



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Diretoria de Programas e Bolsas no País - DPB
Coordenação-Geral de Desenvolvimento Setorial e Institucional - CGSI
Coordenação de Programas de Apoio à Excelência - CEX
Programa de Apoio a Projetos Institucionais com a Participação de Recém-Doutores - PRODOC

UNICENTRO – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Filogeografia de duas espécies de *Drosophila* do grupo *guarani*

Coordenador: Prof Dr. Rogério Pincela Mateus

Guarapuava/2010



(i) Justificativa

Mudanças climáticas globais, tais como glaciações e períodos interglaciais com aquecimento global, possuem efeitos sobre a expansão e/ou retração dos vários domínios morfoclimáticos vegetais da América do Sul, resultando em fragmentação de habitats (Ab'Saber, 1992, 2000). Mais recentemente, o principal fator gerador de fragmentação de áreas naturais tem sido o uso da terra, o que não apenas resulta na diminuição da cobertura vegetal como também em uma assimétrica distribuição dos remanescentes, com tamanhos e formas variadas (Didham *et al.*, 1996). Geralmente, o desmatamento provoca a fragmentação de áreas contínuas, gerando o aparecimento de verdadeiras ilhas de vegetação isoladas umas das outras por áreas cobertas com pastagens ou outro tipo de cultura (Lovejoy, 1980).

A fragmentação de vegetações nativas, tanto por processos antrópicos recentes quanto por expansões e/ou retrações históricas, é um processo que gera a perda da biodiversidade, podendo levar muitas espécies à extinção. Vários são os mecanismos que levam a esse desbalanço. Os mais óbvios são aqueles relacionados ao desenho do fragmento: área, formato e isolamento. A redução da cobertura vegetal original pode provocar a eliminação de certas espécies simplesmente por não haver mais espaço suficiente para acomodar todos os indivíduos originalmente presentes (Preston, 1962). O formato do fragmento pode implicar em aumento do estresse ambiental, pela eliminação da proteção anteriormente oferecida pelas faixas marginais (Kapos, 1989; Kiviniemi, 2008). Além disso, quanto mais isolado estiver o fragmento, isto é, quanto mais distante estiver de uma área com vegetação similar, mais difícil será o intercâmbio de espécies entre os dois locais e também o fluxo gênico entre populações da mesma espécie (Brown e Kodric-Brown, 1977; Keller e Largiadèr, 2003). Isso causaria reduções no tamanho populacional podendo levar ao endocruzamento, o qual aumenta a probabilidade de extinção de populações (Frankham, 1995; O'Grady *et al.*, 2006). Reduções no tamanho populacional também levam a perda de variabilidade genética, o que pode restringir a capacidade da população de se adaptar a novas condições ambientais (Soulé, 1986; Caswell, 2001).

Alguns estudos têm inferido a possibilidade de se utilizar drosofilídeos como bioindicadores da qualidade e da diversidade do ambiente e para determinar padrões demográficos espaciais e temporais. Esses animais têm capacidade de refletir mudanças ecológicas e ambientais uma vez que espécies diferentes apresentam diferentes exigências com relação à qualidade do ambiente (Ferreira e Tidon, 2005; Mateus *et al.*, 2006), e a maioria das espécies possui limitada capacidade de dispersão (Markow e Castrezana, 2000). Mais recentemente, o gênero *Drosophila* tem sido foco em estudos de biodiversidade e filogeográficos (Torres e Madi-Ravazzi, 2006; de Toni *et al.*, 2007; Mirol *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2009). Neste sentido, esses insetos são apropriados para estudos que envolvem abordagens ecológicas, biogeográficas, filogeográficas e evolutivas.

Filogeografia é uma área de pesquisa relativamente recente que tem como objetivo analisar o arranjo espacial de linhagens genéticas, especialmente dentro e entre espécies intimamente relacionadas (Avice, 1994, 2000). A palavra filogeografia foi utilizada pela primeira vez em 1987 (Avice *et al.*, 1987). Por volta de uma década antes, cientistas haviam começado a utilizar o DNA mitocondrial (mtDNA) para tentar resolver como indivíduos da mesma espécie estão genealogicamente ligados através de um ancestral

comum (Awise *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1979). Em levantamentos genéticos de várias espécies, padrões interessantes têm sido revelados para o arranjo espacial de linhagens de mtDNA (Buhay *et al.* 2007; Mirol *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2009). Em outras palavras, a genealogia e a geografia parecem estar conectadas. Após 1987, 'filogeografia' se tornou um termo geral para se referir a estudos genealógicos (incluindo os de genes nucleares) dentro de dimensões espaciais e temporais microevolutivas.

O grupo *guarani*, originalmente estabelecido por Dobzhansky e Pavan (1943), abrange, atualmente, um total de 16 espécies (Bächli, 2010), subdivididas em dois subgrupos (King, 1947): *guaramunu* (3 espécies), constituído por *D. griseolineata*, *D. guaraja* e *D. maculifrons* (= *D. guaramunu*, segundo Vilela e Bächli, 1990); e *guarani* (5 espécies), formado por *D. guaru*, *D. ornatifrons* (= *D. guarani*, segundo Vilela e Bächli, 1990), *D. subbadia*, *D. tucumana* e *D. urubamba*. Outras oito espécies (*D. alexandrei*, *D. araucana*, *D. cuscungu*, *D. ecuatoriana*, *D. huilliche*, *D. limbinervis*, *D. pichinchana* e *D. quitensis*) não foram, até o momento, alocadas a nenhum subgrupo (Bächli, 2010).

Todas as espécies do grupo *guarani* são Neotropicais em sua distribuição, restringindo-se a áreas da América do Sul e Central. *Drosophila subbadia* parece ser a espécie do grupo com distribuição mais restrita, sendo encontrada apenas em áreas do México Central. *Drosophila ornatifrons* e *D. guaru*, por outro lado, ocorrem principalmente em áreas brasileiras, embora haja registros de *D. ornatifrons* no Uruguai, Bolívia e Colômbia (Kastritsis, 1969; Bächli, 2010). Dentro do subgrupo *guaramunu*, *D. griseolineata* e *D. maculifrons* são espécies de distribuição mais ampla, em detrimento de *D. guaraja*, raramente encontrada até mesmo em território brasileiro: *D. griseolineata* é encontrada em regiões do Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela; *D. maculifrons* apresenta registros no Brasil, Argentina, Bolívia e Peru (Salzano, 1955; Kastritsis, 1969; Bächli, 2010). Segundo Salzano (1955), na região Sul da América Latina, *D. maculifrons* é muito mais comum e amplamente distribuída que *D. griseolineata*, sendo que este autor encontrou uma correlação positiva entre amplitude de ocorrência e níveis de polimorfismo cromossômico na comparação entre estas duas espécies.

O grupo *guarani* encontra-se situado junto à radiação *immigrans-tripunctata* de Throckmorton (1975), resultado este recentemente suportado pelos achados de Remsen e O'Grady (2002), Yotoko *et al.* (2003) e DaLage *et al.* (2007). Neste último caso, em particular, o grupo *guarani* posicionou-se dentro da radiação *tripunctata* monofileticamente definida conforme Throckmorton (1975), dado que nos dois primeiros trabalhos esta havia sido apenas inclusivamente recuperada.

Kastritsis (1969), com base em comparações citogenéticas, demonstrou que espécies pertencentes aos dois subgrupos acima descritos são inteiramente diferentes em sua organização cromossômica, de modo a propor que os mesmos fossem elevados taxonomicamente à categoria de grupos. Segundo este autor, a comparação a nível cromossômico torna evidente o fato de que *D. griseolineata* e *D. guaramunu* são filogeneticamente mais próximos a membros do grupo *tripunctata*, do que aos demais membros do grupo *guarani*. Neste sentido, o próprio King (1947), bem como Throckmorton (1962), destacaram o fato de que os dois subgrupos são bastante diferentes.

Mais recentemente, Robe *et al.* (2002) atestaram, molecular e morfológicamente, a monofilia do subgrupo *guarani*, mas não conseguiram eficientemente comprová-la para o subgrupo *guaramunu*, embora seus representantes tenham apresentado altos índices de similaridade entre si. A inclusão de membros de



ambos subgrupos na análise mais inclusiva de Yotoko *et al.* (2003) suportou, entretanto, inferências quanto à sua diferenciação. Neste caso, representantes do subgrupo *guaramunu* agruparam-se com *D. calloptera* e *D. shildi* (grupo *calloptera*), de modo a compor a linhagem irmã de *D. paramediotriata* (grupo *tripunctata*); enquanto *D. ornatifrons* compôs, juntamente com *D. mediopunctata* (grupo *tripunctata*), um clado independente do anterior. Ainda existem, entretanto, controvérsias quanto à efetivação ou não desta subdivisão. Embora não haja dúvidas referentes à diferenciação entre os subgrupos, o fato de que muitas das espécies do grupo ainda não foram devidamente alocadas a nenhum subgrupo certamente dificulta o processo (Val *et al.*, 1981).

(ii) Objetivos gerais e específicos;

Assim, o presente trabalho visa entender melhor a estrutura populacional de *D. ornatifrons* e *D. maculifrons* no Brasil, correlacionando com a história evolutiva destas espécies para tentar determinar quando e como elas atingiram a atual distribuição, e se há algum padrão comum entre elas. Para tanto, serão sequenciados dois genes mitocondriais, Citocromo Oxidase I e II, de indivíduos coletados em diversas populações ao longo distribuição das duas espécies. Será realizada a análise combinada de diferentes métodos, o que nos permitirá formular hipóteses para explicar a atual distribuição destas espécies no Brasil.

(iii) Metodologia;

O teste de partição da homogeneidade, PHT (Farris *et al.*, 1995), como implementado no PAUP 4.0, será utilizado para testar incongruências entre os conjuntos de dados dos genes COI e COII. Se houver congruência entre os dois genes, então os dois fragmentos serão combinados em todas as análises posteriores.

O programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) será utilizado para calcular distâncias par-a-par entre os haplótipos, a distribuição de *mismatch* e para o teste do modelo neutro padrão para populações estáveis demograficamente (D de Tajima – Tajima, 1989; e o F de Fu – Fu e Li, 1993). O programa FLUCTUATE (Kuhner *et al.*, 1998) será usado para realizar estimativas simultâneas do θ atual e da taxa de crescimento populacional g , assumindo um modelo exponencial de crescimento e utilizando uma abordagem de máxima verossimilhança. Os parâmetros a serem utilizados para as simulações serão obtidos através do programa Modeltest 2.0 (Posada e Crandall, 1998) a fim de escolher o melhor modelo de evolução que se encaixa nos dados. Gráficos *skyline* serão construídos utilizando o programa GENIE v. 3.0 (Pybus *et al.*, 2000). As árvores iniciais serão obtidas utilizando máxima verossimilhança relógio molecular reforçado. O programa requer que a genealogia seja estimada sob o pressuposto de um relógio molecular. O programa GENIE também será utilizado para calcular qual modelo de crescimento melhor se encaixam os dados, utilizando o Critério de Informação de Akaike.

As redes de haplótipos serão construídas com base no métodos da parsimônia, utilizando o programa TCS 1.06 (Clement *et al.*, 2000).



(iv) Resultados pretendidos;

A partir das coletas das moscas, da obtenção e análise dos dados, pretende-se obter resultados que ajudem a entender melhor como a distribuição espacial atual das espécies do grupo *guarani* em questão, *D. ornatifrons* e *D. maculifrons*, foi obtida, tentando relacionar os resultados com aspectos da fragmentação de habitat e eventos ecológicos e evolutivos que podem ter gerado os padrões obtidos.

A partir destes resultados, pretende-se publicar pelo menos 2 artigos científicos em revistas de circulação internacional e com Qualis A2, pelo menos. Além disso, pretende-se que o bolsista oriente no mínimo 2 alunos de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva (PPGBioEvol) da UNICENTRO, além de ao menos 4 alunos de Iniciação Científica. Os resultados também serão apresentados em Congresso nacionais e internacionais, na forma de palestras e/ou publicação de resumos.

(v) Considerações finais;

A execução desta pesquisa será de grande importância para o crescimento do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UNICENTRO, pois existe uma carência grande de um profissional capacitado na linha de pesquisa em que este projeto se encaixa nesta instituição. Temos também uma deficiência no quadro de pessoal, onde vários concursos novos deverão ser oferecidos durante a vigência da bolsa. Portanto, existe uma real necessidade de pessoal na linha de pesquisa proposta e também uma real possibilidade de absorção do profissional a ser selecionado para fazer parte da instituição de execução do projeto e no PPGBioEvol.

(vi) Referências bibliográficas.

- Ab'Saber, A.N. Spaces occupied by the expansion of dry climates in South America during the Quaternary ice ages. *Revista do Instituto Geológico*, v.21, p.71–78, 2000.
- Ab'Saber, A.N. *A Serra do Japi, sua origem geomorfológica e a teoria dos refúgios*. In: História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil, p.12–23, L. P. C. Morellato (Ed.), UNICAMP, Campinas, Brasil. 1992.
- Avise, J.C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, London, 1994.
- Avise, J.C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 2000.
- Avise, J.C., Giblin-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J.C., Lansman, R.A. Mitochondrial DNA clones within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.76, p.6694–6698, 1979.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Jr, Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.18, p.489–522, 1987.



- Bächli, G. *TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae*, v.1.03, Database 2008/01. <http://taxodros.unizh.ch/>. Last accessed on 10/06/2010, 2008.
- Brown, J. H., Kodric-Brown, A. Turnover Rates in Insular Biogeography: Effect of Immigration on Extinction. *Ecology*, v.58, p.445-449, 1977.
- Brown, W.M., George, M., Jr, Wilson, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.76, p.1967-1971, 1979.
- Buhay, J.E., Moni, G., Mann, N., Crandall, K.A. Molecular taxonomy in the dark: Evolutionary history, phylogeography, and diversity of cave crayfish in the subgenus *Aviticambarus*, genus *Cambarus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.42, p.435-448, 2007.
- Caswell, H. *Matrix Population Models: Construction, Analysis and Interpretation*. Sinauer, Sunderland, MA, 2001.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, v.9, p.1657-1659, 2000.
- DaLage, J.L., Dergoat, G.J., Maczkowiak, F., Silvain, J.F., Cariou, M.L., Lachaise, D. A phylogeny of Drosophilidae using the Amyrel gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v.45, p.47-63, 2007.
- de Toni, D. C., Gottschalk, M. S., Cordeiro, J., Hofmann, P. P. R., Valente, V. L. S. Study of the Drosophilidae (Diptera) communities on Atlantic Forest islands of Santa Catarina State, Brazil. *Neotrop. Entomol.*, v.36, p.356-375, 2007.
- Didham, R. K., Ghazoul, J., Stork, N. E., Davis, A. J. Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends Ecol. Evol.*, v.11, p.255-260, 1996.
- Dobzhansky, T., Pavan, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bol. Facul. Fil. Ciên. Letr. USP*, São Paulo, 1943.
- Farris, J.S., Kallersjo, M., Kluge, A.G., Bult, C. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, v.10, p.315-319, 1995.
- Ferreira, L. B., Tidon, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *J. Biodiv. Conserv.*, v.14, p.1809-1821, 2005.
- Frankham, R. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conserv. Biol.*, v.9, p.792-799, 1995.
- Fu, Y.X., Li, W.H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, v.133, p.693-709, 1993.
- Kapos, V. Effects of Isolation on the Water Status of Forest Patches in the Brazilian Amazon. *J. Trop. Ecol.*, v.5, p.173-185, 1989.
- Kastritsis, C.D. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. *J. Heredity*, v.60, p.51-57, 1969.
- Keller, I., Largiadèr, C. R. Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. *Proc. Biol. Sci.*, v.270, p.417-423, 2003.
- King, J.C. Interspecific relationships within the *guarani* group of *Drosophila*. *Evolution*, v.1, p.143-153, 1947.
- Kiviniemi, K. Effects of fragment size and isolation on the occurrence of four short-lived plants in semi-natural grasslands. *Acta Oecol.*, v.33, p.56-65, 2008.



- Kuhner, M.K., Yamato, J., Felsenstein, J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on coalescent. *Genetics*, v.149, p.429-434, 1998.
- Lovejoy, T. E. A projection of species extinctions. In: Council of Environmental Quality (CEQ), The Global 2000 Report to the President, v.2, CEQ, Washington, DC, p.328-331, 1980.
- Markow, T. A., Castrezana, S. Dispersal in cactophilic *Drosophila*. *Oikos*, v.89, p.378-386, 2000.
- Mateus, R.P., Buschini, M.L.T., Sene, F.M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay river basin. *Braz. J. Biol.*, v.66, p719-729, 2006.
- Moraes, E.M., Yotoko, K.S.C., Manfrin, M.H., Solferini, V.N., Sene, F.M. 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.
- Mirol, P., Routtu, J., Hoikkala, A., Butlin, R. Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. *BMC Evolutionary Biology*, v.8, p.59-66, 2008.
- O'Grady, J. J., Brook, B. W., Reed, D. H., Ballou, J. D., Tonkyn, D. W., Frankham, R. Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biol. Conserv.*, v.133, p.42-51, 2006.
- Posada, D., Crandall, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v.14, p.817-818, 1998.
- Preston, F. W. The Canonical Distribution of Commonness and Rarity: Part I. *Ecology*, v. 43, p.185-215, 1962.
- Pybus, O.G., Rambaut, A., Harvey, P.H. An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics*, v.155, p.1429-1437, 2000.
- Remsen, J., O'Grady, P.O. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae) with comments on combined analysis and character support. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.24, p.249-264, 2002.
- 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. *Rev. Bras. Ent.*, v.46, p.515-519, 2002.
- Salzano, F.M. Chromosomal polymorphism in two species of the *guarani* group of *Drosophila*. *Chromosoma*, v.7, p.39-50, 1955.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. *Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland; 2000.
- Soulé, M.E. *Conservation Biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, MA, USA, 584p., 1986.
- Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, v.123, p.585-595, 1989.
- Torres, F. R., Madi-Ravazzi, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp. (Diptera) in two woodlands in the State of São Paulo, Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.*, v.96, p.437-444, 2006.
- Throckmorton, L.H. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. *Stud. Genet. II. Univ. Texas Publ.*, v.6205, p.207-343, 1962.



- Throckmorton, L.H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King, R.C. (ed.) Handbook of Genetics. Plenum, New York, p.421-469, 1975.
- Val, F.C., Marques, M.D., Vilela, C.R. *Drosophilidae of Neotropical Region*. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (eds.) The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, New York, p.123-167, 1981.
- Vilela, C.R., Bächli, G. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt. Schweiz. Ent. Ges.*, v.63 (suppl.), p.1-332, 1990.
- Yotoko, K.S.C., Medeiros, H.F., Solferini, V.N., Klaczko, L.B. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.28, p.614-619, 2003.

ATENÇÃO:

- **A ausência ou insuficiência de informações sobre quaisquer dos itens acima implicará a desclassificação da proposta.**
- Formatação: Tipo de fonte: Arial; Tamanho da fonte: 10; Espaço entre linhas: simples.
- Este arquivo está limitado a 5MB (cinco megabytes). O uso de figuras, gráficos, tabelas, entre outros, não deve comprometer a capacidade do arquivo em si, sob pena de a proposta não ser recebida.

IES: UNICENTRO – Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná

Programa de Pós-graduação: PPGBioEvol – Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Título do Projeto: “Filogeografia de duas espécies de *Drosophila* do grupo *guarani*”