

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS – CCNE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**FILOGEOGRAFIA DE *Drosophila maculifrons* E
Drosophila griseolineata (Diptera, Drosophilidae) NA
REGIÃO SUL DO BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francine Cenzi De Ré

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**FILOGEOGRAFIA DE *Drosophila maculifrons* E *Drosophila*
griseolineata (Diptera, Drosophilidae) NA REGIÃO
SUL DO BRASIL**

Francine Cenzi De Ré

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas, Biodiversidade Animal.**

Orientadora: Lizandra Jaqueline Robe
Co – orientador: Elgion Lucio da Silva Loreto

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

D431f De Ré, Francine Zenzi

Filogeografia de *Drosophila maculifrons* e *Drosophila griseolineata* (Diptera, Drosophilidae) na região Sul do Brasil / por Francine Zenzi De Ré. – 2012.

70 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Lizandra Jaqueline Robe.

Coorientador: Elgion Lucio da Silva Loreto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2012

1. Filogeografia 2. *Drosophila maculifrons* 3. *Drosophila griseolineata*
4. Expansão populacional 5. Quaternário I. Robe, Lizandra Jaqueline II. Loreto, Elgion Lucio da Silva III. Título.

CDU 595.77

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave – CRB 10/1733
Biblioteca Central da UFSM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**FILOGEOGRAFIA DE *Drosophila maculifrons* E *Drosophila griseolineata*
(Diptera, Drosophilidae) NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

elaborada por
Francine Cenzi De Ré

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA

Lizandra Jaqueline Robe, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Elgion Lúcio da Silva Loreto, Dr. (UFSM)
(Presidente/Co-orientador)

Marco Silva Gottschalk, Dr. (FURG)

Vera Lúcia da Silva Valente, Dr^a (UFRGS)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

“A vocês que se alegraram com o meu nascimento, se dedicaram ao meu crescimento e renunciaram aos seus próprios sonhos para a realização dos meus. Presentearam-me com a riqueza do estudo e fizeram de mim, não apenas uma profissional, mas sobretudo um ser humano. Portanto, se sentem orgulho de mim, a responsabilidade maior é de vocês, pois a minha inspiração foi a sua dedicação. E quando, em algum momento, vejo que realmente sou parecida com vocês, sinto-me feliz, pois os admiro muito”.

Aos meus pais, com amor.

AGRADECIMENTOS

O sentimento é de imensa gratidão com as pessoas queridas que não mediram esforços e foram fundamentais para que eu realizasse esse trabalho de mestrado.

Gostaria de agradecer à Liz, minha Querida orientadora, que como uma mãe conduz o seu filho a dar os primeiros passos, ela me ensinou com muita paciência, a dar os primeiros passos na ciência. Obrigada pela confiança, amizade, conselhos, incentivos e toda a sua dedicação.

Ao Elgion pela acolhida no laboratório, confiança no meu trabalho, dedicação e ensinamentos constantes.

Às minhas queridas amigas e companheiras do dia a dia: Larissa, Paloma, Sinara e Valéria que me acompanham nessa longa caminhada e sempre me ajudaram em todos as ocasiões que precisei. Obrigada pelos momentos de alegria e descontração (que não foram poucos), abraços sinceros e por me acolherem nos momentos de angústia, a vocês todo o meu carinho.

Ao Gabriel e ao Mauro, por estarem sempre dispostos a me ajudar com as análises, figuras e discutir aspectos do meu trabalho.

À Stela pelo tempo dedicado ao meu trabalho e aos ensinamentos, aprendi muito contigo.

Ao Ronaldo, por todas as amostras seqüenciadas, momentos de descontração no lab e pela amizade.

Ao João Pedro e ao Pedro Fonseca por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos demais colegas e ex colegas do laboratório: Ana Paula, Bruna Renata, Camila, Felipe, Gabriela, Geovani, Málvaro, Marcela, Marjorie, Micheli, Marcos, Rithieli, valeu por tudo, trabalhar com vocês é a certeza de um excelente ambiente de trabalho!

Ao Daniel Graichen e a Maríndia Deprá pela atenção e apoio em todos os momentos que precisei, facilitando o envio das minhas amostras para seqüenciamento.

Ao Hermes José Schmitz, Carolina Flores Garcia e Marco Gottschalk pelos exemplares de *D. maculifrons* e *D. griseolineata*.

À Profa Vera Valente por facilitar o acesso ao material coletado que estava nas dependências do seu laboratório.

Àquelas pessoas que, muitas vezes deixaram de lado os seus afazeres diários para me auxiliarem nas coletas: Aline Mânica, Ana Paula Christoff, Darci José De Ré, Edward Pessano, Élgion Loreto, Elzira Floss, Felipe ten Caten, Gabriel Wallau, Jean Lucas Poppe, João Pedro Junges, Larissa Bernardo, Lizandra Jaqueline Robe, Luiz Felipe V. de Oliveira, Marcela Dambrowski, Marcelo Dalosto, Marco S. Gottschalk, Marinez Cenzi De Ré, Mário

Muller, Paloma Rubin, Pedro Fonseca, Raquel Ludtke, Ronaldo M. Golombieski, Sinara Jardim, Stela Machado, Valéria Kaminski. Se por acaso esqueci alguém me perdoem, sou muito grata a todos.

Ao Prof. Nilton Cáceres e Franchesco Della-flora pelo auxílio nas coletas do PR, SP e MS.

À todas as pessoas que permitiram o meu acesso nas suas propriedades no período de amostragens.

À Ananda que sempre esteve ao meu lado com sua amizade sincera, companhia e por compartilhar tantas alegrias.

Aos meninos do ap 305, Cássio, Elisandro e Everton pela amizade, companheirismo e pelo fornecimento das garrafas PET para a confecção das 300 armadilhas.

Ao Málvaro Salin que também contribuiu na aquisição das garrafas e foi um grande companheiro.

Às minhas amigas de Jacutinga: Andréia, Daniela, Giovana e Jossana, que apesar da distância sempre torceram por mim, compreendendo as minhas ausências e retribuindo com amizade sincera.

Aos amigos da graduação, que levarei para a vida toda e sempre me incentivaram: Ana P. Riffel, Bruna Bertagnolli, Marcela Pires, Marcelo Dalosto e Sinara Jardim.

Ao Marcelo e ao Ptolomeu pelas contribuições de inglês.

Ao meu noivo Cássio, por me auxiliar com os programas, edição das figuras, mas principalmente por me acolher nos momentos de aflição, me acalmar e comemorar comigo as minhas vitórias. Seu carinho e amor presentes em todos os momentos, são essenciais em mim e me tornam uma pessoa muito mais feliz. Obrigada amor!

Ao meu pai Darci, minha mãe Marinez e aos meus manos Fabrício e Francisco pelo amor incondicional, incentivo, carinho e por me confortarem nos momentos de tristeza e preocupação. Obrigada por fazerem o possível para que eu chegasse até aqui e por tornarem a nossa família esse “ninho” de amor e união. Para mim, vocês são os grandes mestres!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

FILOGEOGRAFIA DE *Drosophila maculifrons* e *Drosophila griseolineata* (Diptera, Drosophilidae) NA REGIÃO SUL DO BRASIL

AUTORA: FRANCINE CENZI DE RÉ
ORIENTADORA: LIZANDRA JAQUELINE ROBE
CO-ORIENTADOR: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

O período do Quaternário foi marcado por alterações consideráveis no clima e vegetação. No Hemisfério Sul, as glaciações foram mais amenas, entretanto, houve a redução da temperatura e o clima tornou-se mais seco. Dessa forma, ocorreram contrações na distribuição da Mata Atlântica e sua substituição por outros tipos, condizentes ao clima, como o Cerrado e a Caatinga. Assim, a vegetação de Mata Atlântica ficou restrita a locais úmidos e com temperaturas mais amenas, conhecidos como refúgios, os quais abrigaram grande parte da biodiversidade neste período. Sabe-se que essas alterações paleoclimáticas influenciaram a dinâmica populacional de muitas espécies, especialmente no Hemisfério Norte, porém ainda não está claro o quanto esses impactos influenciaram as espécies de distribuição Neotropical. As duas espécies em questão, *Drosophila maculifrons* e *D. griseolineata*, pertencem ao grupo *guaramunu* de *Drosophila* e são consideradas espécies irmãs, que divergiram aproximadamente há 4 milhões de anos. Porém, apesar do grau de parentesco, elas apresentam alguns padrões ecológicos distintos, sendo a primeira mais generalista e a segunda mais restrita a ambientes florestais. Devido a essa heterogeneidade ecológica, essas duas espécies são potenciais indicadoras das consequências genéticas ocasionadas pelas flutuações climáticas do Quaternário, principalmente em face de uma perspectiva comparativa. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a diversidade intra-específica de diferentes populações de *D. maculifrons* e *D. griseolineata*, analisar a estruturação de indivíduos e populações nestas duas espécies do grupo *guaramunu* e inferir as forças ecológicas e evolutivas que modelaram sua distribuição ao longo do sul e sudeste brasileiros. Para isso, nossa amostragem conta com 114 indivíduos distribuídos ao longo das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste do Brasil e Medellín na Colômbia. Foram realizadas análises de modelagem, bem como análises filogenéticas e filogeográficas, sendo que essas duas últimas basearam-se nas sequências dos genes COI (Citocromo Oxidase Subunidade I) e COII (Citocromo Oxidase Subunidade II). De uma forma geral, os resultados que inferiram a distribuição dos habitats mais adequados para cada espécie indicam que as duas espécies apresentam diversos pontos de simpatria, embora *D. maculifrons* seja mais amplamente distribuída em território brasileiro. De acordo com as análises filogeográficas, *D. maculifrons* apresenta baixos níveis de diversidade e estruturação em nível de DNA mitocondrial, o que pode ser explicado por um evento de expansão populacional recente, datado para aproximadamente 20 a 30 mil anos. Por outro lado, *D. griseolineata* apresenta níveis moderados de diversidade e estruturação populacional e suas populações parecem ter se mantido estáveis ao longo do tempo, apresentando um padrão de isolamento por distância. É, pois, interessante avaliar os fatores ecológicos e/ou evolutivos responsáveis por toda essa diferença, e esta dissertação representa um primeiro passo rumo a esse entendimento.

Palavras-chave: Filogeografia. Quaternário. Gene COI. Gene COII.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

PHYLOGEOGRAPHY OF *Drosophila maculifrons* AND *Drosophila griseolineata* (Diptera, Drosophilidae) IN THE BRAZILIAN SOUTHERN REGION

Author: FRANCINE CENZI DE RÉ
Adviser: LIZANDRA JAQUELINE ROBE
Co-Adviser: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO
Date and place of defense: Santa Maria, February, 24th, 2012.

The Quaternary period was marked by considerable changes on climate and vegetation. In the Southern Hemisphere, glaciations were milder than in the Northern Hemisphere, however, there were temperature reductions, and the climate became drier. Thus, climate-related modifications occurred in the Atlantic forest vegetation, which contracted its distribution being substituted towards other types, such as Cerrado and Caatinga. The original Atlantic forest vegetation became restricted to moist locations with milder temperatures, called refuges, which sheltered most part of the biodiversity at this time. It is known that such paleoclimatic changes affected the population dynamics of many species, especially in the Northern Hemisphere. However, it is still not clear how much these impacts influenced the species of the Neotropical region. The two species of this study, *Drosophila maculifrons* and *Drosophila griseolineata*, belong to the *guaramunu* group of *Drosophila*, and are considered sister-species that diverged about four million years ago. However, disregarding their close phylogenetic relationships, they present some distinct ecological patterns, the first species being more generalist, and the second more restricted to forest environments. Due to this ecological heterogeneity, these two species are potential indicators of the genetic consequences caused by the climatic fluctuations of the Quaternary, especially in face of a comparative perspective. The aims of this study were to evaluate the intraspecific diversity of different *D. maculifrons* and *D. griseolineata* populations, analyze the structure of individuals and populations in these two species of the *guaramunu* group and identify the ecological and evolutionary forces that modeled their distribution in Southern/Southeastern Brazil. In order to do so, 114 individuals were collected along the South, Southeast and Center-west regions of Brazil and Medellin, Colombia. Modeling analysis was performed, together with phylogenetic and phylogeographic analyses, with the last based in sequences of COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) and COII (Cytochrome Oxidase Subunit II) genes. In general, the results that inferred the distribution of the most suitable habitat for each species indicate that the two species occur in sympatry at several points, although *D. maculifrons* is more widely distributed than *D. griseolineata*, at least in the Brazilian territory. According to our phylogeographic analysis, *D. maculifrons* presents low levels of diversity and structure for mtDNA, which could be explained by a recent populational expansion event, dated for about 20 to 30 thousand years ago. On the other hand, *D. griseolineata* shows moderate levels of diversity and population structure, and its populations seem to have remained stable along time, showing a pattern of isolation by distance. So, it is interesting to evaluate the ecological and/or evolutionary factors which are responsible for all this difference, and this work represents a first step towards this understanding.

Keywords: Phylogeography. Quaternary. Gene COI. Gene COII.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Distribuição dos pontos de coleta de *D. maculifrons* e *D. griseolineata* nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.45
- Figura 2 – Distribuição potencial predita pelo algoritmo DOMAIN para as espécies *D. griseolineata* (A) e *D. maculifrons* (B) no tempo presente. As cores representam a probabilidade de ocorrência de cada espécie (%) como uma função do conjunto de 19 variáveis climáticas utilizadas nas modelagens: o verde escuro - 50-70%; o verde claro 70-80%; amarelo – 80-90%; laranja – 90-100%. Os círculos denotam os pontos de ocorrência de cada espécie, e encontram-se separados em cores da seguinte forma: círculos azul-marinho representam registros obtidos junto ao Taxodros e utilizados na calibração do modelo; círculos azul-celeste representam registros obtidos junto ao Taxodros e utilizados para testar o modelo; círculos vermelhos indicam os pontos em que cada espécie foi amostrada nas coletas realizadas durante a execução deste trabalho.46
- Figura 3 – Distribuição potencial predita pelo algoritmo MAXENT para as espécies *D. griseolineata* (A) e *D. maculifrons* (B) no tempo presente. A variação de tonalidade é uma função da probabilidade de ocorrência de cada espécie (%), sendo a intensidade do azul diretamente proporcional ao nível de adequação do habitat.46
- Figura 4 – Curvas de resposta apresentadas por *D. griseolineata* (A, C e E) e *D. maculifrons* (B, D e F) em função da variação encontrada nas variáveis: sazonalidade de precipitação (A e B), precipitação do trimestre mais úmido (C e D) e precipitação do trimestre mais seco (E e F). Os valores apresentados no eixo y representam a probabilidade de adequação da espécie em função da variação apresentada pela variável climática mensurada em mms nos três casos e apresentada no eixo x.47
- Figura 5 – Árvore de haplótipos do gene COI de *D. maculifrons*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.48
- Figura 6 – Árvore de haplótipos do gene COII de *D. maculifrons*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.48
- Figura 7 – Árvore de haplótipos para os dados concatenados em *D. maculifrons*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.49
- Figura 8 – Árvore de haplótipos para o gene COI em *D. griseolineata*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham. O V_1 é o vetor médio e indica haplótipos que foram perdidos ou não foram amostrados.50

- Figura 9 – Árvore de haplótipos para o gene COII em *D. griseolineata*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham. 50
- Figura 10 – Árvore de haplótipos para os dados concatenados em *D. griseolineata*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham. O V_1 é o vetor médio e indica haplótipos que foram perdidos ou não foram amostrados. 51
- Figura 11 – Filogenia molecular de Análise Bayesiana para os genes COI (A) e COII (B). Junto aos nós internos, há os valores das probabilidades posteriores (acima do nó) e *bootstrap* (abaixo do nó), e o tamanho dos ramos é proporcional ao número de substituições por sítio. As siglas representam a procedência de cada indivíduo: ST – Medellín/CO; OS – Osório/RS; RG – Rio Grande/RS; PL – Pelotas/RS, SP – Jundiaí/SP; CA – Florianópolis/SC; JU – Bossoroca/RS; JA – Jacutinga/RS; HZ – Horizontina/RS; SM – Santa Maria/RS; CR – Cruz Alta/RS; CC – Concórdia/SC; VV – São João do Polêsine/RS; SN – São Nicolau; RS – Rosário do Sul. Os grupos externos foram omitidos. 52
- Figura 12 – Filogenia molecular de Análise Bayesiana para os dados concatenados. Junto aos nós internos, há os valores das probabilidades posteriores (acima do ramo) e valores de *bootstrap* (abaixo do ramo), e o tamanho dos ramos é proporcional ao número de substituições por sítio. As siglas representam a procedência de cada indivíduo: ST – Medellín/CO; OS – Osório/RS; PL – Pelotas/RS, SP – Jundiaí/SP; CA – Florianópolis/SC; JU – Bossoroca/RS; JA – Jacutinga/RS; HZ – Horizontina/RS; SM – Santa Maria/RS; CR – Cruz Alta/RS; CC – Concórdia/SC; SN – São Nicolau; RS – Rosário do Sul. Os grupos externos foram omitidos. 53
- Figura 13 – Gráficos mostrando a variação no tamanho efetivo populacional inferida para *D. maculifrons* ao longo do tempo. Os gráficos foram gerados para as matrizes de COI (A) e COII (B) usando taxas de substituição estimadas individualmente para cada gene ($7,42 \times 10^{-3}$ e $1,47 \times 10^{-2}$, respectivamente) nos programas BEAST e TRACER. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontos de coleta, datas e respectivas coordenadas geográficas	55
Tabela 2 – Sequências adicionais provenientes do GenBank e seus respectivos números acesso	56
Tabela 3 – Número de indivíduos coletados e sequenciados	56
Tabela 4 – Índices de diversidade e testes de neutralidade para <i>D. maculifrons</i> , <i>D. griseolineata</i> e para os dados concatenados	57
Tabela 5 – Valores de Fst pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para <i>D. maculifrons</i> - COI	58
Tabela 6 – Valores de Fst pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para <i>D. maculifrons</i> - COII	59
Tabela 7 – Valores de Fst pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para <i>D. griseolineata</i> – COI.....	60
Tabela 8 – Valores de Fst pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para <i>D. griseolineata</i> – COII	60
Tabela 9 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) para <i>D. griseolineata</i>	60
Tabela 10 –Índices de Correlação para <i>D. maculifrons</i> e <i>D. griseolineata</i>	60

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	12
1.1 A família Drosophilidae	12
1.1.1 O grupo guarani/guaramunu	13
1.1.2 <i>Drosophila maculifrons</i> e <i>D. griseolineata</i>	14
1.2 Filogeografia: conceitos, marcadores e aplicações	15
1.2.3 Alterações ambientais do período Quaternário	17
1.2.4 Filogeografia do gênero <i>Drosophila</i> no Brasil	19
1.3 O efeito da infecção por <i>Wolbachia</i>	21
1.4 Objetivos	22
CAPÍTULO II – ARTIGO	23
Padrões filogeográficos contrastantes entre as espécies-irmãs <i>Drosophila griseolineata</i> e <i>D. maculifrons</i> (Diptera, Drosophilidae)	23
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	26
Material e Métodos	27
Resultados	31
Discussão	38
Agradecimentos	41
Referências bibliográficas	41
CAPÍTULO III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	63

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1 A família Drosophilidae

Drosophilidae é considerada uma das famílias mais diversas e amplamente distribuídas da ordem Diptera, apresentando aproximadamente 4.100 espécies distribuídas ao longo de 76 gêneros (Bächli, 2011). Esses gêneros estão divididos em duas subfamílias: Steganinae e Drosophilinae, (Toda, 2007, Bächli, 2008). Segundo Grimaldi (1988), evidências fósseis e biogeográficas sugerem que a divergência entre estas duas subfamílias ocorreu há pelo menos 70 milhões de anos.

Throckmorton (1975), com base em dados fósseis e biogeográficos, concluiu que a família Drosophilidae originou-se nas regiões tropicais do Velho Mundo. Este autor considera que a evolução da família deu-se, principalmente, a partir de ancestrais que utilizavam fungos crescidos em folhiço como principal fonte de alimento. A diversificação de substratos seria o resultado de adaptações naturais, com uma certa ênfase na utilização de frutos. A evolução de nicho associada à diversificação dos substratos explorados parece fornecer uma ótima explicação para o sucesso evolutivo da família (Robe *et al.* 2010).

Dentre todos os gêneros alocados na família Drosophilidae, pode-se destacar o gênero *Drosophila*. Considerado o mais abundante em número de espécies [cerca de 1.162, segundo Bächli (2011), 181 das quais apresentam registro para o Brasil segundo Gottschalk *et al.* (2008)], este gênero está dividido em 8 subgêneros, dentre os quais destacam-se, pela diversidade, os subgêneros *Sophophora* (336 espécies) e *Drosophila* (734 espécies). Embora o subgênero *Sophophora*, que inclui a espécie-modelo *Drosophila melanogaster*, seja amplamente explorado em trabalhos evolutivos, o subgênero *Drosophila* ainda apresenta algumas incertezas e controvérsias relacionadas à sua história evolutiva. Parte deste desconhecimento deve-se, provavelmente, à ausência de resolução obtida por alguns estudos devido ao seu histórico evolutivo envolvendo rápidas e sucessivas radiações (Throckmorton, 1975, Robe *et al.* 2005). Entretanto, muitas outras questões perduram devido à ausência de estudos. Neste contexto, torna-se relevante estudar a evolução dos grupos que fazem parte do subgênero *Drosophila*, como é o caso do grupo *guaramunu*, foco principal da presente dissertação.

1.1.1 O grupo guarani/guaramunu

O grupo *guarani* foi descrito por Dobzhansky & Pavan (1943) e apresentava-se constituído por seis espécies amplamente distribuídas na América do Sul e América Central. Análises de dados morfológicos permitiram a divisão do grupo *guarani* em dois subgrupos (King, 1947): o subgrupo *guarani* que incluía *Drosophila guaru* KING 1947, *Drosophila ornatifrons* DUDA 1927 (= *Drosophila guarani* de acordo com Vilela & Bächli, 1990) e *Drosophila subbadia* PATERSON & MAINLAND 1943; e o subgrupo *guaramunu* constituído pelas espécies *Drosophila guaraja* KING 1947, *Drosophila maculifrons* DUDA 1927 (= *Drosophila guaramunu* de acordo com Vilela & Bächli, 1990) e *Drosophila griseolineata* DUDA 1927. No entanto, atualmente, a tendência é considerar os membros do subgrupo *guaramunu* como um grupo à parte (o grupo *guaramunu*) (Throckmorton, 1975, Yotoko *et al.* 2003, Robe *et al.* 2005, 2010a e b), e esta tendência será seguida na presente dissertação.

A idéia de elevar o subgrupo *guaramunu* à categoria de grupo vem sendo proposta desde Kastritsis (1969), o qual revelou que *Drosophila griseolineata* e *Drosophila maculifrons* são mais proximamente relacionadas com espécies do grupo *tripunctata* do que com outros membros do grupo *guarani*. Caracteres moleculares nucleares e/ou mitocondriais estudados posteriormente vieram a confirmar esta hipótese (Yotoko *et al.* 2003, Robe *et al.* 2005, Hatadani *et al.* 2009, Robe *et al.* 2010a e b) ao suportar o agrupamento de *D. maculifrons* e *D. griseolineata* como um cluster independente e filogeneticamente distante das espécies *D. ornatifrons*, *D. guaru* e *D. subbadia*. Apesar destas evidências Bächli (2011), ainda mantém o status de subgrupo para cada um destes conjuntos de espécies.

Segundo Throckmorton (1975), o grupo *guaramunu* pertence à radiação *tripunctata* do subgênero *Drosophila*, que inclui outros grupos, tais como: *calloptera*, *guarani*, *cardini*, *macroptera*, *pallidipennis*, *rubrifrons*, *sticta*, *tripunctata*. Estudos moleculares vêm confirmando essa hipótese, pois mostram o grupo *guaramunu* como um grupo monofilético, situado na radiação *immigrans-tripunctata* do subgênero *Drosophila* (Yotoko *et al.* 2003, Robe *et al.* 2005, Robe *et al.* 2010a e b). Em nível mais restrito, Robe *et al.* (2010b) apresentaram o grupo *guaramunu* agrupado à *D. mediopicta* [pertencente ao grupo *tripunctata*, subgrupo III de acordo com a classificação proposta por Frota-Pessoa (1954)], formando um clado irmão da linhagem composta por *D. paramediostriata*, *D. mediopictoides* e *D. mediodiffusa*, espécies pertencentes ao grupo *tripunctata*, subgrupos II, III e IV,

respectivamente. Segundo esses autores, esses dois clusters, junto às espécies *D. mediostriata* (grupo *tripunctata* subgrupo III), *D. crocina* (grupo *tripunctata* subgrupo III), *D. nappae* (grupo *tripunctata* subgrupo I) e *D. ornatipennis* (grupo *calloptera*) compõem a linhagem *mediostriata*, uma das três grandes linhagens que compõem a radiação *tripunctata* neste trabalho.

De acordo com Robe *et al.* (2010a), o grupo *guaramunu* divergiu há cerca de 6 milhões de anos atrás, enquanto a linhagem *mediostriata* como um todo diversificou-se há aproximadamente 20 milhões de anos. Neste sentido, eventos paleogeográficos pré-glaciais do Terciário parecem ter sido importantes na origem e diversificação destas linhagens. Robe *et al.* (2010a) também suportam uma origem Neotropical para a radiação *tripunctata* como um todo, apresentando evidências biogeográficas de uma rota de colonização ancestral que sai do Velho Mundo, expande para as regiões Holárticas e invade o Neotrópico possivelmente através da Beríngia, em um cenário espacial semelhante ao sugerido por Throckmorton (1975). A dispersão e diversificação das espécies pertencentes à radiação *tripunctata* no Neotrópico em uma rota de colonização Norte-Sul foi ainda suportada em uma análise comparativa de riqueza ancestral/derivada realizada posteriormente (Robe *et al.* 2010b).

Apesar de que diversos trabalhos tenham sido realizados no sentido de esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies do grupo *guarani/guaramunu* principalmente no que se refere à análise de polimorfismos cromossômicos (Cunha *et al.*, 1953, Salzano, 1955, Kastritsis, 1969), morfologia cromossômica (Brcic, 1953, Kastritsis, 1969), padrões de isolamento reprodutivo, (King, 1947), análise de dados moleculares e morfológicos (Robe *et al.* 2002), até o momento não há estudos voltados para a filogeografia de espécies da radiação *tripunctata*, o que poderia vir a testar os cenários espaço-temporais apresentados acima em uma escala microevolutiva. A única exceção, neste caso, é um estudo de filogeografia envolvendo espécimes brasileiros de *D. polymorpha* (Brisson *et al.* 2005), embora nesse caso os padrões filogeográficos obtidos tenham sido utilizados para testar hipóteses envolvendo a origem e manutenção da variação nos níveis de pigmentação abdominal.

1.1.2 *Drosophila maculifrons* e *D. griseolineata*

Drosophila maculifrons e *D. griseolineata* são duas espécies irmãs (Robe *et al.* 2005, 2010a e b) amplamente distribuídas na região Neotropical (Bächli, 2011). *Drosophila*

griseolineata é encontrada em regiões do Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela; *D. maculifrons* apresenta registros no Brasil e Peru (Bächli, 2011). Segundo Salzano (1955), na região sul da América Latina, *D. maculifrons* é mais comum e amplamente distribuída que *D. griseolineata*, sendo que a primeira é mais generalista, encontrada tanto em regiões de Mata Atlântica como regiões do bioma Pampa, enquanto a segunda parece ser mais restrita a regiões de Mata Atlântica. Este autor encontrou uma correlação positiva entre amplitude de ocorrência e níveis de polimorfismo cromossômico na comparação entre as duas espécies, com *D. maculifrons* apresentando-se mais polimórfica em nível citogenético do que *D. griseolineata*.

O uso de um relógio molecular relaxado e calibração com dados fósseis levaram à inferência de que a divergência entre *D. maculifrons* e *D. griseolineata* ocorreu há aproximadamente 4 milhões de anos atrás (Robe *et al.* 2010a). Os resultados de King (1947), refutando a possibilidade de inseminação interespecífica entre estas espécies, são compatíveis com os moderados níveis de divergência encontrados sob uso de diferentes marcadores (Tabela 1).

Tabela 1 – Distâncias entre *D. maculifrons* e *D. griseolineata* obtidas sob uso do modelo Kimura 2-Parâmetros (Kimura, 1980) com diferentes marcadores.

Gene	Distância*
<i>COI (citocromo oxidase subunidade I)</i>	0,028
<i>COII (citocromo oxidase subunidade II)</i>	0,03
<i>hb (huchback)</i>	0,029
<i>amd(alfa metildopa)</i>	0,052
<i>ddc (dopa descarboxilase)</i>	0,041

*Valores obtidos com base em sequências disponíveis no Genbank.

1.2 Filogeografia: conceitos, marcadores e aplicações

A filogeografia é um campo da ciência que utiliza informações genéticas para estudar a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas encontradas dentro das espécies (Avise, 2000). Ela apresenta como objetivo decifrar os componentes

espaciais e temporais da estrutura populacional e interpretar os processos ecológicos e evolutivos responsáveis por eles (Beheregaray, 2008). Através da amostragem adequada dos indivíduos e de seus genes torna-se possível testar hipóteses biogeográficas e inferir os processos de origem, distribuição e manutenção da biodiversidade, bem como descrever a evolução do isolamento reprodutivo de unidades populacionais (Beheregaray, 2008).

Nos últimos 15 anos tornou-se mais acessível estudar cada um desses eventos através de suas conseqüências genéticas, que podem ser usadas para inferir e interpretar os processos evolutivos que afetaram as populações de dada espécie ao longo da história (Hewitt, 2000). Essa acessibilidade deve-se ao fato da facilidade de obtenção do DNA de cloroplasto, do DNA mitocondrial e de fragmentos de DNA provenientes de regiões nucleares não codificadoras, ideais para estudos evolutivos baseados no período Quaternário. Por outro lado, o emprego de marcadores como microssatélites e AFLPs são mais apropriados para estudos de eventos recentes (Hewitt, 2000).

Neste cenário, os marcadores mitocondriais vêm sendo amplamente empregados em estudos filogeográficos de diversas espécies animais, uma vez que o mesmo evolui mais rapidamente que o DNA nuclear, de modo a acumular um maior número de diferenças, mesmo quando espécies próximas são comparadas (Hebert *et al.* 2004b). Além disso, o genoma mitocondrial apresenta uma série de outras vantagens (Roe & Sperling, 2007): o DNA mitocondrial é haplóide, apresenta herança materna, recombinação ausente ou limitada, é mais resistente à degradação e apresenta regiões altamente conservadas que possibilitam a construção de *primers* mais robustos. Outro motivo frequentemente apontado refere-se ao fato de que o tamanho efetivo populacional do genoma mitocondrial é cerca de um quarto do genoma nuclear, o que está intimamente relacionado com o seu menor tempo de coalescência (Whitworth *et al.* 2007).

O uso crescente de marcadores moleculares como ferramenta nos estudos de filogeografia reflete o alto grau de confiabilidade dos dados, que podem ser usados para inferir eventos que coincidiram com o período evolutivo de formação de unidades populacionais, como grandes alterações geográficas ou climáticas.

1.2.3 Alterações ambientais do período Quaternário

Diversos fatores históricos, geográficos e/ou climáticos (como movimentos tectônicos, formação de montanhas, efeito de barreiras geográficas impostas pelos rios e flutuações climáticas) parecem ter influenciado a distribuição e a estruturação das populações de diferentes espécies habitantes do Hemisfério Sul ao longo da sua evolução (Haffer, 1997). Assim, além das alterações climáticas que ocorrem ao longo da história das espécies, sua demografia pode ser influenciada, por exemplo, pelos diferentes níveis de latitude e altitude, e isso fornece, muitas vezes, condições para que ocorra a aclimatação dos indivíduos (Hewitt, 2000). Estimativas temporais dos eventos de diversificação de espécies Neotropicais indicam que diferentes linhagens vêm se originando continuamente desde o Eoceno/Oligoceno até o Pleistoceno, embora eventos paleogeográficos do Terciário ou eventos paleoclimáticos do Quaternário possam ser apresentados como preponderantes para diferentes grupos de espécies (Rull, 2008).

O Quaternário representou um período de alterações climáticas constantes e periódicas, com repetidos períodos glaciais e interglaciais. O último período glacial iniciou-se por volta de 116 mil anos e teve fim há 12 mil anos, quando teve início o período interglacial presente, o Holoceno (Ledru *et al.*, 2009). Essas flutuações climáticas globais refletiram na distribuição dos seres vivos (Bennett, 1997; Hewitt, 2000). A maioria dos estudos climáticos envolvendo o período do Quaternário tardio no Brasil concentra-se na região Sul e Sudeste e baseia-se em registros fósseis de grãos de pólen. Porém, esses registros ainda são escassos se comparados a América do Norte e Europa (Behling, 1997).

Durante os períodos glaciais o Hemisfério Norte foi expressivamente coberto por geleiras que avançaram sobre os continentes, extinguindo grande parte das espécies não adaptadas a condições glaciais, e criando refúgios para a persistência de populações em alopatria. Testes filogeográficos para a validação dos modelos de presença e localização de refúgios podem ser desenvolvidos após a formulação de hipóteses envolvendo os padrões esperados de diversidade e estruturação, em uma escala regional (Moritz *et al.* 2000; Carnaval *et al.* 2009): (1) maior diversidade genética dentro de populações localizadas em refúgios com relação a áreas instáveis; (2) forte estruturação populacional entre populações localizadas em diferentes refúgios, com potencial presença de táxons-irmãos em refúgios adjacentes; (3) zonas de contato secundário entre refúgios; (4) assinaturas genéticas de expansão em áreas instáveis e recentemente colonizadas; (5) ausência de padrões genéticos de isolamento-por-

distância em áreas instáveis, já que não houve tempo para o estabelecimento de um equilíbrio migração/deriva. Sendo assim, alguns estudos voltados para a filogeografia de espécies no Hemisfério Norte revelam um padrão de contração e isolamento geográfico das populações nos períodos glaciais, seguido por expansão populacional nos períodos interglaciais (Hewitt, 2000, Alexandrino *et al.* 2002, Kotlik *et al.* 2004).

No Hemisfério Sul, por outro lado, as glaciações foram mais limitadas e as geleiras não avançaram de maneira significativa sobre os continentes, porém seu clima foi consideravelmente modificado em relação à temperatura e umidade (Ab'Saber, 1977; Clapperton, 1993). Através da análise de evidências paleoclimáticas e paleoecológicas, foi possível perceber que o período Quaternário representou para o Hemisfério Sul uma alternância de condições secas e úmidas, com biomas florestados e não-florestados mudando constantemente em distribuição, coalescendo na forma de potenciais refúgios e então expandindo novamente (Haffer, 1997). Acredita-se que este conjunto de alterações climáticas sucessivas deve ter refletido diretamente na composição e na estruturação da biodiversidade da região Neotropical. Nesse sentido, espécies habitantes e dependentes de florestas, assim como as espécies do Hemisfério Norte, devem ter sofrido ciclos constantes e periódicos de isolamento e expansão, enquanto em espécies mais generalistas, o impacto das flutuações deve ter sido mais sutil. As consequências das flutuações climáticas do Quaternário em termos de estruturação populacional e demografia devem, pois, ter variado entre diferentes espécies habitantes do Hemisfério Sul. Porém, o quanto essas instabilidades climáticas contribuíram para as taxas de especiação é um assunto controverso (Behling, 2002, Pennington *et al.* 2004, Ledru, 2005).

O efeito dessas flutuações climáticas foi evidenciado em alguns estudos recentes com espécies brasileiras. Para a Floresta Amazônica, dados palinológicos e paleoecológicos apontam para a persistência de florestas nas porções Central e Ocidental deste Bioma, e não para uma fragmentação florestal dominada por savanas (Bush *et al.* 2007). Por outro lado, para a Mata Atlântica, modelos paleoclimáticos prevêm a presença de maior estabilidade histórica em regiões da Mata Atlântica situados entre os Rios Doce e São Francisco, condizente com dados palinológicos e com os padrões de diversidade e endemismo de diversas espécies (Carnaval & Moritz, 2008). Entretanto, existe a possibilidade de que este modelo tenha apresentado um desempenho subótimo devido à metodologia de interpolação dos dados climáticos históricos utilizados como base, já que isso pode prejudicar a acurácia do paleomodelo em áreas topograficamente mais complexas como a região sul do Brasil, que apresentam gradientes ambientais mais abruptos (Carnaval & Moritz, 2008). Por outro lado,

os resultados obtidos também podem refletir o fato de que a região Sul tenha sido realmente mais instável ao longo de sua história, embora ainda assim essa área possa ter abrigado áreas florestadas em determinados períodos do Pleistoceno (Carnaval *et al.* 2009). De fato, paleomodelagem com outros organismos sugere a presença de um refúgio em uma área restrita localizada no norte do Rio Grande do Sul (Thomé *et al.* 2010).

Para testar a presença e localização de refúgios ao longo da Mata Atlântica, Carnaval *et al.*, (2009) estudaram três diferentes espécies de anfíbios com estreita relação ao bioma Mata Atlântica em um enfoque de filogeografia comparativa e mostraram dados congruentes com um cenário em que, durante os extremos climáticos do Pleistoceno Superior, houve a retração do sul da floresta e, conseqüentemente, a formação de um *hotspot* na região central da Mata Atlântica, servindo de refúgio para as três espécies estudadas. Além deste, estudos com lagartos (Pellegrino *et al.* 2005, Carnaval & Moritz, 2008) e aves (Cabanne *et al.* 2008) também demonstram a presença de maior diversidade nas potenciais regiões de refúgio da Mata Atlântica se comparada às áreas mais ao Sul. Entretanto, linhagens divergentes também têm sido observadas na parte sul da Mata Atlântica (Grazziotin *et al.* 2006). Mais recentemente, Thomé *et al.* (2010) não encontraram evidências significativas de que os refúgios teriam atuado na diversificação do grupo de espécies de anfíbios *Rhinella crucifer*, apesar de não descartarem a existência dos mesmos, principalmente em menor escala. Entretanto, segundo os autores, os padrões de fragmentação destas espécies melhor coincidem com potenciais barreiras associadas a atividades neotectônicas.

É importante acessar o quanto cada um dos fatores histórico-demográficos influenciou a evolução das diferentes espécies em diferentes escalas espaço-temporais, e o quanto a influência destes fatores foi compartilhada pelas espécies. As duas espécies estudadas do grupo *guaramunu* apresentam o potencial de acessar o impacto das flutuações climáticas e vegetacionais em uma escala comparativa, já que uma delas apresenta caráter mais especialista que a outra, conforme apresentado acima.

1.2.4 Filogeografia do gênero *Drosophila* no Brasil

Estudos recentes com plantas e animais estão sendo realizados na área de filogeografia em diversos países, inclusive no Brasil, proporcionando o conhecimento dos padrões e processos associados à variabilidade genética de diferentes populações. Embora o gênero

Drosophila seja muito utilizado em pesquisas genéticas e evolutivas, a filogeografia da maior parte de suas espécies é pouco conhecida, especialmente no que diz respeito a espécies Neotropicais.

Até o momento, há uma quantidade limitada de estudos de filogeografia envolvendo espécies brasileiras pertencentes ao subgênero *Drosophila* (Manfrin *et al.* 2001, de Brito *et al.* 2002a e b, Brisson *et al.* 2005, Manfrin & Sene, 2006, Moraes & Sene, 2007, Moraes *et al.* 2009 e Franco *et al.*, 2010a e b). Os aspectos filogeográficos abordados em cada um destes estudos variam de acordo com os seguintes grupos de objetivos principais: (1) inferência dos níveis de variabilidade intra e/ou interpopulacional, estruturação de populações de diferentes espécies e história demográfica (de Brito *et al.* 2002a; Moraes & Sene, 2007; Moraes *et al.* 2009; Franco *et al.* 2010b), com análise, por exemplo, dos padrões e rotas de colonização (de Brito *et al.* 2002b); (2) inferência dos fatores evolutivos responsáveis pela variação fenotípica observada, mediante comparação dos padrões obtidos por marcadores potencialmente neutros e pela matriz fenotípica (Brisson *et al.* 2005); (3) estimativa da variabilidade nucleotídica em análises comparativas de nível intra e interespecífico e dos níveis de hibridização introgressiva entre espécies (Manfrin *et al.* 2001; Franco *et al.* 2010a). De Brito *et al.* (2002b) e Moraes *et al.* (2009), em particular, analisaram o impacto das flutuações climáticas do Quaternário na distribuição e diferenciação de populações de espécies pertencentes ao grupo *repleta* de *Drosophila* que, por apresentarem ecologia restrita a determinadas espécies de cactus (potenciais indicadores de áreas xéricas), experimentaram ciclos de expansão e contração em sua distribuição, conforme detectado através do método NCA (Nested Clade Analysis - Templeton, 1995).

É importante enfatizar, entretanto que a lista de trabalhos mencionada apresenta alguns aspectos importantes: (1) a maior parte dos trabalhos explora questões filogeográficas de espécies pertencentes à radiação *virilis-repleta* (Manfrin *et al.* 2001, de Brito *et al.* 2002a e b, Manfrin *et al.* 2006, Moraes & Sene, 2007, Moraes *et al.* 2009 e Franco *et al.* 2010), enquanto raras espécies da radiação *immigrans-tripunctata* foram amostradas neste sentido [exceção: Brisson *et al.* (2005), que mostra que as variações de pigmentação abdominal presentes em populações de *Drosophila polymorpha* não estão relacionadas aos padrões de estruturação populacional]; (2) a filogeografia de espécies de *Drosophila* na região Sul do Brasil ainda não foi explorada em maiores detalhes, de modo que o impacto das alterações climáticas do Quaternário sobre a fauna de drosofilídeos residentes desta região ainda não é compreendida; (3) o impacto das flutuações climáticas do Quaternário ainda não foi explorado sob o ponto de

vista de espécies de *Drosophila* mais e menos dependentes das florestas Neotropicais, e, portanto, dos potenciais refúgios que estariam disponíveis nos períodos glaciais.

1.3 O efeito da infecção por *Wolbachia*

Grande parte dos insetos e outros artrópodes terrestres são infectados por bactérias parasitas e endossimbiontes do gênero *Wolbachia*, e as estimativas variam entre 15 e 75% (Werren *et al.* 1995). Esses microrganismos infectam o citoplasma das células germinativas das fêmeas e apresentam padrão de herança vertical materna (Shoemaker *et al.* 2004), com infecção primária ou invasões múltiplas algumas vezes decorrentes de transferência horizontal (Müller *et al.* 2012). Em *Drosophila*, a infecção por *Wolbachia* costuma manipular a capacidade reprodutiva do hospedeiro, podendo causar incompatibilidade citoplasmática (quando machos infectados copulam com fêmeas não-infectadas resultando em altos níveis de mortalidade na prole), bem como a morte dos machos (quando a prole masculina de fêmeas infectadas apresenta altas taxas de mortalidade) e um consequente desequilíbrio na proporção sexual entre machos e fêmeas (Riegler & O'Neill, 2004). De qualquer forma, ambos os fenômenos resultam em um aumento na frequência de fêmeas infectadas na população.

Nos estudos filogeográficos comparativos, envolvendo duas ou mais espécies, espera-se obter um conhecimento detalhado das relações entre as espécies analisadas como a sua história demográfica, colonização e padrões de estruturação e/ou fluxo gênico. Para isso, os marcadores mitocondriais são amplamente utilizados, devido ao conjunto de propriedades (anteriormente mencionadas) que apresentam, permitindo acessar as informações de eventos históricos com alto grau de confiabilidade. Porém, o DNA mitocondrial pode sofrer diferentes efeitos relacionados a infecção por *Wolbachia*, que acabam por mascarar sua capacidade informativa: (1) diminuição da variabilidade intraespecífica: quando um indivíduo infectado migra para uma população não infectada, a linhagem de *Wolbachia* se espalha e acaba homogeneizando os haplótipos mitocondriais entre as duas populações devido a *hitchhiking* (Shoemaker *et al.* 2004); (2) aumento nos níveis de estruturação populacional: quando a seleção natural mantém diferentes simbiontes em diferentes populações, apesar da migração entre elas; (3) aumento nas taxas de evolução molecular no DNA mitocondrial de linhagens infectadas, com possibilidade de fixação de mutações levemente deletérias como

consequência do pequeno tamanho populacional a que as organelas ficam sujeitas em cada ciclo de infestação pelo endossimbionte (Shoemaker *et al.* 2004).

O estudo comparativo de Shoemaker *et al.* (2004) apresenta evidências de redução da diversidade intra-específica e de aceleração nas taxas de substituição no mtDNA de *D. recens*, espécie sujeita a taxas de infecção da ordem de 98-99%, quando comparada a sua espécie-irmã não-infectada, *D. subquinaria*. Por outro lado, Muller *et al.* (2012) mostram que não há sinais claros de que a infecção recente por *Wolbachia* em *D. willistoni* tenha diminuído os níveis de diversidade no DNA mitocondrial.

É preciso tomar muito cuidado com a interpretação dos resultados obtidos exclusivamente em nível de DNA mitocondrial, já que a interação do genoma desses microrganismos com o genoma da célula hospedeira pode ocasionar fenômenos de redução na diversidade no DNA mitocondrial e ser facilmente confundido com eventos demográficos como *bottlenecks* e expansões populacionais (Tajima, 1989a).

1.4 Objetivos

Esta dissertação apresenta o objetivo geral de analisar os padrões e processos evolutivos associados à diversificação e estruturação de duas espécies do grupo *guaramunu* (*Drosophila maculifrons* e *Drosophila griseolineata*) na região Sul do Brasil. Para isso, conta com o desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos: (1) avaliar a diversidade intra-específica de diferentes populações de *D. maculifrons* e *D. griseolineata*, (2) analisar a estruturação de indivíduos e populações nestas duas espécies do grupo *guaramunu*, (3) inferir as forças ecológicas e evolutivas que modelaram sua distribuição ao longo do sul e sudeste brasileiros.

CAPÍTULO II – ARTIGO

Padrões filogeográficos contrastantes entre as espécies-irmãs *Drosophila griseolineata* e *D. maculifrons* (Diptera, Drosophilidae)

Francine Cenzi De Ré¹, Elgion Lúcio da Silva Loreto¹, Lizandra Jaqueline Robe²,

1 – Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

2 – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

Resumo

Drosophila maculifrons e *Drosophila griseolineata* são espécies irmãs pertencentes ao grupo *guaramunu* de *Drosophila*. A primeira é considerada mais generalista em termos ecológicos, ocorrendo tanto em regiões de Mata Atlântica, como em regiões do Bioma Pampa. A segunda, por outro lado, é especialista, apresentando preferência por regiões de florestas úmidas. Devido a este padrão ecológico peculiar, estas duas espécies neotropicais apresentam o potencial de acessar a ocorrência e o impacto das flutuações climáticas e vegetacionais que ocorreram durante o período do Quaternário, em uma escala comparativa. Neste sentido, o objetivo geral do trabalho foi analisar os padrões e processos evolutivos associados à diversificação e estruturação de duas espécies do grupo *guaramunu* (*D. maculifrons* e *D. griseolineata*) na região Sul do Brasil. Para isso, foram amostrados 35 locais de coleta, ao longo das regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil, sendo que alguns indivíduos provenientes de Medellín, na Colômbia foram adicionados à amostragem, perfazendo um total de 114 indivíduos coletados (61 identificados como *D. maculifrons* e 53 como *D. griseolineata*). Após a identificação morfológica, o DNA total de cada indivíduo foi isolado e os genes mitocondriais COI (Citocromo Oxidase Subunidade I) e COII (Citocromo Oxidase II) foram amplificados e seqüenciados. Após a montagem das sequências, essas foram submetidas a uma série de análises filogenéticas e filogeográficas. Também foram feitas análises de modelagem com base em registros de ocorrência previamente disponíveis e em função de variáveis ambientais atuais. Os resultados de modelagem mostram que ambas espécies apresentam distribuição semelhante em diversas regiões, com *D. maculifrons* mais amplamente distribuída que *D. griseolineata*, pelo menos no território brasileiro. Entretanto, a despeito do compartilhamento de um ancestral comum relativamente recente (4 milhões de anos), da simpatria parcial e de respostas ecológicas semelhantes, as duas espécies apresentam padrões filogeográficos essencialmente contrastantes. *D. maculifrons* apresenta baixos índices de diversidade genética e estruturação, fornecendo sinais de que tenha sido alvo de um evento de expansão populacional há cerca de 20-30 mil anos. Há indícios de que esse evento de expansão populacional tenha sido facilitado pela formação de faixas de umidade no Hemisfério Sul, tornando as condições climáticas mais amenas nesta região durante o último Máximo Glacial. Por outro lado, em *D. griseolineata* as populações revelam níveis moderados de estruturação e diversidade, em um padrão de isolamento por distância. Como a presença de um forte sinal de expansão era esperada principalmente para *D. griseolineata*, espécie mais dependente de habitats contendo florestas úmidas, cogita-se a possibilidade de que alguns resultados encontrados para esta espécie tenham sido afetados pelo seu reduzido tamanho amostral, embora uma maior sensibilidade de *D. maculifrons* a níveis reduzidos de precipitação, conforme detectado em nossos resultados, ou mesmo uma infecção recente desta espécie por *Wolbachia* forneçam hipóteses alternativas que podem vir a se confirmar.

Palavras-chave: Filogeografia, *D. maculifrons*, *D. griseolineata*, Quaternário.

Abstract

Drosophila maculifrons and *Drosophila griseolineata* are sister-species belonging to the *guaramunu* group of *Drosophila*. The first one is considered more generalist in ecological terms, occurring in regions within both Atlantic Forest and Pampa biomes. The second, in the other hand, is a specialist, showing preference for moist forest regions. Due to this peculiar ecological patterns, both neotropical species present the potential to assess the occurrence and the impact of climatic and vegetation fluctuations which occurred in the Quaternary, in a comparative scale. In this sense, the main aim of this study was to analyze the evolutionary patterns and processes associated with the diversification and structure of two species of the *guaramuru* group (*D. maculifrons* e *D. griseolineata*), in Southern Brazil. For that, 35 locations were sampled, along the South, Southeast and Center-west regions of Brazil. Some individuals collected in Medellin, Colombia, were also added to the sampling, accounting for a total of 114 individuals sampled (61 identified as *D. maculifrons* and 53 as *D. griseolineata*). Following morphological identification, the total DNA of each individual was isolated and the mitochondrial genes COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) and COII (Cytochrome Oxidase Subunit II) were amplified and sequenced. After the assembling of the sequences, these were submitted to many phylogenetic and phylogeographic analyses. Furthermore, modeling analysis was performed based on occurrence records previously available and based on current environmental variables. The modeling results show that both species present a similar distribution at several points, but *D. maculifrons* seems to be more widely distributed than *D. griseolineata*, at least as the Brazilian territory is concerned. However, despite sharing a relatively recent common ancestor (4 million years ago), the partial sympatry and the similar ecological responses, these two species show essentially contrasting phylogeographic patterns. *D. maculifrons* presents low levels of genetic diversity and population structure, showing signs that it has been subject of a population expansion event between 20 and 30 thousand years ago. There are evidences suggesting that this event was facilitated by moisture banding in South Hemisphere, rendering milder climatic conditions in this region during the Last Glacial Maximum. At contrast, concerning *D. griseolineata*, the populations showed moderated levels of structure and diversity, following an isolation by distance pattern. Since the presence of a strong signal of expansion was expected mainly for *D. griseolineata*, which is more dependent on moist forest habitats, we are considering the possibility that some results for this species have been affected by its small sample size, but greater sensitivity of *D. maculifrons* to low levels of precipitation, as detected in our results, or even a recent infection of this species by *Wolbachia* provide alternative hypotheses that may be further confirmed.

Keywords: Phylogeography. *D. maculifrons*. *D. griseolineata*. Quaternary.

Introdução

As mudanças climáticas globais tiveram grande influência na dinâmica populacional de muitas espécies, contribuindo para a determinação dos padrões de variação genética encontrados dentro e entre populações atuais. Essas perturbações ambientais foram expressivas durante o período do Quaternário e podem ter ocasionado altos níveis de fragmentação populacional nas espécies (Haffer, 1969; Hewitt, 2000, 2004). O período Quaternário é dividido em duas épocas: Pleistoceno e Holoceno, sendo que este último iniciou ao final da última glaciação e se estende até os dias atuais. Este período é popularmente conhecido como “Idade do Gelo”, devido à influência sobre o meio ambiente das constantes e periódicas glaciações que teriam ocorrido nesse intervalo de tempo (Souza *et al.* 2005). Enquanto no Hemisfério Norte as glaciações foram intensas e as geleiras avançaram sobre os continentes, no Hemisfério Sul este período parece ter envolvido uma alternância de condições secas e úmidas, com biomas florestados e savanas mudando constantemente em distribuição, coalescendo na forma de potenciais refúgios e então expandindo novamente (Haffer, 1997). Entretanto, a magnitude do impacto destes eventos na diversificação de espécies Neotropicais permanece controversa (Rull, 2008; Carnaval *et al.* 2009; Thomé *et al.* 2010).

Desde os tempos de Thomas Hunt Morgan e seus colaboradores, as espécies do gênero *Drosophila* são conhecidas na comunidade científica como organismos-modelo ideais para os mais diversos estudos no âmbito genético e evolutivo (Markow & O’Grady, 2006). De fato, até mesmo seus potenciais como indicadores no estudo do impacto dos eventos paleoclimáticos do Quaternário vem sendo evidenciados. Neste sentido, um estudo com *D. pachea* sugeriu que fatores independentes das mudanças climáticas do Pleistoceno foram responsáveis pelas expansões populacionais estimadas para esta espécie cactofílica habitante do Deserto de Sonora, que apresenta assinaturas de expansão para populações mais ao Sul, mas não para populações mais ao Norte, contrariamente ao esperado (Pfeiler *et al.* 2007). Por outro lado, estudos de filogeografia de espécies cactofílicas de *Drosophila* conduzidos na região Neotropical evidenciaram a ocorrência de ciclos de expansão/retração populacional associados às modificações climáticas do Pleistoceno, condizentes com padrões de flutuações recorrentes na distribuição de habitats xéricos (de Brito *et al.* 2002; Moraes *et al.* 2009). Entretanto, o impacto destes eventos na diversificação de espécies de *Drosophila* mais e menos dependentes de ambientes florestados permanece, ainda, por ser avaliado.

Drosophila griseolineata e *D. maculifrons* são duas espécies-irmãs (Yotoko *et al.* 2003; Robe *et al.* 2005, 2010a e b), pertencentes ao grupo *guaramunu* de *Drosophila*. Estimativas baseadas no uso de um relógio molecular relaxado sugerem que estas espécies divergiram entre si há aproximadamente 4 milhões de anos (Robe *et al.* 2010a), tempo suficiente para o desenvolvimento de barreiras pré-zigóticas de cruzamento entre elas (King, 1947). Ecologicamente, *D. maculifrons* parece ser mais generalista, sendo encontrada tanto em regiões de Mata Atlântica como em regiões do bioma Pampa, enquanto *D. griseolineata* parece ser mais restrita a regiões de Mata Atlântica (Salzano, 1955). Além disso, ao avaliar os níveis de polimorfismo cromossômico, comparando as duas espécies, o mesmo autor encontrou uma correlação positiva entre amplitude de ocorrência e níveis de polimorfismo cromossômico, com *D. maculifrons* apresentando-se mais polimórfica em nível citogenético que *D. griseolineata*.

Portanto, o objetivo geral do presente estudo é investigar a estruturação dentro e entre populações brasileiras de *D. griseolineata* e *D. maculifrons*, avaliando os padrões e processos evolutivos associados à sua história evolutiva. A comparação da estrutura filogeográfica entre espécies-irmãs com diferentes níveis de especialização é relevante para testar a hipótese que prevê que espécies mais generalistas apresentem menores níveis de estruturação populacional que espécies mais especialistas, devido às atuais disjunções e às vicariâncias históricas que afetam majoritariamente as últimas (Kelemen & Moritz, 1999). Neste último aspecto, para espécies dependentes de habitats de florestas quentes e úmidas, a presença de maiores níveis de diversidade em áreas estáveis, que serviriam como potenciais refúgios, contrastado pela presença de assinaturas de expansão populacional em áreas instáveis e recentemente colonizadas fornece um teste para a validação de modelos relacionados à ocorrência e à localização de refúgios climático-vegetacionais (Moritz *et al.* 2000; Carnaval *et al.* 2009).

Material e Métodos

Modelagens de nicho

Registros de ocorrência de *D. maculifrons* e *D. griseolineata* foram obtidos junto ao Taxodros (Bächli, 2011) e utilizados na construção de modelos de distribuição potencial através de dois métodos alternativos: o método métrico de Gower implementado pelo algoritmo DOMAIN (Carpenter *et al.* 1993), conforme executado no DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2005a), e o método de máxima entropia executado no MAXENT (Philips *et al.* 2006). Em ambos os casos, as projeções foram construídas com base na utilização das 19 variáveis

climáticas atuais disponíveis no banco de dados WORLDCLIM 1.4 (Hijmans *et al.* 2005b), com uma resolução de 2,5 minutos. Para testar a performance preditiva dos modelos gerados pelo DOMAIN, um arquivo teste contendo uma amostra aleatória de 25% dos registros de cada espécie foi utilizado para avaliar a taxa de omissão ou a fração de falso-negativos obtida pela aplicação dos modelos gerados com o uso dos registros restantes. Para testar os modelos gerados pelo MAXENT, por outro lado, para cada espécie foram reconstruídas 100 réplicas de validação-cruzada, cujos dados-teste compreendiam 25% dos registros, escolhidos de forma aleatória. O valor de AUC (Area Under the Receiving Operating Curve) também foi utilizado para avaliar o desempenho dos modelos do MAXENT.

Coletas de amostras

Coletas para obtenção de indivíduos adultos de *D. maculifrons* e *D. griseolineata* foram realizadas ao longo das regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil (Fig. 1, Tabela 1), em pontos selecionados de acordo com as predições dos modelos construídos conforme descrição acima. Além dos indivíduos coletados, foram utilizados três espécimes de *D. griseolineata* de Medellin, Colômbia, cedidas pelo *Drosophila* Species Stock Center de San Diego (estoque número 15171-2131.03). As coletas foram realizadas com auxílio de 10 a 20 armadilhas confeccionadas a partir de garrafas PET (modificada de Tidon & Sene, 1988), utilizando iscas de banana fermentada. Estas armadilhas foram distribuídas aleatoriamente em fragmentos de mata mais ou menos fechada, sendo suspensas a uma altura de aproximadamente 1,5 metros. Além das armadilhas, quando disponíveis, frutos foram coletados nos sítios de amostragem, sendo levados ao laboratório e acondicionados até a eclosão dos adultos. Os indivíduos adultos assim obtidos foram identificados através de morfologia externa e através da genitália masculina com o auxílio de bibliografia especializada (Vilela & Bächli, 1990).

Manipulação de DNA

O DNA total foi extraído de cada indivíduo através do kit NucleoSpin Tissue XS (MACHEREY-NAGEL). Os fragmentos de DNA mitocondrial foram amplificados utilizando os primers TYJ1460 (5'-TAC AAT CTA TCG CCT AAA CTT CAG CC -3') e C1N2329 (5'-ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CAT ACA-3') para o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) (Bolzan *et al.* 2011) e TL2J3037 (5'-ATG GCA GAT TAG TGC AAT GG-3') e TKN3785 (5'-GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG-3') para o gene Citocromo Oxidase c Subunidade II (COII) (Simon *et al.* 1994). As reações de PCR foram realizadas

utilizando 50-100ng de DNA, 1x tampão, 0,2 μ M de cada primer, 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, e 1U de *Taq* polimerase. A amplificação foi realizada através de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 58-60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. A fim de verificar o sucesso da amplificação, 5 μ l do produto da reação de PCR foram aplicados em um gel de agarose 0,8%, corado com Brometo de Etídio. Em seguida, os amplicons obtidos pela reação de PCR foram submetidos à purificação com o uso de uma solução contendo PEG 13% e NaCl 1,6M e então, diretamente sequenciados. Os amplicons foram sequenciados utilizando um sequenciador automático MegaBACE 500 utilizando o kit DYEnamic ET® (Amersham), de acordo com o protocolo fornecido.

Análises

As montagens e edições dos eletroferogramas foram realizadas no programa Gap4 do pacote Staden (Staden, 1996). As sequências consenso assim obtidas tiveram sua identidade confirmada pelo uso do BLASTN (NCBI site), sendo então, alinhadas entre si utilizando o algoritmo ClustalW implementado no programa Mega 5.0 (Tamura *et al.* 2011). Também foram obtidas sequências de ambos marcadores para *D. maculifrons* e *D. griseolineata* de Jundiaí/São Paulo (Hatadani *et al.* 2009) disponíveis no GeneBank (Tabela 2).

Análises Filogeográficas

Os índices de diversidade nucleotídica (π), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e número de sítios polimórficos (s), além dos testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997) foram estimados para cada gene individualmente e para a matriz de dados concatenados no programa DNAsp 5 (Librado & Rozas, 2009). Este programa também foi utilizado para estimar o número de diferenças fixadas e polimorfismos compartilhados entre as espécies, para cada um dos genes estudados. Por outro lado, dentro de cada espécie, as relações entre os haplótipos obtidos foram inferidas no programa Network por *median joining* (Bandelt *et al.* 1999).

Os níveis de diferenciação entre as populações pertencentes a cada espécie foram medidos através de estimativas de FST para ambas, e de uma análise de variância molecular (AMOVA) para *D. griseolineata*, sendo ambos os testes realizados no Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), com 100 e 1000 permutações, respectivamente e um nível de significância de 0,05. Tanto para o AMOVA, quanto para o FST, os indivíduos de *D.*

griseolineata foram divididos em dois grupos: o grupo 1 incluiu espécies coletadas no Brasil, e o grupo 2, por sua vez, incluiu indivíduos da Colômbia. Tanto para *D. griseolineata* quanto para *D. maculifrons*, cada ponto de coleta foi considerado uma população, no cálculo do FST.

O Teste de Mantel foi realizado no Arlequin v. 3.5, com 1000 permutações, para avaliar se há uma correlação positiva significativa entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações, inferindo a adequação de um modelo de isolamento por distância em cada uma das espécies. Para este teste, usou-se a distância geográfica entre as populações calculada no programa Diva-Gis 7.1 (Hijmans *et al.* 2005) com base nas coordenadas geográficas de cada população amostrada e os valores de FST como representativos da distância genética. O programa Arlequin foi também utilizado nas análises de *Mismatch Distribution* um teste para avaliar a ocorrência de expansão populacional, cuja significância foi avaliada através de 1000 permutações.

A distribuição do tamanho populacional de *D. maculifrons* ao longo do tempo foi avaliada através de uma análise *Bayesian Skyline*, conforme executado no programa BEAST 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Para realizar esta análise, as taxas evolutivas para cada gene foram estimadas no programa BEAST 1.6.1, com base na filogenia apresentada por Robe *et al.*, (2010a), e com o uso das calibrações e tempos de divergência estimados neste mesmo trabalho pelo uso dos resultados de Tamura *et al.* (2004) como priors. Os modelos evolutivos adequados para cada gene foram avaliados pelo Critério de Informação de Akaike (AIC) (Akaike, 1974), conforme implementado no MrModelTest 2.2 (Nylander, 2004), com o auxílio do PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003). Obtidas as taxas de substituição para os genes COI e COII ($7,42 \times 10^{-3}$ e $1,47 \times 10^{-2}$, respectivamente), e estimados os modelos de substituição adequados em cada caso (GTR+G e GTR+I+G, respectivamente), a análise de *Bayesian Skyline* foi realizada, individualmente para cada um dos genes. O número de gerações na MCMC (Markov Chain Monte Carlo) variou entre 50 e 500 milhões, amostradas a cada 100 mil interações. As amostragens obtidas no programa BEAST foram avaliadas no TRACER 1.4 (Drummond *et al.* 2005), onde foram estimados os valores de ESS (Effective Sample Size) de cada parâmetro e a convergência ao longo de cada corrida.

Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram executadas isolada e conjuntamente para os dois genes, mediante execução de Análises Bayesianas (AB) no programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) e Análises de Máxima Verossimilhança (ML) no Phyml (Guindon & Gascuel, 2003), ambas implementadas no servidor online Phylemon (Sánchez *et*

al. 2011). Em relação aos modelos evolutivos, tanto a AB quanto a ML foram conduzidas com base nos modelos de substituição nucleotídicas GTR+G para o gene mitocondrial COI e para os dados concatenados e GTR+I+G para o gene COII, ambos indicados pelo Critério de Akaike (AIC) implementado no MrModelTest 2.2. Na AB, a MCMC foi executada por 1 milhão de gerações para o gene COI e 2 milhões de gerações para o gene COII, com amostragens a cada 1.000 gerações. Em todos os casos, 25% das cadeias foram descartadas como burn-in na estimativa da árvore consenso de maioria e no cálculo da probabilidade posterior de cada clado. Na análise de ML, 1000 réplicas de *bootstrap* foram empregadas para a inferência da confiabilidade de cada agrupamento. A fim de dar sentido temporal à filogenia, foram utilizados os seguintes grupos-externos sucessivos: *D. cardini*, *D. nappae*, *D. mediodstriata* e *D. paramediodstriata* (Robe *et al.* 2010b).

Resultados

Modelagem de nicho

Sob as condições climáticas atuais, os modelos desenvolvidos por ambos os métodos empregados, para ambas espécies, apresentaram um desempenho satisfatório, conforme indicado pela taxa de omissão e pelos valores de AUC. Usando-se um limiar de 80% de probabilidade de ocorrência para transformação dos resultados contínuos em padrões binários de presença potencial/ausência potencial, os modelos gerados pelo DOMAIN para ambas as espécies apresentam um percentual de 0% de falso-negativos. Os valores de AUC - que variam entre 0,5 (para modelos randômicos) e 1,0 (discriminação perfeita) – apresentados pelos modelos gerados pelo MAXENT também foram satisfatórios, já que variaram na faixa de 0,88-0,92 em ambos os casos avaliados. Entretanto, as taxas de omissão dos modelos do MAXENT foram um pouco superiores, e o limiar de 90% para presença levou a um percentual médio de aproximadamente 8-9% de falso-negativos para as matrizes de calibração.

Conforme os modelos gerados pelo DOMAIN e pelo MAXENT, *D. griseolineata* e *D. maculifrons* apresentam distribuições potenciais semelhantes, compartilhando a adequação de regiões encontradas na região leste da metade Sul do Brasil (Figuras 2 e 3). Entretanto, fica claro nas comparações DOMAIN x MAXENT que a fração de área adequada para cada espécie é sempre inferior nos modelos gerados pelo segundo método, embora o MAXENT apresente predições para metade sul do Chile, uma projeção ausente no modelo gerado pelo DOMAIN. Na comparação entre as duas espécies, segundo o DOMAIN, *D. griseolineata*

parece apresentar maiores restrições na região noroeste do Rio Grande do Sul e no sudeste do Paraguai e da Bolívia, enquanto *D. maculifrons* parece ser mais restrita em áreas situadas para o norte da América do Sul (Figura 2 A e B). O MAXENT confirma este padrão, mostrando que, ao menos no que tange as populações brasileiras, *D. maculifrons* parece ser mais amplamente distribuída que sua espécie-irmã (Figura 3 A e B).

Analisando a contribuição relativa de cada uma das 19 variáveis climáticas utilizadas nos modelos gerados pelo MAXENT, tem-se que a temperatura máxima do mês mais quente foi o fator preponderante para *D. griseolineata* (apresentando uma contribuição de 46,6%), enquanto para *D. maculifrons* a sazonalidade térmica representa o fator preponderante (apresentando uma contribuição de 45,7%). Tanto *D. griseolineata* quanto *D. maculifrons* parecem ser bastante sensíveis a sazonalidade de precipitação (Figura 4 A e B). Entretanto, com relação às variáveis de precipitação nos trimestres mais seco e mais úmido, embora as duas espécies apresentem curvas de resposta essencialmente similares (Figura 4 C a F) (o mesmo acontecendo com as variáveis relacionadas à precipitação nos meses mais secos e mais úmidos – dados não mostrados), *D. maculifrons* parece ser mais sensível a precipitações médias menores que 200 mm durante o trimestre mais seco (Figura 4 E e F)

Coletas

Foram coletados e identificados 114 indivíduos de *Drosophila* pertencentes ao grupo *guaramunu*, dentre os quais encontram-se 61 indivíduos de *D. maculifrons* e 53 de *D. griseolineata* (Tabela 3). Dos 35 pontos amostrados (Tabela 1 e Figura 1), escolhidos com base nas predições de distribuição de habitats adequados (Figuras 2 e 3), 16 apresentaram registros para pelo menos uma das espécies procuradas (Tabela 3). Destes, 10 possibilitaram a amostragem apenas de espécimes de *D. maculifrons*, 3 levaram a coletas incluindo apenas espécimes de *D. griseolineata* e 3 pontos apresentaram co-ocorrência de ambas espécies (Pelotas e Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, e Florianópolis, em Santa Catarina) (Tabela 3). De acordo com as coletas realizadas, *D. maculifrons* parece ser mais comum que *D. griseolineata* no estado do Rio Grande do Sul, sendo os registros de *D. griseolineata* neste estado restritos a áreas mais próximas ao litoral (Figura 2). Em Santa Catarina, o cenário parece ser diferente, já que *D. griseolineata* apareceu em maior número neste estado, embora a amostragem reduzida deixe esta hipótese inconclusiva. Para os três locais amostrados no Paraná, um único indivíduo de *D. maculifrons* foi coletado nas dependências do município de Cianorte, no centro-norte do estado (Figura 1).

De qualquer forma, todos os pontos em que foi confirmada a presença de uma ou outra espécie estão em concordância com os modelos gerados tanto pelo DOMAIN quanto pelo MAXENT (Figuras 2 e 3). A ausência de uma ou ambas espécies em pontos preditos como apresentando alta-probabilidade de ocorrência não pode ser usada como uma evidência de falso-positivo, já que não se pode acessar com credibilidade se a espécie realmente não estava presente no meio ou se apenas deixou de ser amostrada. Além disso, há que se lembrar que a viabilidade ou não de uma espécie em determinado ambiente é afetada não apenas pelas condições abióticas do meio (o que é considerado nas modelagens), mas também pelas interações bióticas e pelas limitações de dispersão (Pearson, 2007).

Análises de sequências:

Foram seqüenciados aproximadamente 770 pares de base (pb) compreendendo a região 5' do gene COI para 43 espécimes de *D. maculifrons* e 12 espécimes de *D. griseolineata*. Além disso, foram seqüenciados aproximadamente 740 pb do gene COII (compreendendo a região 3' do gene de tRNA-Leu, o gene COII completo e a extremidade 5' do gene de tRNA-Lys – daqui para a frente referido apenas como COII) para 45 espécimes de *D. maculifrons* e 4 espécimes de *D. griseolineata*.

Diversidade genética

Na Tabela 4 estão apresentados os índices de diversidade para cada espécie analisada, bem como os resultados concatenados para os dois genes. Com relação a *D. maculifrons*, apesar de que seqüências de 44 e 46 indivíduos de tenham sido incluídas para COI e COII, respectivamente, as análises revelaram a presença de apenas 3 haplótipos para o COI e 5 para COII. Embora com *D. griseolineata* um número bem menor de indivíduos tenha sido incluído nas análises (13 – COI; 5 – COII), o número de haplótipos foi maior (6 e 4, respectivamente). Nesse sentido, todos os índices de diversidade apresentaram-se significativamente menores em *D. maculifrons* que em *D. griseolineata*. Analisando os padrões que surgem da comparação entre genes de uma mesma espécie, em geral, o gene COII revelou-se mais variável que COI, com exceção dos valores de números de sítios segregantes, de número de haplótipos e de diversidade nucleotídica em *D. griseolineata*, onde o efeito da diferença de tamanho amostral entre os dois genes parece ter sido determinante. Em concordância com este cenário, o maior índice de diversidade genética foi encontrado em *D. griseolineata* para o gene mitocondrial COII (Hd/DP = 0,900/0,161). Esse mesmo valor se mantém, quando os dados concatenados, para as amostras que tem ambos marcadores seqüenciados, são

considerados. Por outro lado, o menor índice de diversidade foi encontrado em *D. maculifrons* para o gene mitocondrial COI ($Hd/DP = 0,090/0,059$). Quando são considerados os dados concatenados para os pares de sequências, nesta mesma espécie, o índice de diversidade haplotípica eleva-se para 0,262 com desvio padrão de 0,096.

Considerando-se todos os indivíduos das duas espécies, é possível perceber que *D. maculifrons* e *D. griseolineata* diferem entre si através de 11 e seis substituições fixadas para COI e COII, respectivamente. Entretanto, estas duas espécies não apresentam sítios polimórficos em comum: (1) para o gene COI, *D. maculifrons* e *D. griseolineata* compartilham entre si duas mutações que são polimórficas para a primeira espécie, mas monomórfica para a segunda e 11 mutações que são polimórficas para *D. griseolineata* e monomórficas para *D. maculifrons*; (2) para o gene COII, as duas espécies compartilham 4 mutações que são polimórficas em *D. maculifrons* mas monomórficas em *D. griseolineata* e 6 mutações polimórficas em *D. griseolineata*, mas monomórficas em *D. maculifrons*.

Estruturação populacional

A partir da análise da distribuição geográfica/populacional e da frequência dos três haplótipos obtidos para COI de *D. maculifrons*, pode-se perceber que um dos haplótipos (aqui denominado haplótipo 1 - H₁) foi o mais frequente entre as populações incluídas no estudo, sendo encontrado em 42 dos 44 indivíduos sequenciados. Este haplótipo foi compartilhado pelos indivíduos de Bossoroca, Cruz Alta, Horizontina, Jacutinga, Pelotas, Rosário do Sul, Santa Maria, São João do Polêsine e São Nicolau, no Rio Grande do Sul (RS), pelos indivíduos de Concórdia e Florianópolis, em Santa Catarina (SC), e pelo indivíduo coletado em Jundiá, São Paulo (SP). O haplótipo 2 (H₂) foi exclusivo para um indivíduo de Cruz Alta/RS, assim como o haplótipo 3 (H₃) para um indivíduo de Santa Maria/RS (Figura 5). A árvore de haplótipos referente ao gene COII de *D. maculifrons* revela um padrão semelhante, porém, neste caso, há um total de 5 haplótipos: o haplótipo 1 (H₁) com os mesmos padrões de compartilhamento e distribuição do H₁ de COI, sendo encontrado em 42 dos 46 indivíduos sequenciados; os haplótipos 2 (H₂) e 4 (H₄), exclusivos para os indivíduos de Horizontina/RS; e os haplótipos H₃ e H₅, exclusivos de Bossoroca/RS e Jacutinga/RS, respectivamente. Em ambos os casos, todos os haplótipos exclusivos encontram-se separados do haplótipo principal por apenas uma mutação (Figuras 5 e 6). Os resultados para os dados concatenados de *D. maculifrons* compreendem 36 sequências perfazendo um total de 6 haplótipos, que diferem entre si por apenas um passo mutacional e encontram-se distribuídos ao longo dos locais de amostragem em um padrão de associação entre os networks anteriores (Figura 7): um

haplótipo principal (H_1) que aparece como o mais freqüente, sendo encontrado nos locais já listados para o H_1 de COI e para o H_1 de COII; outros cinco haplótipos com ocorrência exclusiva para uma única população, sendo o H_2 exclusivo de Santa Maria/RS, o H_3 exclusivo de Cruz Alta/RS, o H_4 e H_5 , de Horizontina/RS e o H_6 de Jacutinga/RS. O padrão de estrela apresentado pelas árvores de haplótipos e a baixa diversidade encontrada tanto para os dados individuais de cada marcador quanto para os dados concatenados permite inferir que, possivelmente, *D. maculifrons* tenha passado por um evento de expansão populacional recente na região amostrada, sendo esse evento precedido por um *bottleneck*, ou, alternativamente, por uma expansão espacial com colonização de novas áreas.

Em relação à outra espécie em questão, *D. griseolineata*, tem-se um total de 6 haplótipos para o gene COI, dentre os quais, o H_1 aparece com maior freqüência, sendo compartilhado pelas populações de Osório/RS, Pelotas/RS, Rio Grande/RS, Florianópolis/SC e Jundiaí/SP. Os haplótipos H_4 e H_5 são exclusivos de Osório/RS, da mesma forma que os haplótipos H_2 , H_3 e H_6 são exclusivos de Medellin/CO. Observando o arranjo dos haplótipos no network, percebe-se claramente que existe algum nível de estruturação populacional entre os indivíduos de Medellin/CO e as populações de procedência brasileira, cujos haplótipos encontram-se separados por no mínimo 8 passos mutacionais (Figura 8). Na Figura 9, está representada o network dos 4 haplótipos obtidos para o gene COII em espécimes de *D. griseolineata*. Neste caso, observa-se, mais uma vez, o compartilhamento de um haplótipo (H_1) entre as populações de Pelotas/RS e Osório/RS, sendo o H_2 exclusivo de Osório/RS e o H_4 exclusivo de Jundiaí/SP. Embora o número de indivíduos de *D. griseolineata* seqüenciados para COII seja pouco representativo, podendo subestimar a diversidade de haplótipos dentro e entre as populações, tanto os dados de COI, quanto os de COII e os dados concatenados (Figura 10) mostram que há um nível de estruturação entre as populações de Medellin/CO e os representantes de *D. griseolineata* coletados no Brasil. Além disso, ao contrário do padrão revelado nas árvores de haplótipos de *D. maculifrons*, não há sinais claros de expansão populacional nos networks de *D. griseolineata*, embora este resultado possa estar associado ao déficit amostral apresentado para esta espécie.

Assim como na análise das árvores de haplótipos, as análises filogenéticas foram realizadas individual e simultaneamente para os marcadores utilizados, exceto que aqui as seqüências das duas espécies foram utilizadas em conjunto e acrescidas de seus grupos-externos sucessivos. As topologias reconstruídas em cada caso por Análise Bayesiana e por Máxima Verossimilhança são extremamente similares, de forma que apenas as primeiras são apresentadas neste artigo (Figura 11). A filogenia reconstruída com base nos 770 pb da

sequência do gene mitocondrial COI (Figura 11 A) recupera as duas espécies-irmãs reciprocamente monofiléticas entre si. Para *D. maculifrons* o clado constituído foi inteiramente politômico, o que reflete o alto grau de similaridade entre as sequências. Dentro deste grande clado, entretanto, pode-se diferenciar os indivíduos portadores dos haplótipos exclusivos devido aos seus maiores tamanhos de ramo. Para *D. griseolineata* é possível observar a diferenciação entre dois clados bem suportados: um deles constituído pelos indivíduos provenientes de Medellín/CO (PP = 1.00) e o outro, por exemplares coletados no Brasil (PP = 1.00). Esse padrão está congruente com os maiores níveis de diversidade genética e estruturação populacional, corroborando os resultados previamente apresentados, em especial a distribuição dos haplótipos ao longo do *network* de COI de *D. griseolineata*. (Figura 8). A Figura 11 B traz a topologia baseada em 740 pb da sequência do gene mitocondrial COII e revela padrões semelhantes àqueles apresentados anteriormente para o outro marcador. A AB da matriz de COII, entretanto, recupera *D. griseolineata* como polifilética, diferentemente da topologia obtida para os mesmos dados sob o método de Máxima Verossimilhança (resultados não mostrados). No que se refere à distribuição dos indivíduos na filogenia, *D. maculifrons* evidencia a homogeneidade entre as diferentes sequências e a ausência de estruturação, com os indivíduos portadores de sequências diferenciadas destacados, em relação aos demais, devido a seus maiores tamanhos de ramo. Por outro lado, *D. griseolineata*, mostra mais uma vez, a divergência entre os indivíduos de Medellín/CO com os indivíduos coletados no Brasil, e o compartilhamento de um haplótipo entre as populações de Osório e Pelotas. A reconstrução filogenética para os dados concatenados, de modo geral, não revelou qualquer incongruência se comparada às análises individuais, embora aqui um maior número de haplótipos de *D. maculifrons* seja evidenciado (Figura 12).

Como não houve qualquer indício de estruturação nas análises genealógicas de *D. maculifrons*, cada localidade foi considerada como uma população individual na análise dos índices de fixação F_{st} . Neste caso, todos os valores de F_{st} foram próximos ou iguais a zero, e nenhum deles foi significativo (Tabelas 5 e 6). Considerando-se estes resultados, a análise de variância molecular, AMOVA, não foi realizada para esta espécie.

Para *D. griseolineata*, entretanto, o índice de fixação (F_{ST}) global foi de 0,20973 para o gene COI, indicando uma diferenciação genética moderada. Valores moderados de diferenciação foram ainda encontrados entre as populações de Pelotas e Osório, sendo que o F_{st} pareado indicou que há diferenciação genética pronunciada entre os indivíduos de Medellín/CO e de Pelotas/RS para o gene COI (F_{ST} = 0,36842) (Tabela 7). Entretanto,

nenhum dos valores de *F_{st}* foi significativo, provavelmente em virtude do pequeno tamanho amostral. Ainda que o teste de AMOVA tenha revelado que 45,56% da diversidade encontrada em *D. griseolineata* seja devida à diferenciação entre as populações brasileiras e a colombiana, também nesta espécie a maior parte da diversidade parece ser devida à variação dentro das populações (69,03%) (Tabela 9).

História demográfica

Nenhum dos testes de neutralidade empregados (*D* de Tajima, *D* de Fu e Li e *F* de Fu e Li) apresentou resultados negativos significativos para *D. griseolineata*, com relação a qualquer um dos marcadores (Tabela 4). Por outro lado, com *D. maculifrons*, a maior parte dos testes de neutralidade apresentou resultados significativos (Tabela 4), indicando que a espécie pode ter passado por eventos demográficos de expansão populacional, uma vez que se assuma a neutralidade dos marcadores empregados. Os únicos testes que não apresentaram valores significativos são *D* de Tajima (-1,47; $P > 0,10$) e *D* de Fu e Li (-2,47; $0,10 > P > 0,05$) para o gene COI (Tabela 4).

Os resultados do *Mismatch Distribution* para os genes COI e COII também reforçam a hipótese de que *D. maculifrons* passou por um evento de expansão populacional recente, revelando uma concordância entre as curvas observadas e esperadas, ambas com distribuição unimodal. Embora essa análise não seja tão sensível quanto os testes de neutralidade para detectar eventos de expansão, ambos convergiram para o mesmo resultado. Diferentemente dos testes de neutralidade, entretanto, o *mismatch distribution* também sugere a ocorrência de um evento de expansão para as populações brasileiras de *D. griseolineata*, o que não pode ser verificado com mais precisão enquanto a amostragem dentro desta espécie não for aumentada.

Para *D. maculifrons*, entretanto, foi possível realizar uma análise *Bayesian Skyline*, que confirmou a ocorrência de um evento de expansão populacional nas suas populações brasileiras, sugerindo que este evento tenha iniciado por volta de 20 e 30 mil anos atrás (Figura 13). Esse evento pode ser considerado recente em termos evolutivos e fornece uma explicação para baixos níveis de diversidade intraespecífica.

Embora a hipótese de expansão não possa ser melhor acessada para *D. griseolineata*, os resultados do Teste de Mantel mostram que, à despeito do baixo *N*, esta espécie apresentou correlação positiva entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas entre as populações (embora esta correlação só seja significativa com a matriz de COII). Em relação à *D. maculifrons*, o teste de Mantel não foi significativo (Tabela 10).

Discussão

Durante o Quaternário o Hemisfério Sul passou por um período de alternância de condições secas e úmidas, com biomas florestados e não florestados mudando constantemente em distribuição, transformando-se em potenciais refúgios e expandindo novamente (Haffer, 1997). Esse conjunto de flutuações climáticas e vegetacionais influenciou diretamente a distribuição das espécies habitantes do Hemisfério Sul, refletindo potencialmente na dinâmica populacional de espécies mais e menos dependentes de habitats florestados, como *D. maculifrons* e *D. griseolineata*.

Estas duas espécies-irmãs são potencialmente simpátricas em diversas regiões, em especial no leste da metade sul do território brasileiro, o que pode ser inferido não apenas na comparação das projeções de habitats adequados, mas também pelos resultados das coletas, em que três pontos apresentaram co-ocorrência de ambas as espécies. Mesmo assim, *D. maculifrons* e *D. griseolineata* apresentam padrões evolutivos independentes, revelando-se reciprocamente monofiléticas, em concordância com o esperado pela análise de cruzamentos interespecíficos feita por King (1947) e com as estimativas de tempo de divergência obtidas por Robe *et al.* (2010a). Ecologicamente, as espécies-alvo deste trabalho parecem ter permanecido bastante similares entre si, principalmente no que se refere às dependências e limitações relacionadas a fatores abióticos, como pode ser aqui demonstrado pela análise comparativa das suas curvas de resposta em função de variáveis climáticas relacionadas a temperatura e/ou precipitação. Entretanto, até o momento, os padrões filogeográficos mitocondriais apresentados por estas espécies são essencialmente contrastantes.

Segundo nossos resultados, *D. maculifrons* apresenta baixos níveis de diversidade e estruturação intraespecífica, e diversos testes indicam que esta espécie foi alvo de uma expansão populacional (testes de neutralidade, network com padrão *starlike*, *Mismatch Distribution* e *Bayesian Skyline*). Mais do que isso, os resultados das análises demográficas revelam que a espécie passou por um evento de expansão populacional recente, entre 20 e 30 mil anos, sendo esse possivelmente precedido por uma redução brusca no tamanho populacional, conhecido como gargalo de garrafa, durante o período em que as condições climáticas eram desfavoráveis. Esse evento de expansão teria coincidido, portanto, com o último Máximo Glacial, que ocorreu por volta de 20 a 18 mil anos atrás (Ledru, *et al* 1998a). Segundo Wainer *et al.* (2005), no período que compreende o último Máximo Glacial, teria ocorrido a formação de diferentes faixas na América do Sul, que formaram gradientes de umidade. Em latitudes mais altas (50°S), por exemplo, a intensidade dos ventos era maior e a

temperatura na superfície dos oceanos era mais baixa, culminando em menor fluxo de umidade para o continente, favorecendo o clima árido. Entretanto, em latitudes menores (25° - 45°S), os ventos foram menos intensos e acredita-se que nesta faixa houve um aumento significativo da temperatura na superfície do mar, o que poderia explicar o clima mais úmido nesta região. Dada a inferida limitação de *D. maculifrons* a regiões com maiores sazonalidades de precipitação e sua sensibilidade aos períodos com baixos níveis de precipitação, é possível que esta área geográfica de maior umidade tenha fornecido os fatores abióticos necessários para o estabelecimento de *D. maculifrons*, favorecendo o evento de expansão populacional. Estudos com outros drosofilídeos, restritos a ambientes xéricos, também refletem expansão populacional em decorrência de eventos pleistocênicos ocorridos no Brasil (Franco *et al.* 2010, Moraes *et al.* 2009), mas diferentemente do que parece ter ocorrido com *D. maculifrons*, nesses casos a expansão parece estar associada aos períodos de maior aridez. Padrões semelhantes também vêm sendo detectados para espécies do Hemisfério Norte, que passaram por eventos de contração populacional nos períodos glaciais, seguidos de expansão nos períodos interglaciais (Alexandrino *et al.* 2002, Hewitt, 2000).

Os padrões filogeográficos encontrados em *D. griseolineata* são contrastantes àqueles presentes em *D. maculifrons*, já que *D. griseolineata* apresentou grandes níveis de diversidade, estruturação entre populações, e nenhum sinal consistente de expansão. Essa estruturação populacional ocorre principalmente entre os indivíduos do Brasil e de Medellín/CO, formando dois grupos distintos nas árvores de haplótipos. A correlação positiva entre as distâncias genética e geográfica, detectada pelo teste de Mantel, indicam que a variação genética nessa espécie está distribuída ao longo do espaço geográfico que ela ocupa. Neste sentido, o resultado encontrado para essa espécie, pode refletir além do equilíbrio entre a deriva genética e o fluxo gênico atual, uma associação histórica entre os haplótipos das populações (Hutchison & Templeton, 1999).

Essa maior estruturação encontrada em *D. griseolineata* é compatível com o esperado, dada a sua distribuição mais restrita e sua maior associação a habitats florestados como a Mata Atlântica brasileira (Salzano, 1955). Assim, a estruturação e o padrão de isolamento por distância parece ser um reflexo da fragmentação do habitat ao qual esta espécie encontra-se associada. Em uma análise comparativa semelhante a nossa, entretanto, Kelemen & Moritz (1999) encontraram que a espécie mais generalista, *D. serrata*, é mais estruturada que a mais especialista, *D. birchii*, de distribuição restrita a florestas chuvosas. Assim, as espécies-alvo deste trabalho parecem melhor se adequar a hipótese que prevê maiores níveis de estruturação

populacional em espécies especialistas, seja por ação das disjunções atuais ou das vicariâncias históricas.

Entretanto, de acordo com Carnaval *et al.* (2009), a região sul do Brasil teria sido climaticamente instável ao longo do Quaternário, de modo que hotspots de Mata Atlântica que serviriam como potenciais refúgios a muitas espécies teriam ficado restritos à região mais central do Brasil. De acordo com essa hipótese, esperar-se-ia encontrar sinais de expansão populacional especialmente claros nas populações sul-brasileiras da espécie mais diretamente ligada à distribuição vegetacional de Mata Atlântica, ou seja, *D. griseolineata* - um padrão contrário ao aqui observado. Porém, no momento, a comparação dos resultados obtidos para as duas espécies neste quesito é inconclusivo, já que o baixo número de indivíduos amostrados para *D. griseolineata* pode ter limitado a sensibilidade dos testes. É, pois, imprescindível à realização de coletas adicionais em busca de novos indivíduos desta espécie ao longo de seu gradiente de distribuição na costa brasileira. Uma vez cumprida esta etapa, caso se confirme, a ausência de um sinal de expansão em *D. griseolineata* em detrimento de *D. maculifrons* pode vir a ser explicada pela suposta maior sensibilidade da última aos baixos níveis de precipitação nos meses secos, conforme encontrado em nossas modelagens.

Por fim, um resultado particularmente interessante de nossas análises reflete a incongruência entre os baixos níveis de diversidade mitocondrial aqui encontrados para *D. maculifrons* e os maiores níveis de diversidade citogenética detectados para esta espécie por Salzano (1955). Este é, certamente, um achado que merece ser adicionalmente avaliado pela inclusão de marcadores nucleares na comparação filogeográfica de *D. maculifrons* e *D. griseolineata*. Caso se confirme, a presença de maiores níveis de diversidade nuclear do que mitocondrial em *D. maculifrons* pode vir a refutar a hipótese de expansão populacional nesta espécie, apoiando a hipótese alternativa de que uma varredura seletiva com hitchiking mitocondrial associado ao espalhamento de *Wolbachia* ou outro endossimbionte seria responsável pela homogeneização haplotípica desta espécie (Shoemaker *et al.*, 2004). Neste caso, o tempo estimado de 20-30 mil anos aplicar-se-ia não mais ao suposto evento de expansão populacional, mas sim ao próprio período da infecção. Análises adicionais são, entretanto, necessárias para um melhor entendimento deste complexo, mas, sem dúvida alguma, essencialmente atrativo, cenário evolutivo.

Agradecimentos

Somos gratos a todos aqueles que nos ajudaram com as coletas das espécies-alvo deste trabalho, cujos nomes encontram-se mencionados na Tabela 1. Também agradecemos imensamente a Ronaldo Medeiros Golombieski, Maríndia Deprá e Daniel Graichen, que nos ajudaram, de uma forma ou outra, com as reações de sequenciamento. Agradecemos também a CAPES, pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- ALEXANDRINO J., ARNTZEN J. W., FERRAND N. Nested Clade Analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). **Heredity** 88: 66 – 74, 2002.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Trans. Automat. Contr.** 19, 716–723, 1974.
- BÄCHLI, G. **TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, v. 1.03, Database 2009/04. <http://taxodros.unizh.ch/>. Last accessed on 05/10/2011.
- BANDLET, H., FORSTER, P., ROHL, A. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16(1), p. 37-48, 1999.
- BOLZAN, A.R. **DNA barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica***. 2011. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, 323, 785-789. 2009.
- CARPENTER, G. et al. DOMAIN: a flexible modelling procedure for mapping potential distributions of plants and animals. **Biodiversity and Conservation**, 2: 667-680, 1993.
- De BRITO, R.A.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25(2), p. 161-171, 2002.
- DRUMMOND, A. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequence. **Molecular Biology and Evolution**. 22 (5):1185, 2005.
- EXCOFFIER, L., LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under linux and windows. **Molecular Ecology Resources**, 10, 564-567. 2010.
- FU, Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147:915-925, 1997.

- FRANCO, F. F. et al. Intra- and interspecific divergence in the nuclear sequences of the clock gene period in species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 33, 225-223, 2010.
- GUINDON, S., GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systems Biology** 52, 696-704, 2003.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science** 165: 131-137, 1969.
- HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, v.6 (3), p.451-476, 1997.
- HATADANI, L. M. et al. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 51 (3), 595-600. 2009.
- HEWITT, G. M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature** 405, 907-913, 2000.
- HEWITT, G. M. Genetic consequence of climatic oscillations in the Quaternary. **The Royal Society**, 359, 183-195., 2004.
- HIJMANS, R. J. et al. DIVA-GIS Version 5.2. Manual. <http://www.diva-gis.org>. 2005a.
- HIJMANS, R. J. et al. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v. 25, p. 1965-1978, 2005b.
- HUELSENBECK, J. P., Ronquist, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, vol. 17, p. 754-755, 2001.
- HUTCHISON, D. W., TEMPLETON, A. R. Correlation between pair-wise genetic and geographic distances measure: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution** 53: 1898-1914.
- KELEMEN, L., MORITZ, C. Comparative phylogeography of a sibling pair of rainforest *Drosophila* species (*Drosophila serrata* and *D. birchii*). **Evolution** 53(4): 1306-1311, 1999.
- KING, J.C. Interspecific relationships within the *guarani* group of *Drosophila*. **Evolution** 1:143-153, 1947.
- LIBRADO, P., ROZAS J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25, 1451-1452, 2009.
- MARKOV, T.A., O'GRADY, P.M. ***Drosophila: A guide to species identification and use***. Academic Press, London, pp. 3-64, 2006.
- MORAES, E.M. et al. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136-2147, 2009.

MORITZ, C., et al. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. **Review of Ecology and Systematics**. 31:533-563, 2000.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. **Evolutionary Biology Center**, Uppsala University 2004.

PEARSON, R. G. 2007. Species Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. Synthesis. American Museum of Natural History. Available at: <http://ncep.amnh.org>.

PFEILER, E., et al. Genetic differentiation and demographic history in *Drosophila pachea* from the Sonoran Desert. **Hereditas** 144:63_74, 2007.

PHILLIPS, S. J., ANDERSON, R. P., SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modeling** 190:231 – 259, 2006.

ROBE, L.J. et al. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 36:623-640. 2005.

ROBE, L.J., LORETO, E.L.S., VALENTE, V.L.S. Radiation of the *Drosophila* subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. DOI 10.1007/s10709-009-9432-5, 2010a.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.S.; LORETO, E.L.S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v. 138, p. 725-735, 2010b.

RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology** 17:2722-2729, 2008.

SALZANO, F.M. Chromosomal polymorphism in two species of the *guarani* group of *Drosophila*. **Chromosoma** 7:39-50, 1955.

SÁNCHEZ, R., et al. Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. **Nucleic Acids Research** 10.1093 | nar | gkr408, 2011.

SHOEMAKER, D. D. et al. Molecular evolutionary effects of *Wolbachia* infections: Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA. **Genetics** 168: 2049–2058, 2004.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial genes sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** 87: 651–701, 1994.

SOUZA, C. R. G. et al. **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2005. 378p.

SWOFFORD, D.L. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Version 4. **Sinauer Associates**, Massachusetts, 2003.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, vol. 5, p. 233-241, 1996.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123: 585-595. 1989.

TAMURA, K., SUBRAMANIAN, S., KUMAR, S. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. **Molecular Biology and Evolution** 21:36–44, 2004.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

THOMÉ, M.T. et al. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forestry. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 55:1018-1031, 2010.

VILELA, C.R., BACHLI, G. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of (Drosophilidae, Diptera). **Bull. Soc. Entomol. Suisse** 63 (Suppl.), 1–332, 1990.

YOTOKO, K.S.C. et al. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 28:614-619, 2003.

WAINER, I. *et al.* Last glacial maximum in South America: proxies and model results. **Geophysical Research Letters** 32 (8), L08702. doi:10.1029/2004GL021244, 2005.

Ilustrações



Figura 1 – Distribuição dos pontos de coleta de *D. maculifrons* e *D. griseolineata* nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

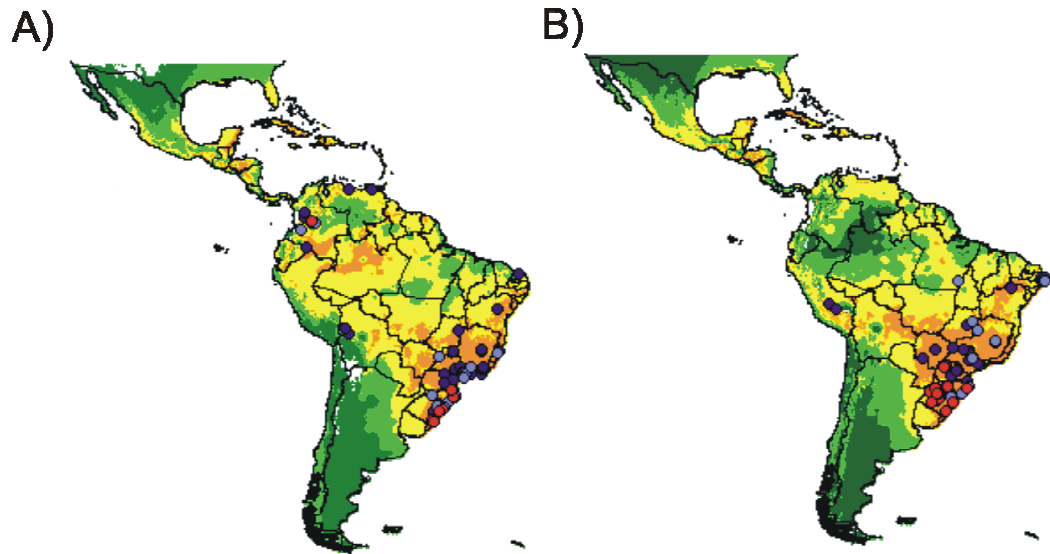


Figura 2 – Distribuição potencial predita pelo algoritmo DOMAIN para as espécies *D. griseolineata* (A) e *D. maculifrons* (B) no tempo presente. As cores representam a probabilidade de ocorrência de cada espécie (%) como uma função do conjunto de 19 variáveis climáticas utilizadas nas modelagens: o verde escuro - 50-70%; o verde claro 70-80%; amarelo - 80-90%; laranja - 90-100%. Os círculos denotam os pontos de ocorrência de cada espécie, e encontram-se separados em cores da seguinte forma: círculos azul-marinho representam registros obtidos junto ao Taxodros e utilizados na calibração do modelo; círculos azul-celeste representam registros obtidos junto ao Taxodros e utilizados para testar o modelo; círculos vermelhos indicam os pontos em que cada espécie foi amostrada nas coletas realizadas durante a execução deste trabalho.

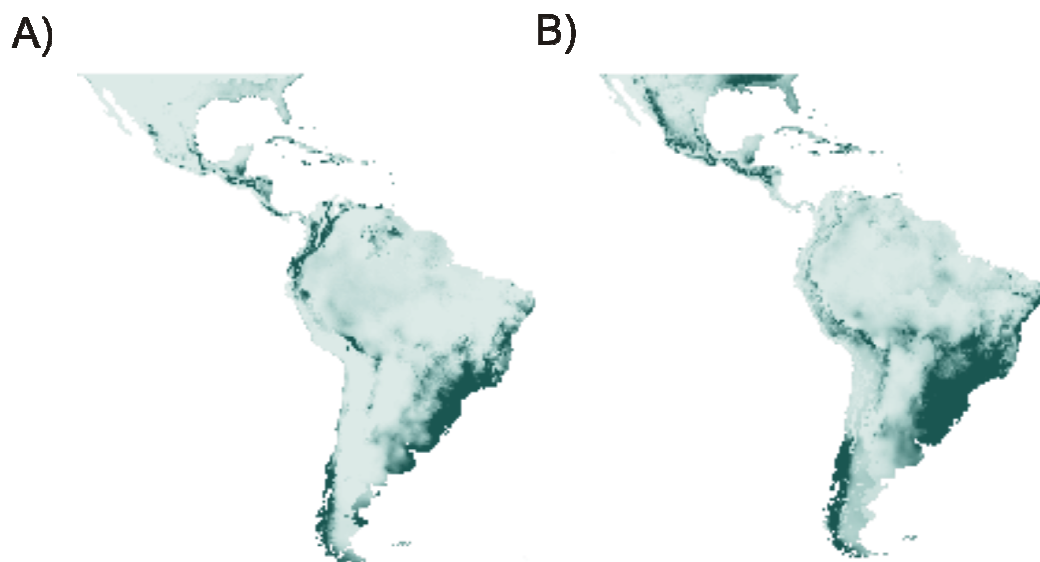


Figura 3 – Distribuição potencial predita pelo algoritmo MAXENT para as espécies *D. griseolineata* (A) e *D. maculifrons* (B) no tempo presente. A variação de tonalidade é uma função da probabilidade de ocorrência de cada espécie (%), sendo a intensidade do azul diretamente proporcional ao nível de adequação do habitat.

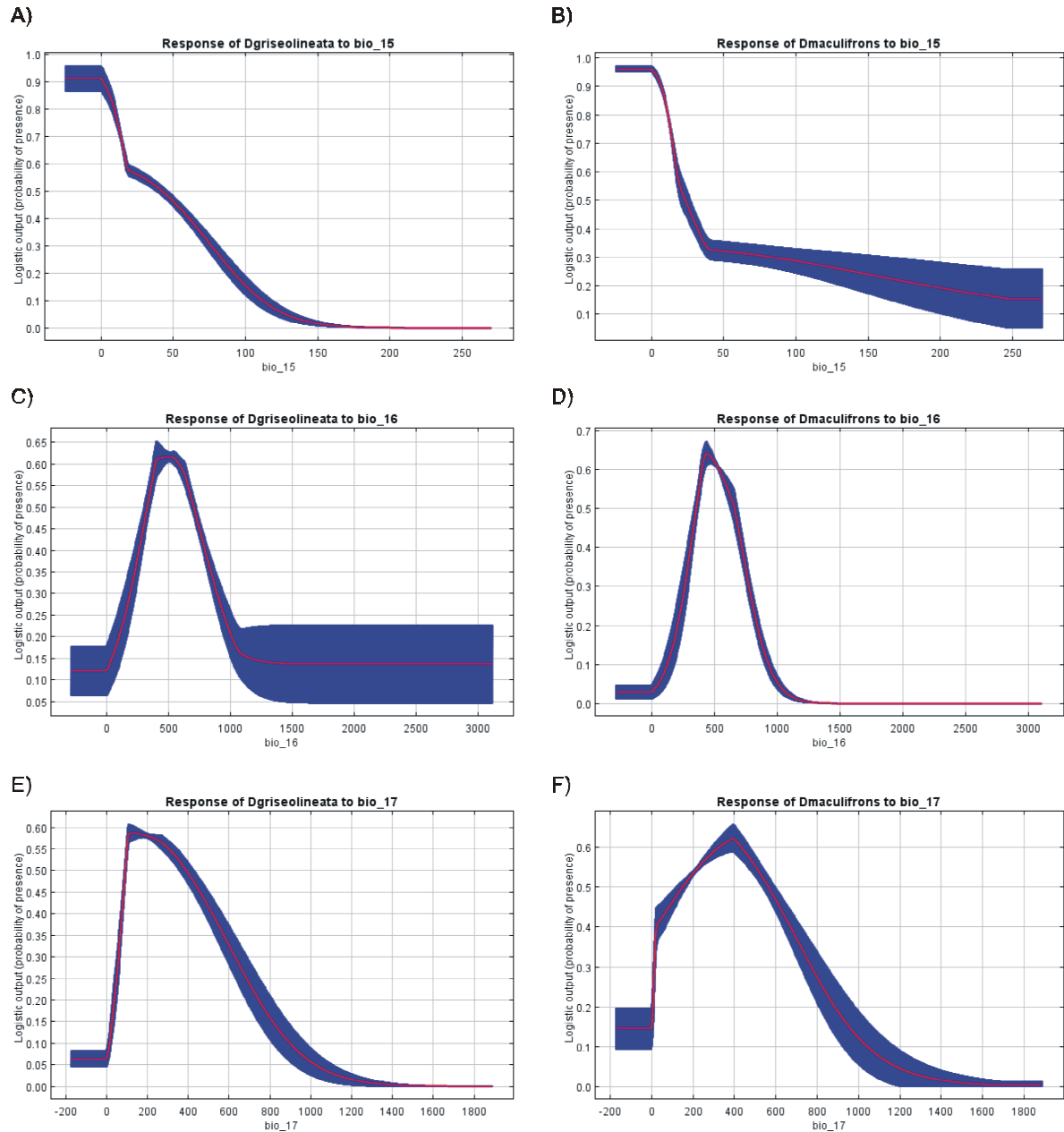


Figura 4 – Curvas de resposta apresentadas por *D. griseolineata* (A, C e E) e *D. maculifrons* (B, D e F) em função da variação encontrada nas variáveis: sazonalidade de precipitação (A e B), precipitação do trimestre mais úmido (C e D) e precipitação do trimestre mais seco (E e F). Os valores apresentados no eixo y representam a probabilidade de adequação da espécie em função da variação apresentada pela variável climática mensurada em mms nos três casos e apresentada no eixo x.

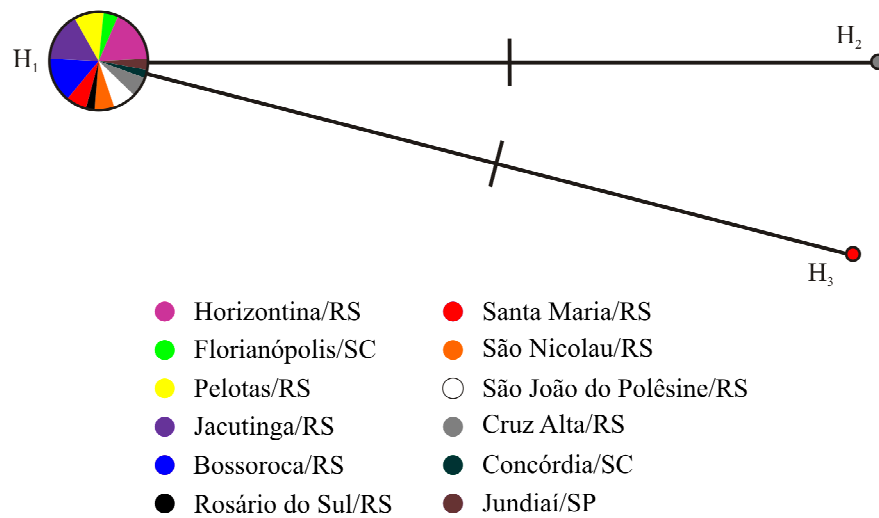


Figura 5 – Árvore de haplótipos do gene COI de *D. maculifrons*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.

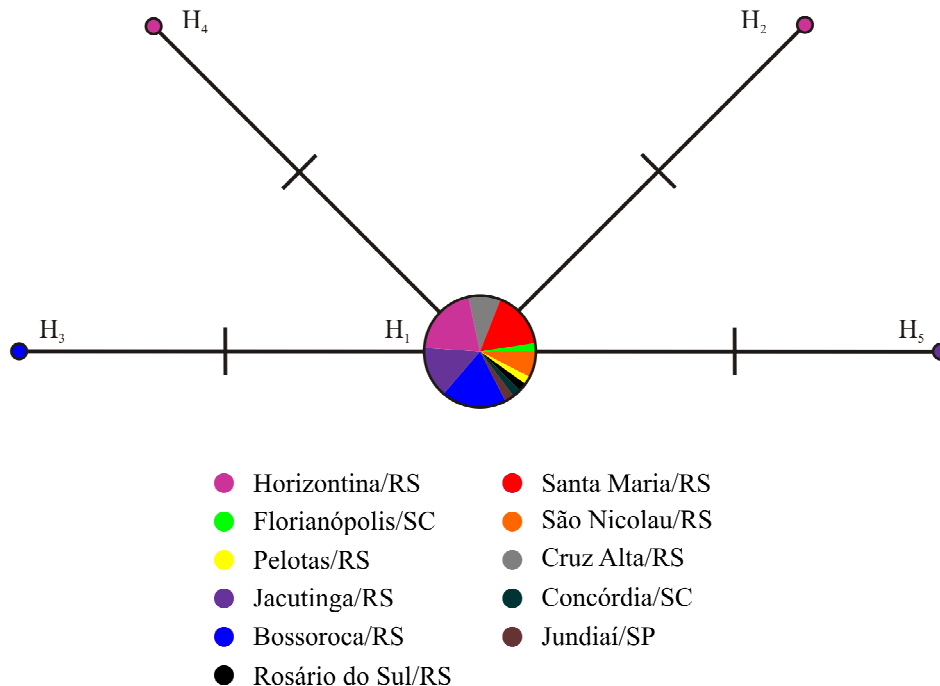


Figura 6 – Árvore de haplótipos do gene COII de *D. maculifrons*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.

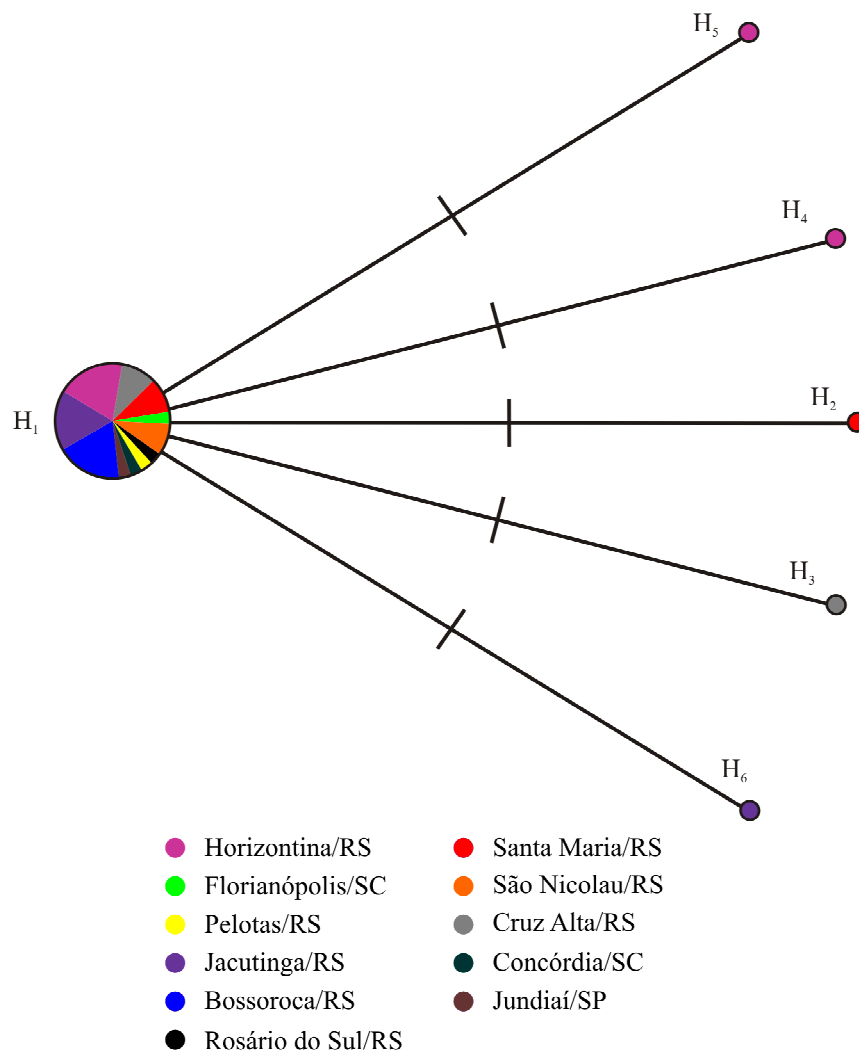


Figura 7 – Árvore de haplótipos para os dados concatenados em *D. maculifrons*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.

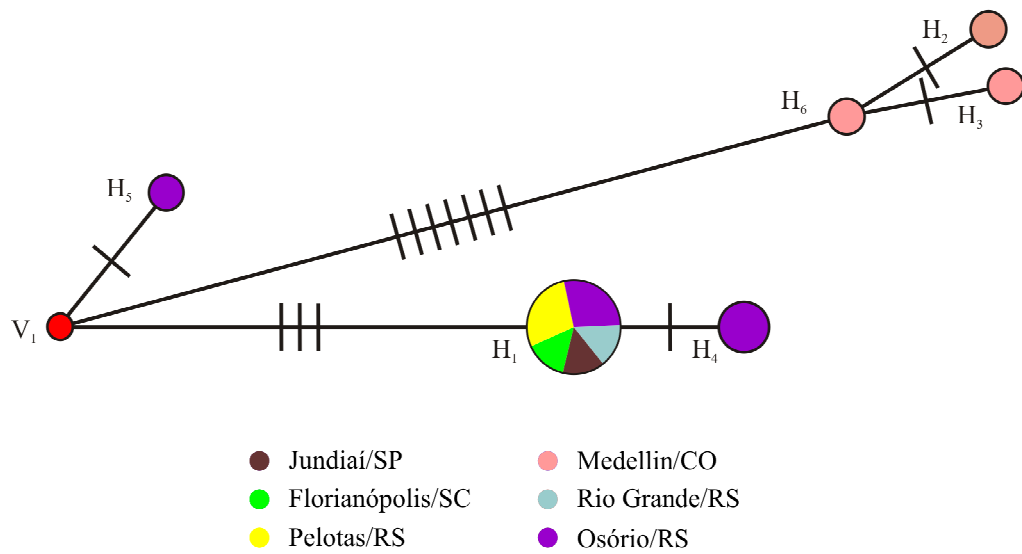


Figura 8 – Árvore de haplótipos para o gene COI em *D. griseolineata*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham. O V_1 é o vetor médio e indica haplótipos que foram perdidos ou não foram amostrados.

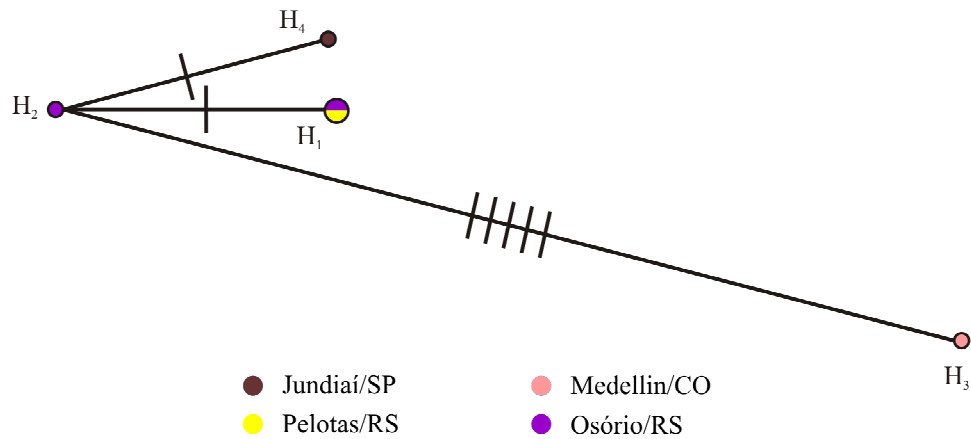


Figura 9 – Árvore de haplótipos para o gene COII em *D. griseolineata*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.

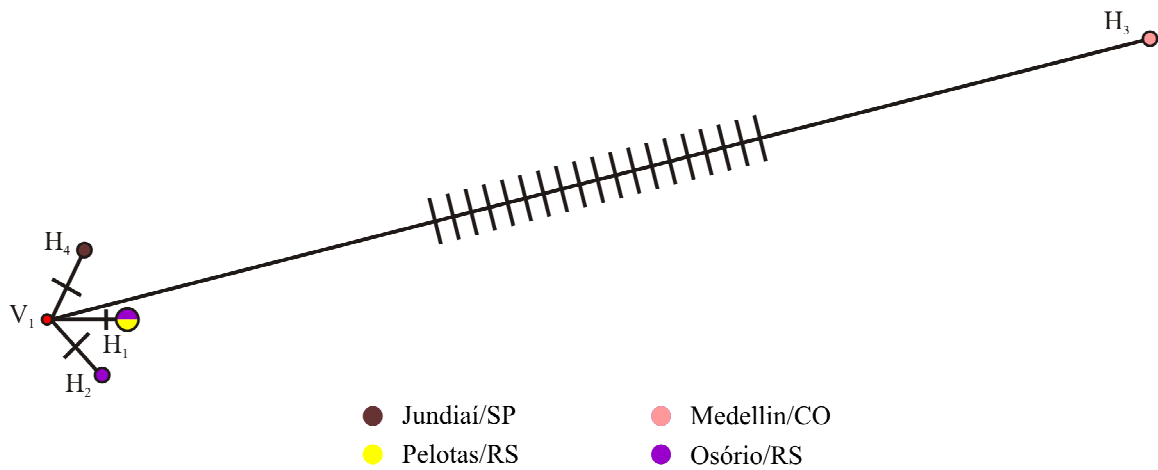


Figura 10 – Árvore de haplótipos para os dados concatenados em *D. griseolineata*. Os traços perpendiculares representam o número de mutações entre os haplótipos, representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham. O V_1 é o vetor médio e indica haplótipos que foram perdidos ou não foram amostrados.

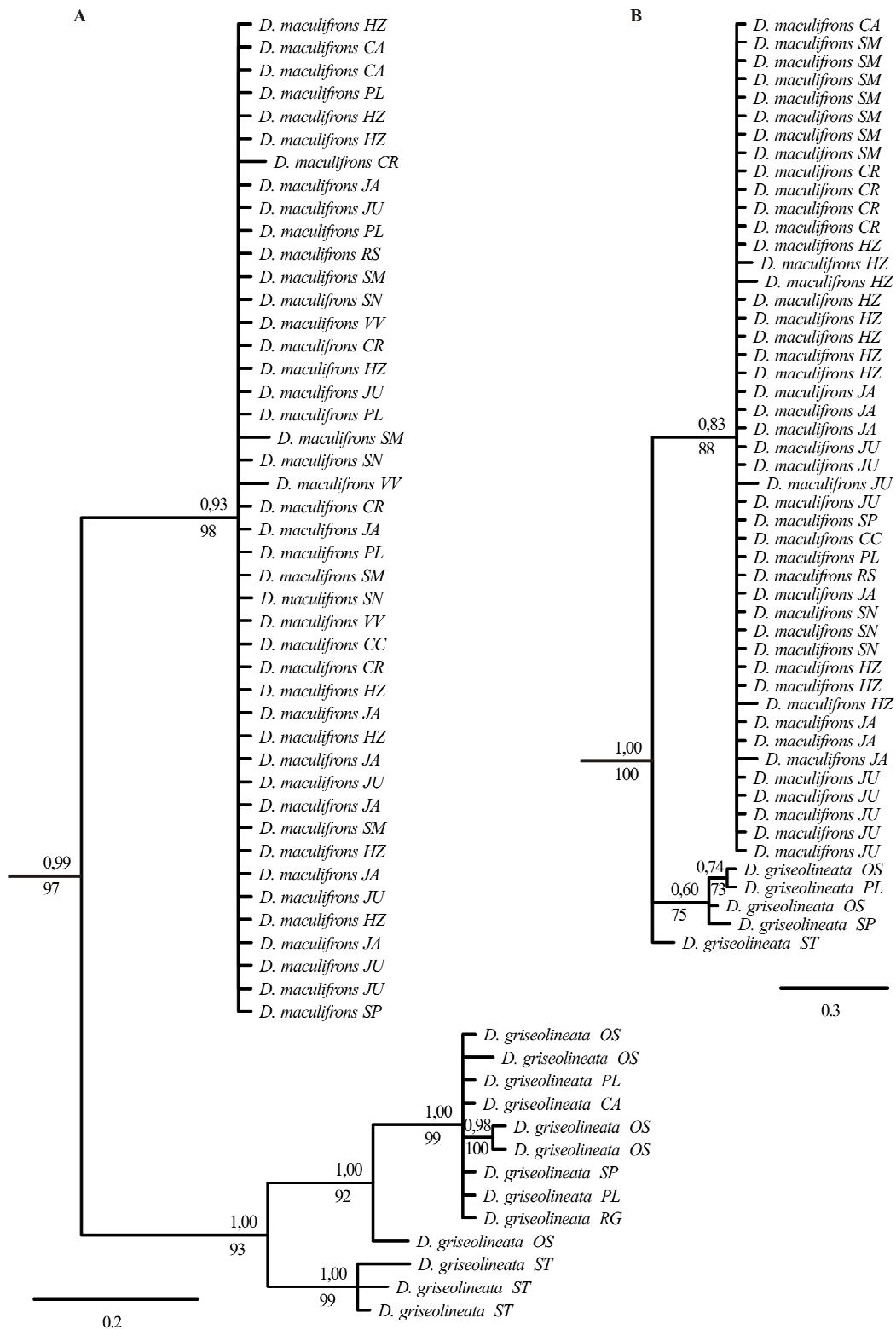


Figura 11 – Filogenia molecular de Análise Bayesiana para os genes COI (A) e COII (B). Junto aos nós internos, há os valores das probabilidades posteriores (acima do nó) e *bootstrap* (abaixo do nó), e o tamanho dos ramos é proporcional ao número de substituições por sítio. As siglas representam a procedência de cada indivíduo: ST – Medellín/CO; OS – Osório/RS; RG – Rio Grande/RS; PL – Pelotas/RS, SP – Jundiaí/SP; CA – Florianópolis/SC; JU – Bossoroca/RS; JA – Jacutinga/RS; HZ – Horizontina/RS; SM – Santa Maria/RS; CR – Cruz Alta/RS; CC – Concórdia/SC; VV – São João do Polêsine/RS; SN – São Nicolau; RS – Rosário do Sul. Os grupos externos foram omitidos.

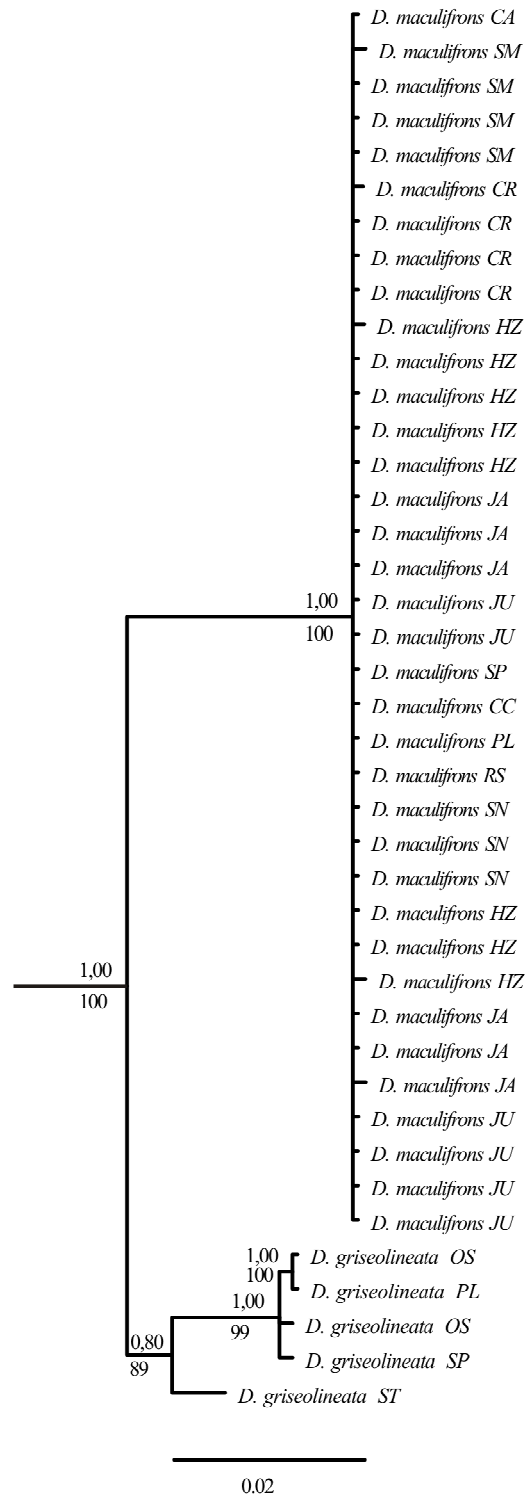


Figura 12 – Filogenia molecular de Análise Bayesiana para os dados concatenados. Junto aos nós internos, há os valores das probabilidades posteriores (acima do ramo) e valores de *bootstrap* (abaixo do ramo), e o tamanho dos ramos é proporcional ao número de substituições por sítio. As siglas representam a procedência de cada indivíduo: ST – Medellín/CO; OS – Osório/RS; PL – Pelotas/RS, SP – Jundiaí/SP; CA – Florianópolis/SC; JU – Bossoroca/RS; JA – Jacutinga/RS; HZ – Horizontina/RS; SM – Santa Maria/RS; CR – Cruz Alta/RS; CC – Concórdia/SC; SN – São Nicolau; RS – Rosário do Sul. Os grupos externos foram omitidos.

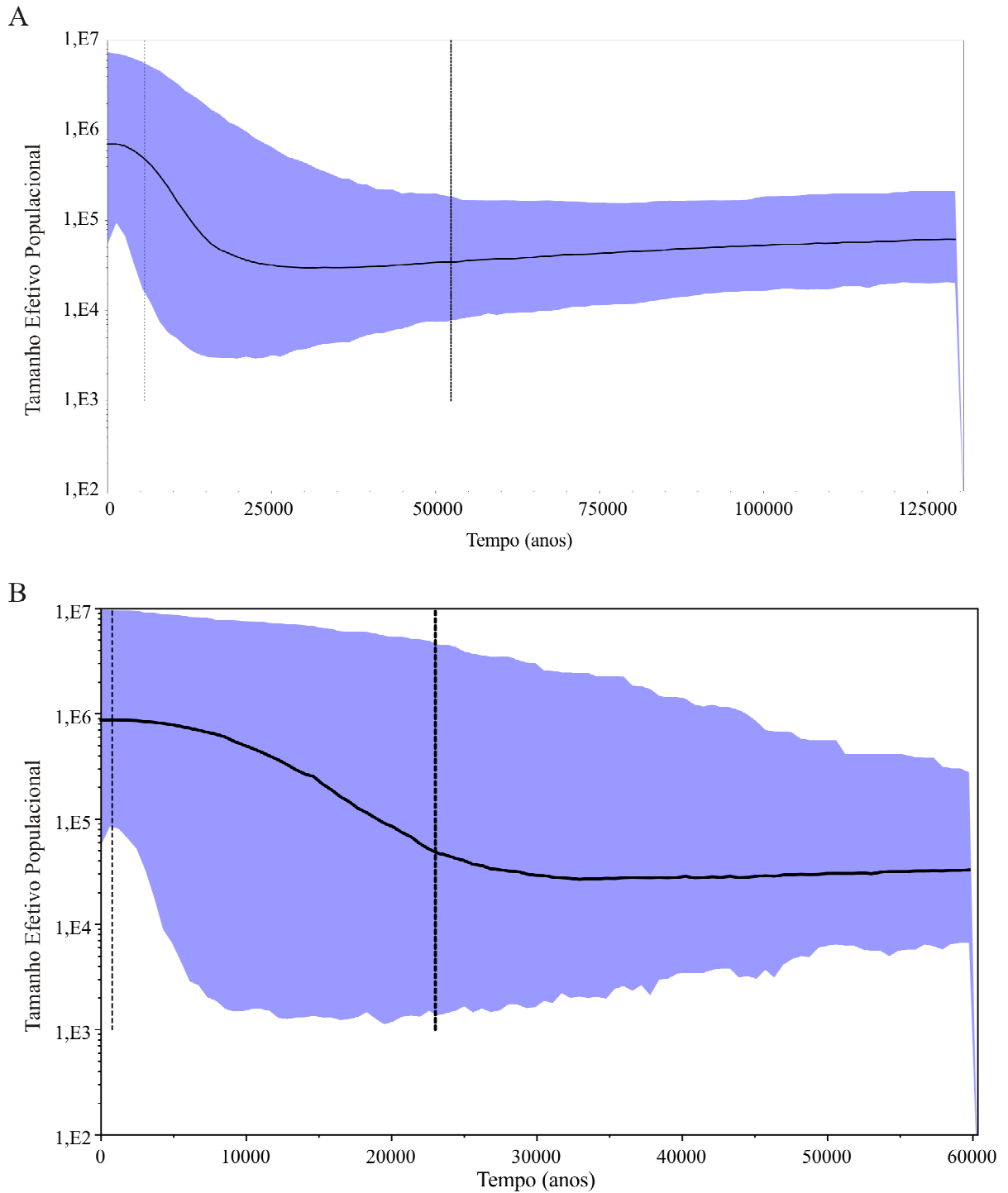


Figura 13 – Gráficos mostrando a variação no tamanho efetivo populacional inferida para *D. maculifrons* ao longo do tempo. Os gráficos foram gerados para as matrizes de COI (A) e COII (B) usando taxas de substituição estimadas individualmente para cada gene ($7,42 \times 10^{-3}$ e $1,47 \times 10^{-2}$, respectivamente) nos programas BEAST e TRACER.

Tabelas

Tabela 1 – Pontos de coleta, datas e respectivas coordenadas geográficas

	Pontos de coleta	Subpontos	Datas das coletas	Coletor	Coordenadas Sul (S)	Coordenadas Oeste (W)
RS	Bossoroca	-	Ago/2011	Jean Lucas Poppe	28°43'52.75"	54°54'39.54"
	Caibaté*	Linha Pessegueiro	-	Felipe Ten Caten	28°17'08.76"	54°38'23.90"
	Caxias do Sul*	Distrito de Galópolis	-	Marcelo Dalosto	29°09'58.22"	51°10'40.67"
	Constantina*	Chácara do Altemir	-	Darci J. De Ré, Francine C. De Ré, Marinez C. De Ré	27°43'53.80"	52°59'47.07"
	Cruz Alta	Bosque da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ)	Maior/2011	Paloma M. Rubin, Sinara S. Jardim	28°34'06.95"	53°37'20.72"
	Horizontina	-	Jun/2011	Lizandra J. Robe	27°37'48.55"	54°18'25.78"
	Ijuí*	-	Ago/2011	Marcela D.	28°23'34.59"	53°55'04.09"
	Jacutinga	Sítio do Vovô	Ago/2011	Darci J. De Ré, Francine C. De Ré	27°44'14.49"	52°30'31.85"
	Manuel Viana*	Margem do Rio Ibicuí	-	Gabriel Wallau	29°35'19.29"	55°28'49.99"
	Osório	-	-	-	29°54'05.78"	50°16'27.32"
	Pelotas	Horto Florestal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)	Ago/2010	Francine C. De Ré, Raquel Ludtke	31°46'02.05"	52°26'55.34"
	Porto Alegre	Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)	Ago/2005	-	30°04'35.56"	51°07'27.70"
	Quaraí	Estrada do Passo da Guarda	Nov/2011	Pedro M. Fonseca	30°23'06.97"	56°26'16.81"
	Rio Grande	Haras do Bolívar	Ago/2010	Francine C. De Ré, Marco S. Gottschalk Larissa P.	32°03'02.24"	52°05'37.73"
	Rosário do Sul	Margem do Rio Ibicuí	Jun/2011	Bernardo, Valéria Kaminski	30°14'36.70"	54°55'14.75"
Santa Maria	São Marcos	Jun/2010	Élgion Loreto	29°41'17"	53°48'21.73"	
Santiago*	Parque Zamperetti	-	Pedro M. Fonseca	-	-	
São Luiz Gonzaga*	-	Jul/2011	Stela Machado	28°24'26.63"	54°57'40.70"	
São Nicolau	Estância da Primeira Querência	Set/2010	Ronaldo M. Golombieski	28°10'36.78"	55°15'59.92"	
São João do Polêsine	Vale Vêneto	Jul/2010	Francine C. De Ré	29°38'59.73"	53°31'00.33"	
Uruguaiana*	-	Maior/2011	Edward Pessano	29°44'40.44"	57°04'53.68"	
SC	Chapecó*	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)	Ago/2010	Elzira Floss	27°04'27.59"	52°37'52.47"
	Concórdia	Sítio Munaretto	-	-	27°40'56.26"	48°29'33.28"
	Florianópolis	Campeche	-	-	26°18'21.44"	48°50'47.68"
	Joinville	Usina do Piraí	-	-	26°18'21.44"	48°50'47.68"
Tijucas*	BR 101 – Km 236	-	Mário J. Muller	27°14'25.71"	48°38'03.88"	
PR	Boa Ventura de São Roque*	-	-	Darci J. De Ré	24°54'36.00"	51°38'57.52"
	Cianorte	Reserva Biológica das Peróbas	Abril/2011	João P. Junges	27°14'03.29"	52°01'45.47"
	Diamante do Norte*	Estação Ecológica do Caiuá	Abril/2011	João P. Junges	22°39'39.36"	52°52'17.44"
SP	Matinhos*	-	-	Mário J. Muller Ana P. Christoff	25°49'08.08"	48°32'29.11"
	Guarujá*	-	Set/2010	Luiz Felipe V. de Oliveira	23°59'41.34"	46°15'24.30"
	Presidente	Reserva Legal em	Maior/2011	João P. Junges	21°46'56.07"	52°08'56.28"

Pontos de coleta	Subpontos	Datas das coletas	Coletor	Coordenadas Sul (S)	Coordenadas Oeste (W)	
MS	Epitácio* Teodoro Sampaio*	Assentamento Parque Estadual do Morro do Diabo	Maio/2011	João P. Junges	22°29'50.41"	52°19'54.65"
	Nova Andradina*	Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) – Cabeceira do Mimoso	Maio/2011	João P. Junges	22°14'06.32"	53°19'54.15"
	Novo Horizonte do Sul*	Reserva Legal das Fazendas Japema e Tocando em frente	Maio/2011	João P. Junges	22°36'50.58"	53°48'22.33"

Nota: “*” indica os locais onde não houveram registros de *D. maculifrons* e *D. griseolineata*.

Tabela 2 – Sequências adicionais provenientes do GenBank e seus respectivos números acesso

Espécies	Ponto de Coleta	Subponto	COI	COII
<i>D. maculifrons</i> (Duda 1927)	Jundiaí/SP	Serra do Japí	EF569998	EF570032
<i>D. griseolineata</i> (Duda 1927)	Jundiaí/SP	Serra do Japí	EF569995	EF570029

Tabela 3 – Número de indivíduos coletados e sequenciados

Locais de coleta	Número de indivíduos coletados/sequenciados para COI/sequenciados para COII	
	<i>Drosophila maculifrons</i>	<i>Drosophila griseolineata</i>
Cruz Alta/RS	4/4/4	0
Horizontalina/RS	12/9/11	0
Bossoroca/RS	9/7/9	0
Jacutinga/RS	8/7/7	0
Osório/RS	0	10/5/7
Pelotas/RS	5/4/1	2/2/1
Porto Alegre/RS	5/0/0	20/0/0
Rio Grande/RS	0	1/1/0
Rosário do Sul/RS	1/1/1	0
Santa Maria/RS	7/4/7	0
São Nicolau/RS	3/3/3	0
São João do Polêsine/RS	3/1/0	0
Concórdia/SC	1/1/1	0
Florianópolis/SC	2/2/1	7/1/0
Joinville/SC	0	10/0/0
Cianorte/PR	1/0/0	0
Total	61	53

Tabela 4 – Índices de diversidade e testes de neutralidade para *D. maculifrons*, *D. griseolineata* e para os dados concatenados

	<i>D. maculifrons</i>				<i>D. griseolineata</i>			
	COI	COII	Concat/todas*	Concat/pares**	COI	COII	Concat/todas*	Concat/pares**
N	44	46	51	36	13	5	13	5
S	2	4	0	5	14	7	14	22
h	3	5	1	6	6	4	6	4
Hd (DP)	0,090 (0,059)	0,168 (0,074)	0	0,262 (0,096)	0,718 (0,128)	0,900 (0,161)	0,718 (0,128)	0,900 (0,161)
$\pi\%$ (DP)	0,015 (0,01)	0,027 (0,012)	0	0,022(0,009)	0,745 (0,202)	0,439 (0,168)	0,745 (0,202)	0,631 (0,309)
Tajima's D	-1,47 [p > 0,10]	-1,86 [p < 0,05]	-	-2,00 [p < 0,05]	0,28 [p > 0,10]	-0,74 [p > 0,10]	0,28 [p > 0,10]	-1,09 [p > 0,10]
Fu e Li's D	-2,47 [0,10 > p > 0,05]	-3,34 [p < 0,05]	-	-3,41 [p < 0,02]	0,57 [p > 0,10]	-0,74 [p > 0,10]	0,57 [p > 0,10]	-1,09 [p > 0,10]
Fu e Li's F	-2,53 [p < 0,05]	-3,37 [p < 0,02]	-	-3,48 [p < 0,02]	0,57 [p > 0,10]	-0,77 [p > 0,10]	0,57 [p > 0,10]	-1,17 [p > 0,10]

N = número de indivíduos; S = número de sítios polimórficos; h = número de haplótipos; Hd (DP) = diversidade haplotípica (desvio padrão); $\pi\%$ (DP) = diversidade nucleotídica (desvio padrão); Nota: o sinal “*” indica que todas as sequências disponíveis de COI e COII, para cada espécie, foram incluídas na análise concatenada. O sinal “**” indica que apenas aquelas amostras que apresentavam ambos marcadores seqüenciados foram consideradas para a análise concatenada.

Tabela 5 – Valores de Fst pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para *D. maculifrons* - COI

	Horizontina	Florianópolis	Pelotas	Cruz Alta	Jacutinga	Bossoroca	Rosário	Santa Maria	São Nicolau	São João do Polêsine	Concórdia	Jundiaí
Horizontina		0,99	0,99	0,26	0,99	0,99	0,99	0,27	0,99	0,99	0,99	0,99
Florianópolis	0		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Pelotas	0	0		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Cruz Alta	0,18644	-0,26316	0		0,33	0,49	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Jacutinga	0	0	0	0,15152		0,99	0,99	0,41	0,99	0,99	0,99	0,99
Bossoroca	0	0	0	0,11111	0		0,99	0,42	0,99	0,99	0,99	0,99
Rosário	0	0	0	-1	0	0		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Santa Maria	0,18644	-0,26316	0	-0,14286	0,15152	0,11111	-1		0,99	0,99	0,99	0,99
São Nicolau	0	0	0	-0,09091	0	0	0	-0,09091		0,99	0,99	0,99
São João do Polêsine	0	0	0	-0,09091	0	0	0	-0,09091	0		0,99	0,99
Concórdia	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0		0,99
Jundiaí	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	

Tabela 6 – Valores de Fst pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para *D. maculifrons* - COII

	Florianópolis	Santa Maria	Cruz Alta	Horizontalina	Jacutinga	Bossoroca	Jundiáí	Concórdia	Pelotas	Rosário	São Nicolau
Florianópolis		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Santa Maria	0		0,99	0,56	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Cruz Alta	0	0		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Horizontalina	-0,9	-0,00205	-0,0836		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Jacutinga	-1	0	-0,09804	-0,06086		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Bossoroca	-1	-0,03067	-0,11628	-0,04465	-0,06305		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Jundiáí	0	0	0	-0,9	-1	-1		0,99	0,99	0,99	0,99
Concórdia	0	0	0	-0,9	-1	-1	0		0,99	0,99	0,99
Pelotas	0	0	0	-0,9	-1	-1	0	0		0,99	0,99
Rosário	0	0	0	-0,9	-1	-1	0	0	0		0,99
São Nicolau	0	0	0	-0,14416	-0,16667	-0,18033	0	0	0	0	

Tabela 7 – Valores de F_{st} pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para *D. griseolineata* – COI

	Osório	Pelotas	Florianópolis	Jundiaí	Rio Grande	Medellin
Osório		0,39	0,99	0,99	0,99	0,21
Pelotas	0,08046		0,99	0,99	0,99	0,1
Florianópolis	-0,33333	0		0,99	0,99	0,99
Jundiaí	-0,33333	0	0		0,99	0,99
Rio Grande	-0,33333	0	0	0		0,99
Medellin	0,11765	0,36842	0	0	0	0

Tabela 8 – Valores de F_{st} pareado (abaixo da diagonal) e seus respectivos valores de p (acima da diagonal) para *D. griseolineata* – COII

	Osório	Pelotas	Jundiaí	Medellin
Osório	0	0,99	0,99	0,99
Pelotas	-1	0	0,99	0,99
Jundiaí	0	1	0	0,99
Medellin	0	1	1	0

Tabela 9 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) para *D. griseolineata*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Variação (%)
Entre os grupos	1	45,56%
Dentro dos grupos	4	-24,68%
Dentro das populações	7	69,03%

Tabela 10 – Índices de Correlação para *D. maculifrons* e *D. griseolineata*

	COI	COII
	Índice de Correlação	Índice de correlação
<i>D. maculifrons</i>	-0,102516 ($p = 0,72$)	-0,073757 ($p = 0,64$)
<i>D. griseolineata</i>	0,869216 ($p = 0,05$)	0,662253 ($p = 0,046$)

CAPÍTULO III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Drosophila maculifrons e *D. griseolineata* apresentam diversos pontos de simpatria, embora *D. maculifrons* seja mais amplamente distribuída em território brasileiro, ocorrendo em associação aos biomas Pampa e à Mata Atlântica, enquanto *D. griseolineata* parece estar especializada ao último. As análises filogeográficas mostram que *D. maculifrons* apresenta baixos níveis de diversidade e estruturação populacional com base nos dois marcadores mitocondriais utilizados, o que pode ser explicado por um evento de expansão populacional recente entre 20 a 30 mil anos. Por outro lado, *D. griseolineata* apresenta níveis moderados de diversidade e estruturação populacional e suas populações parecem ter se mantido estáveis ao longo do tempo, apresentando um padrão de isolamento por distância.

Este trabalho foi, pois, muito estimulante, ao mostrar que duas espécies filogeneticamente próximas, que ocorrem em simpatria em diversos pontos, apresentam respostas ecológicas e evolutivas distintas. Isto está em concordância com a perspectiva apresentada por Robe *et al.*, (2010b), de que evolução de nicho é um fator preponderante durante a história evolutiva das espécies pertencentes à radiação *tripunctata*. Nesta perspectiva, e na ausência de um conservatismo de nicho, espécies próximas divergem ecologicamente em alguns de muitos fatores, o que está intimamente associado às respostas evolutivas que cada uma irá tomar ao longo do tempo. Mesmo assim, a análise das curvas de resposta destas espécies à variação nos fatores abióticos relacionados à temperatura e precipitação mostra padrões ainda essencialmente parecidos. A variação nos níveis de especialização aos biomas de Mata Atlântica e Pampa deve-se, provavelmente, a um conjunto de interações bióticas complementares aos fatores abióticos considerados, e somente um aprimoramento nos algoritmos e dados disponíveis possibilitará uma análise mais cuidadosa e completa desta questão.

Além disso, há que se considerar também a possibilidade de que parte dos contrastes encontrados sejam um artefato relacionado à insuficiência de alguns de nossos dados. As coletas realizadas neste trabalho concentraram-se em grande parte no Rio Grande do Sul. Porém, outros estados como Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul foram amostrados, conforme os resultados de distribuição de habitat adequado preditos pelas modelagens e também pela viabilidade de acesso a esses locais. Devido a sazonalidade com que as duas espécies ocorrem, aparecendo principalmente entre os meses de maio e setembro

e o curto prazo destinado ao mestrado, intensificamos as coletas nesses intervalos de tempo nos anos de 2010 e 2011. Porém, o número de indivíduos amostrados foi aquém das nossas expectativas e muitos dos pontos em que a probabilidade de ocorrência era alta não apresentaram ocorrência das espécies procuradas em nossas coletas. Neste sentido, alguns padrões populacionais, principalmente no que se refere a *D. griseolineata*, permanecem incertos, como um possível evento de expansão populacional, condizente com suas preferências ecológicas para ambientes úmidos e florestados. Quanto aos resultados relacionados à ausência de registros em pontos em que a espécie era esperada, não podemos classificá-los como falso-positivos dos modelos, já que não podemos afirmar se o método de amostragem não foi efetivo para o local ou se as espécies, de fato, não freqüentam aquele habitat. Existem, entretanto, indícios de que a primeira alternativa melhor se adéque aos resultados, já que em algumas cidades, a realização de reamostragens apresentou flutuações quanto a seus resultados de presença/ausência das espécies em questão.

Entretanto, apesar das dificuldades relatadas acima, foi possível desenvolver um trabalho muito interessante, esclarecendo em grande parte os padrões históricos/demográficos responsáveis pela atual distribuição genética dessas duas espécies em particular, pertencentes ao grupo *guaramunu* de *Drosophila*. A fim de aprimorar ainda mais este trabalho e responder algumas questões que ainda não foram completamente esclarecidas, a amostragem de cada uma das espécies será aumentada. Pretende-se, ainda, incluir marcadores nucleares nessa análise comparativa dos padrões filogeográficos de *D. maculifrons* e *D. griseolineata*, a fim de confirmar ou não a incongruência apresentada entre os resultados mitocondriais deste trabalho e as análises citogenéticas realizadas por Salzano (1955). Além disso, pretende-se investigar a presença de sequências de *Wolbachia* em *D. maculifrons* e caso essa hipótese se confirme, buscar-se-á compreender as consequências da infecção na estrutura populacional desta espécie, buscando associá-los aos resultados aqui obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ab'SABER A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas** 3:1-19, 1977.
- ALEXANDRINO J., ARNTZEN J. W., FERRAND N. Nested Clade Analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). **Heredity** 88: 66 – 74, 2002.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, MA.(447 pp.), 2000.
- BÄCHLI, G. **TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, v. 1.03, Database 2009/04. <http://taxodros.unizh.ch/>. Last accessed on 05/10/2011.
- BÄCHLI, G. **TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, v.1.03, Database 2008/01. <http://taxodros.unizh.ch>. Last accessed on 08/01/2008.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. 177:19-27, 2002.
- BEHEREGARAY, L.B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**. 17:3754-3574, 2008.
- BANDLET, H., FORSTER, P., ROHL, A. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16 1), p.37-48, 1999.
- BENNETT, K.D. **Evolution and ecology**. The pace of life. Cambridge studies in ecology. University Press, Cambridge. 241 pp. 1997.
- BOLZAN, A.R. **DNA barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica***. 2011. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- BRISSON, J.A. et al. Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*: geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. **Evolution**, v.59(5), p.1046-1059, 2005.

BRNCIC, D. J. Chromosomal variation in natural populations of *Drosophila guaramunu*. **ZIAV**, 85, 1–11, 1953.

CABANNE G et al. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**: 49: 760-773, 2008.

CARNAVAL, A. C., MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, 35, 1187-1201. 2008.

CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, 323, 785-789. 2009.

CARPENTER, G. et al. DOMAIN: a flexible modelling procedure for mapping potential distributions of plants and animals. **Biodiversity and Conservation**, 2: 667-680, 1993.

CLAPPERTON, C. M. Quaternary of the South American Highlands, Part II: Case Studies in Southeast Brazil: Campos do Jordão and Serra do Itatiaia. *In: Quaternary geology and geomorphology of South America*. Amsterdam: Elsevier, p. 243-258, 1993.

Da CUNHA, A. B., BRNCIC, D., SALZANO, F. M. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. **Heredity**, 7, 193–202. 1953.

De BRITO, R. A., MANFRIN, M. H., SENE, F. M. Nested cladistic analysis of Brazilian population of *Drosophila serido*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 22:11-143, 2002a.

De BRITO, R. A.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, v.25(2), p.161-171, 2002b.

DOBZHANSKY, T., PAVAN, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Bol Facul Fil Ciên Letr Univ S Paulo**, São Paulo, 1943.

DRUMMOND, A. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequence. **Molecular Biology and Evolution**. 22 (5):1185, 2005.

DRUMMOND, A. J., RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology** 7:214, 2007.

EXCOFFIER, L., LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under linux and windows. **Molecular Ecology Resources**, 10, 564-567. 2010.

FRANCO, F. F. et al. Intra- and interspecific divergence in the nuclear sequences of the clock gene *period*. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, p. 322-331, 2010.

FRANCO, F. F., SENE, F. M., MANFRIN, M. H. Low satellite DNA variability in natural populations of *Drosophila antonietae* involved in different evolutionary events. **Journal of Heredity** v. 101, p. 650-656, 2010.

FRANCO, F. F. et al. Intra- and interspecific divergence in the nuclear sequences of the clock gene *period* in species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 33, 225-223, 2010.

FROTA-PESSOA, O. Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). **Arq. Mus. Paranaense** 10:253-304, 1954.

FU, Y-X. Statistical tests of neutrality os mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147:915-925, 1997.

GOTTSCHALK, M. S., HOFMANN, P. R. P., VALENTE, V. L. S. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Check List**, vol. 4, p. 485–518, 2008.

GRAZZIOTIN, F.G. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology** 15: 3969-3982, 2006.

GRIMALDI, D.A. Relicts in the Drosophilidae (Diptera). In: Liebherr JK (ed) **Zoogeography of Caribbean Insects**. Comstock Publishing Association, Cornell University Press, New York, pp 183-312. 1988.

GUINDON, S., GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systems Biology**. 52, 696-704, 2003.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science** 165: 131-137, 1969.

HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, v.6 (3), p.451-476, 1997.

HATADANI, L. M. et al. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 51 (3), 595-600. 2009.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveal cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 101, 14812-14817, 2004b.

HEWITT, G. M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature** 405, 907–913, 2000.

HEWITT, G. M. Genetic consequence of climatic oscillations in the Quaternary. **The Royal Society**, 359, 183-195., 2004.

HIJMANS, R. J. et al. DIVA-GIS Version 5.2. Manual. <http://www.diva-gis.org>. 2005a.

HIJMANS, R. J. et al. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v. 25, p. 1965-1978, 2005b.

HUELSENBECK, J. P., Ronquist, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, vol. 17, p. 754-755, 2001.

HUTCHISON, D. W., TEMPLETON, A. R. Correlation between pair-wise genetic and geographic distances measure: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution** 53: 1898-1914.

KASTRITSIS, C. D. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. **Journal of Heredity** 60, 51 – 57, 1969.

KELEMEN, L., MORITZ, C. Comparative phylogeography of a sibling pair of rainforest *Drosophila* species (*Drosophila serrata* and *D. birchii*). **Evolution** 53(4): 1306—1311, 1999.

KING, J.C. Interspecific relationships within the *guarani* group of *Drosophila*. **Evolution** 1:143-153, 1947.

KOTLIK, P. B. N., EKMEKCI, F. Circum black sea phylogeography of *Barbus freschwater* fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. **Molecular Ecology** 13 (1): 87-95, 2004.

LEDRU, M. P. et al. Absence of last glacial maximum records in lowland tropical forests. **Quaternary Research** 49, 233– 237, 1998a.

LEDRU, M.P. et al. Paleoclimate changes during the last 100 ka from a record in the Brazilian atlantic rainforest region and inter hemispheric comparison. **Quaternary Research** 64, 444-450, 2005.

LEDRU, M. P., MOURGUIART, P., RICCOMINI, C. Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. 140–152, 2009.

LIBRADO, P., ROZAS J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25, 1451-1452, 2009.

MANFRIN M. H., BRITO R. O. A., SENE F. M. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae) cluster using mtDNA. **Annals of the Entomological Society of America**, 94:333-346, 2001.

MANFRIN, M. H., SENE, F. M. Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. **Genetica** 57-75, 2006.

MARKOV, T.A., O'GRADY, P.M. ***Drosophila: A guide to species identification and use***. Academic Press, London, pp. 3-64, 2006.

MORAES, E. M. & SENE, F. M. Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 45, 336–344, 2007.

MORAES, E.M. et al. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v.36, p.2136-2147, 2009.

MORITZ, C., et al. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 31:533-563, 2000.

MÜLLER, M. J. et al. *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Journal of Invertebrate Pathology** (Print), v. 109, p. 152-155, 2012.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. **Evolutionary Biology Center**, Uppsala University 2004.

PEARSON, R. G. 2007. Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. Synthesis. American Museum of Natural History. Available at: <http://ncep.amnh.org>.

PELLEGRINO K. C. M. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river system in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society** 85: 13-26.

PENNINGTON, R. T. et al. Historical climate change in speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. **Phil. Transac. R. Soc. B: Biol Sci.** 359: 515-537.

PHILLIPS, S. J., ANDERSON, R. P., SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modeling** 190:231 – 259, 2006.

PFEILER, E., et al. Genetic differentiation and demographic history in *Drosophila pachea* from the Sonoran Desert. **Hereditas** 144:63_74, 2007.

RIEGLER, M., O'NEILL, S. L. The Genus Wolbachia. The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. **Springer-Verlag**, New York, 2004.

ROBE, L. J., SILVA, L. B., LORETO E. L. S. Phylogenetic relationships among four species of the *guarani* group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) as inferred by molecular and morphological analyses. **Revista Brasileira de Entomologia.** 46:515-519, 2002.

ROBE, L.J. et al. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** 36:623-640. 2005.

ROBE, L.J., LORETO, E.L.S., VALENTE, V.L.S. Radiation of the *Drosophila* subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.** DOI 10.1007/s10709-009-9432-5, 2010a.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.S.; LORETO, E.L.S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v.138, p.725-735, 2010b.

ROE, A., SPERLING, F. A. H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome *c* oxidase I e II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol. 44, p. 325-345, 2007.

RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology** 17:2722-2729, 2008.

SALZANO, F.M. Chromosomal polymorphism in two species of the *guarani* group of *Drosophila*. **Chromosoma** 7:39-50, 1955.

SÁNCHEZ, R., et al. Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. **Nucleic Acids Research** 10.1093/nar/gkr408, 2011.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial genes sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** 87: 651–701, 1994.

SHOEMAKER, D. D. et al. Molecular evolutionary effects of *Wolbachia* infections: Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA. **Genetics** 168: 2049–2058, 2004.

SOUZA, C. R. G. et al. Quaternário do Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2005. 378p.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, vol. 5, p. 233-241, 1996.

SWOFFORD, D.L. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Version 4. **Sinauer Associates**, Massachusetts, 2003.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123: 585-595. 1989.

TAMURA, K., SUBRAMANIAN, S., KUMAR, S. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. **Molecular Biology and Evolution** 21:36–44, 2004.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TEMPLETON, A. R. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping or DNA sequencing. V. Analysis of case/control sampling designs: Alzheimer's disease and the apoprotein E locus. **Genetics**, 140, 403–409, 1995.

THROCKMORTON L.H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: **Handbook of Genetics**. King RC, ed, pp 421-469. Plenum, New York, 1997.

TODA, M.J. DrosWLD-Species: **Taxonomic Information Database for World Species of Drosophilidae**. <http://bioinfo.lowtem.hokudai.ac.jp/db/modules/stdb/>. Last accessed on 15/08/2007.

THOMÉ, M.T. et al. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forestry. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 55:1018-1031, 2010.

VILELA, C.R., BACHLI, G. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of (Drosophilidae, Diptera). **Bull. Soc. Entomol. Suisse** 63 (Suppl.), 1-332, 1990.

YOTOKO, K.S.C. et al. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 28:614-619, 2003.

WAINER, I. *et al.* Last glacial maximum in South America: proxies and model results. **Geophysical Research Letters** 32 (8), L08702. doi:10.1029/2004GL021244, 2005.

WERREN, J. H.; ZHANG, W., GUO L. R. Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. **Proceedings of the Royal Society**, vol. 261, p. 5571, 1995.

WHITWORTH, T. et al., DNA barcoding reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora*. **Proceedings of the Royal Society**, vol. 274, p. 1731-1739, 2007