.
- RICE, W. R.; SALT, G. W. The evolution of reproductive isolation as a correlated character under sympatric conditions: experimental evidence. **Evolution.** v. 44, p. 1140–1152. 1990.
- RIESEBERG, L. H.; BRUNSFELD, S. J. Molecular evidence and plant introgression. **Molecular systematics of plants.** Chapman and Hall, New York. p. 151–178. 1992.
- RIESEBERG, L. H.; BUERKLE, C. A. Genetic mapping in hybrid zones. **Am. Nat.** v. 159, p. 36–50. 2002.
- RIESEBERG, L. H.; SOLTIS, D. E. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. **Evol. Trends. Plant.** v. 5, p. 65–84. 1991.
- RIESEBERG, L. H.; WENDEL, J. F. Introgression and Its Consequences in Plants. In R. G. Harrison, ed. **Hybrid zones and the evolutionary process.** Oxford Univ. Press, Oxford, U.K. p. 70–109. 1993.
- ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 21, p. 299–316. 1990a.
- ROHLF, F. J. **TPSDig.** Software disponível em:  
<<http://www.morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>> Department of Ecology and Evolution, State University of New York. 2001.
- ROHLF, F. J. **TPSRelw.** Software disponível em:  
<<http://www.morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>> Department of Ecology and Evolution, State University of New York. 2003.
- ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F.; A revolution in morphometrics. **Trends Ecol. Evol.** v. 8, p. 129–132. 1993.
- ROHLF, F. J.; SLICE, D. Extensions of the procrustes method for the superimposition of landmarks. **Syst. Zool.** v. 39, p. 40–59. 1990.

- ROSS, C. L.; HARRISON, R. G. A Fine-scale spatial analysis of the mosaic hybrid zone between *Gryllus firmus* and *Gryllus pennsylvanicus*. **Evolution**. v. 56, p. 2296–2312. 2002.
- RUEGG, K. Genetic, morphological, and ecological characterization of a hybrid zone that spans a migratory divide. **Evolution**. v. 62, p. 452-466. 2008.
- RUIZ, A.; CANSIAN, A. M.; KUHN, G. C. S.; ALVES, M. A. R.; SENE, F. M. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. **Genetica** v. 108, p. 217-227. 2000.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSEN, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 74, p. 5463-5467. 1977.
- SCHLUTER, D.; MCPHAIL, J. D. Ecological character displacement and speciation in sticklebacks. **Am. Nat.** v. 140, p. 85–108. 1992.
- SCHNEIDER-BROUSSARD. R.; FELDER, D. L.; CHLAN, C. A.; NEIGEL, J. E. Tests of phylogeographic models with nuclear and mitochondrial DNA sequence variation in the stone crabs, *Menippe adina* and *Menippe mercenaria*. **Evolution**. v. 52, p. 1671–1678. 1998.
- SCHWENK, K.; BREDE, N.; STREIT, B. Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. **Phil. Trans. R. Soc. B**. v. 363, p. 2805–2811. 2008.
- SEEHAUSEN, O.; ALPHEN, J. J. M.; WITTE, F. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. **Science**. v. 277, p. 1808–1811. 1997.
- SEFC, K. M.; PAYNE, R. B.; SORENSON, M. D. Genetic continuity of brood-parasitic indigobird species. **Mol. Ecol.** v. 14, p. 1407–1419. 2005.
- SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* in South América. In **Ecological Genetics and Evolution. The Cactus-Yeast-Drosophila Model System**, edited by J.S.F. Barker and W.T. Starmer. Academic Press, Sydney. p. 99-106. 1982.
- SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. **Pac. Sci.** v. 42, p. 81-88. 1988.
- SERVEDIO, M. R; NOOR, M. A. F. The role of reinforcement in speciation: theory and data. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 34, p. 339–364. 2003.
- SERVEDIO, M. R. The what and why of research on reinforcement. **PloS Biol.** v. 2, p. 2032–2035. 2004.
- SEVENSTER, J. G.; VAN ALPHEN, J. J. M. A life history trade-off in *Drosophila* species and community structure in variable environments. **J. Anim. Ecol.** v. 62, p. 720-736. 1993.

- SHOEMAKER, R. C.; POLZIN, K.; LABATE, J.; SPECHT, J.; BRUMMER, E. C.; OLSON, T.; YOUNG, N.; CONCIBIDO, V.; WILCOX, J.; TAMULONIS, J. P.; KOCHERT, G.; BOERMA, H. R. Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). **Genetics**. v. 144, p. 329-338. 1996.
- SILVA, A. F. G.; SENE, F. M. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Entomol.** v. 35, p. 455-468. 1991.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 87, p. 651-701. 1994.
- SOTA, T. Radiation and reticulation: extensive introgressive hybridization in the carabid beetles *Ohomopterus* inferred from mitochondrial gene genealogy. **Popul. Ecol.** v. 44, p. 145-156. 2002.
- SOTO, E. M.; SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; FANARA, J. J.; HASSON, E. Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. **Entomol. Exp. Appl.** v. 126, p. 18-27. 2008.
- SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; FANARA, J. J.; HASSON, E. Evolution of male genitalia: Environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. **BMC Evol. Biol.** v. 7, p. 77. 2007.
- SOTO, I. M.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M.; HASSON, E. Viability and developmental time in the cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera: Drosophilidae) are dependent of the cactus host. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 4, p. 490-496. 2007c.
- SPAACK, P. Hybridization in the *Daphnia galeata* complex: are hybrids locally produced?: Cladocera: the biology of model organisms. **Hydrobiologia**. v. 360, p. 127-133. 1997.
- STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. Disponível em: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). 2001.
- TAKAMI, Y.; SUZUKI, H. Morphological, genetic and behavioural analyses of a hybrid zone between the ground beetles *Carabus lewisianus* and *C. albrechti* (Coleoptera, Carabidae): asymmetrical introgression caused by movement of the zone? **Biol. J. Linn. Soc.** v. 86, p. 79-94. 2005.
- TAYLOR, D. J.; HEBERT, P. D. N. Habitat dependent hybrid parentage and differential introgression between neighboring sympatric *Daphnia* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** n. 90, p. 7079-7083. 1993.

- TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 87, p. 233–247. 2006.
- TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. *Drosophila seriema*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 88, p. 139-142. 1995.
- TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Two new species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). **Iheringia Ser. Zool.** v. 90, p.141-146. 2001.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 4673-4680. 1994.
- TOSI, D.; SENE, F. M. Further studies on chromosomal variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Genet.** v. 12, p. 729-746. 1989.
- URBANELLI, S. Genetic divergence and reproductive isolation in the *Ochthebius* (*Calobius*) complex (Coleoptera: Hydraenidae). **Heredity.** v. 88, p. 333–341. 2002.
- URBANELLI, S.; PORRETTA, D. Evidence of reinforcement of premating isolation between two species of the genus *Ochthebius* (coleoptera: hydraenidae). **Evolution.** v. 62, p. 1520–1527. 2008.
- VILELA, C. R.; SENE, F. M. Two new neotropical species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Papéis Avulsos de Zoologia** v. 30, p. 295-299. 1977.
- VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Entomol.** v. 27, p. 1-114. 1983.
- VILLWOCK, J. A.; TOMAZELLI, L. J.; LOSS, E. L.; DEHNHARDT, E. A.; HORN F°, N. O.; BACHI, F. A.; DEHNHARDT, B. A. Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. In **Quaternary of South American and Antartic Peninsula**. Rotterdam, Balkema, editado por J. Rabassa. v. 4, p. 79-97. 1986.
- WASSERMAN, M.; RICHARDSON, R. H. Evolution of Brazilian *Drosophila mulleri* complex species. **J. Hered.** v. 78, p. 282-286. 1987.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In **Inversion polymorphism in *Drosophila***, editado por C. B. Krimbas e J. R. Powell. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. p. 455-552. 1992.
- WHITTEMORE, A. T; SCHAAL, B. A. Interspecific gene flow in sympatric oaks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 88, p. 2540–2544. 1991.

WILSON, P. J.; GREWAL, S.; LAWFORD, I. D.; HEAL, J. N. M.; GRANACKI, A. G.; PENNOCK, D.; THEBERGE, J. B.; THEBERGE, M. T.; VOIGT, D. R.; WADDELL, W.; CHAMBERS, R. E.; PAQUET, P. C.; GOULET, G.; CLUFF, D.; WHITE, B. N. DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. **Can. J. Zool.** v. 78, p. 2156–2166. 2000.

**APÊNDICE A.** Relação das localidades amostradas por Morales (2005), incluídas neste trabalho, e as espécies e haplótipos identificados. Entre parênteses está o número de indivíduos que apresentam o respectivo haplótipo.

<b>Localidade</b>	<b>Espécie</b>	<b>Código</b>	<b>Haplótipos</b>
Milagres-BA	<i>D. serido</i>	J92/1431	1(3); 4; 13(2); 14.
Manoel Vitorino-BA	<i>D. serido</i>	J93	1(3); 13(2); 15.
Andaraí-BA	<i>D. serido</i>	J94	16; 17.
Itaberaba-BA	<i>D. serido</i>	J95	1(2); 18.
Mucuri-BA	<i>D. serido</i>	Muc1 /Muc2	1(3); 19; 22(3); 23; 24; 25; 26
Arraial do Cabo-RJ	<i>D. serido</i>	N20	37(2); 19; 22(5); 37(2).
São Sebastião-SP	<i>D. serido</i>	N17/J99	19(6); 20; 21; 32; 33.
Guaratuba-SP	<i>D. serido</i>	N2	19(4); 22; 27.
Ilha de Alcatrazes-SP	<i>D. serido</i>	Ilh	22(2); 36.
Paúba-SP	<i>D. serido</i>	N19	19(4); 22; 34; 35.
Cianorte-PR	<i>D. antonietae</i>	D93	39.
Florianópolis-SC	Área de contato	J22/N8	1(8); 2(3); 3(2); 5; 28; 29; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 51; 82(2); 83; 84; 85.
Praia Grande-SC	<i>D. serido</i>	J52	1(5); 7; 8; 9; 10.
Garopaba-SC	Área de contato	J56	3(2); 11; 12; 73; 74.
Gov. Celso Ramos-SC	Área de contato	N9	1(2); 86.
Armação-SC	<i>D. antonietae</i>	J55	2(3); 67; 68; 69; 70; 71; 72.
Laguna-SC	<i>D. antonietae</i>	J57	2; 75; 76; 77; 78; 79; 80.
Camboriú-SC	<i>D. serido</i>	N10	1; 30.
Ilha de São Francisco-SC	<i>D. serido</i>	N11	31.
Santiago-RS	<i>D. antonietae</i>	J27/J28	2(6); 58; 59(2); 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66.
Arroio Teixeira-RS	Área de contato	J23	2(2); 6; 46; 47; 48; 49(2).
Cornélio-RS	<i>D. antonietae</i>	J24	2(2); 50; 51.
Tramandaí-RS	<i>D. antonietae</i>	J25	2(2); 49; 52; 53(2); 54; 55.
Osório-RS	<i>D. antonietae</i>	J26	2(4); 49; 56; 57(3).
Viamão-RS	<i>D. antonietae</i>	Via	2(3); 81.
Capão da Canoa-RS	<i>D. antonietae</i>	H42	38.
<b>Total</b>			<b>179</b>

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)