

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Marcos Roberto Dias Batista

Estudos Citogenéticos em Dípteros:
Inversões Cromossômicas em *Drosophila mediopunctata* e
Fotomapa dos Cromossomos Politênicos de *Cochliomyia hominivorax*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marcos Roberto Dias Batista
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko.

Coorientadora: Dra. Galina Ananina.

Campinas, 2010.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B32e

Batista, Marcos Roberto Dias
Estudos citogenéticos em dípteros: inversões cromossômicas em *Drosophila mediopunctata* e fotomapa dos cromossomos politênicos de *Cochliomyia hominivorax* / Marcos Roberto Dias Batista. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Louis Bernard Klaczko.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Inseto. 2. Cromossomos - Polimorfismo. 3. Mapeamento cromossômico. 4. Geomorfologia. 5. Adaptação (Biologia).
I. Klaczko, Louis Bernard. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Título em inglês: Cytogenetics studies in Diptera: chromosomal inversions in *Drosophila mediopunctata* and photomap of the polytene chromosomes of *Cochliomyia hominivorax*.

Palavras-chave em inglês: Insects; Chromosome polymorphism; Gene mapping; Geomorphology; Adaptation (Biology).

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Louis Bernard Klaczko, Alexandre Afrânio Peixoto, Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Denise Selivon Scheepmaker, Vera Nisaka Solferini.

Data da defesa: 26/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 26 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Afrânio Peixoto


Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin


Assinatura

Profa. Dra. Denise Selivon Scheepmaker


Assinatura

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini.


Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas.


Assinatura

Prof. Dr. Andre Luiz Paranhos Perondini.


Assinatura

Prof. Dr. Angelo Pires do Prado.


Assinatura

“É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais”

Coelho Neto

Aos meus pais, Silvino e Hermínia, que me deram
educação, cultura, amor e carinho!

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço meus pais Silvino e Hermínia por toda atenção, conforto, lar, viagens, educação, cultura, amor, carinho e a agradabilíssima companhia durante todos os anos de minha vida! Além disso, agradeço-os ainda pelas carinhosas duas irmãs – Rejane e Mariane – que são ótimas companheiras de aventuras, amorosas e divertidas. Muito obrigado pela nossa família!

Agradeço carinhosamente minha irmã Rejane, que aos oito anos de idade teve uma maturidade impressionante e me salvou do “belo acidente” que tive com a porta de vidro da sacada! Se estou aqui hoje, é porque ela é demais!

Agradeço a todos avós, tios e primos por toda convivência enriquecedora e divertida. Aprendi muito com vocês! Mas, agradeço especialmente à memória de meu avô materno Claudionor Soares e minha avó paterna Maria Campos Batista - “Dona Santa” - por me ensinarem o valor da educação e trabalho; além do significado de generosidade, serenidade e de lutar por nossos sonhos!

Agradeço também à minha “nova família”, Bredão, Oso e Felipe! Muito obrigado pela pacífica convivência, pela paciência, pelos cinemas, shows e por todos os momentos agradáveis nestes anos!

Agradeço também aos amigos, André Vieira (Arroz), Bruno Udelsman (Frango), Cristiano Pompeu Camargo (Gordão), Daniel Kota, Daniel Kiatikowisk (Nebão), Danilo Sforça (Albieri), Diogo Pires (Diogão), Felipe Prado (Fipo), Gabriel Egito, Guilherme Moraes (Hernão do Vinho), Gustavo Zaparoli (Zapa), Jorge L. Neto (Jorgin do Blog), Lauro Saad, Leandro Guimarães (Lulão da Biiiio), Luís Simoneti (Xupo), Luiz Cieslak, Marco Antonio (Palocci), Pablo Fresia, Pedro Celso (Pinguim), Pedro Melnas, Rafael Talaysis (Gardão), Renato Oliveira, Renato Carvalho, Ricardo Andrade (Popin), Ricardo Shiniti (Shin), Sérgio Jábali, Vinícius Camargo (Bitão) e Vinícius Portilho (Barrão) pelas viagens, aventuras, “discussões cabeça” e principalmente pelo gostoso convívio que tivemos nesses anos.

Agradeço também às amigas: Aline Crucello (Xee!), Camila Mantelo, Clara Piccinini, Isabel Martin, Júlia Badur, Maria Amália (Dee!), Mariana Lyra e Natália Rahal pelas carinhosas palavras de otimismo e incentivo! Vocês são especiais!

Não poderia esquecer-me de agradecer aos times de futsal e handebol (Vamos, Escócia!) que pude jogar e acima de tudo fazer grandes amizades como: Alessandro, Bereba, Santoro, Pará, Java, Lemão, Fabi, Jeffin, Jé, Vareta, Diler, Brunin, Marcos Túlio, Fábio, Banana, Tiba, Pezão, Renan, Carla, Tuca...

Agradeço em especial aos amigos Alessandro Farias e Horácio Montenegro não só pela amizade grandiosa, mas principalmente por serem pessoas que definitivamente mudaram o rumo da minha história. Foram vocês que me avisaram da oportunidade de estagiar com o Prof. Louis e sempre me apoiaram nesta caminhada! Muito obrigado!

E no laboratório do Prof. Louis pude conhecer muita gente legal, generosa e por isso agradeço a harmoniosa e enriquecedora convivência aos colegas: Ayana, Cacá, Diogo, Felipe, Gália, Hermes, Horácio, Iuri, Laura, Lu Hatadani, Lu Araripe, Mit, Renato e Roberto.

Agradeço todo o apoio dos técnicos: Wilma, Dna. Cida, Dna. Glória, Priscila, Salete, Claudete, Seu Laércio e Klélia.

Ainda, agradeço a Salete pelo capricho em cuidar do meio de cultura do laboratório e da criação das bicheiras. E, acima de tudo pela amizade especial e sincera!

Agradeço a: Ayana, Diogo, Felipe, Gália, Gustavo, Hermes, Iuri, Prof. Louis, Lu Hatadani, Mari Lyra, Mit, Pablo Frésia, Prianda, Renato Carvalho pelas coletas e amostras de *Drosophila* e *Cochliomyia hominivorax*.

Agradeço em especial a Ayana Martins pela revisão do inglês de minha tese.

Agradeço à: Oscar Tanner Filho e Maria Aparecida P. Borba, CEA Santo Antonio (Capivari, SP); Patricia Lia and Cynira Any J. S. Gabriel – Fundação José Pedro de Oliveira – Reserva Mata Santa Genebra (Campinas, SP); Wilson Barbosa – Diretor do CEC, Fazenda Santa Elisa – IAC (Campinas, SP); Carmen Elias, Diretora do Parque Ecológico Ms. Emílio J. Salim (Campinas, SP); Angela Podolsky, Condomínio Colinas do Atibaia (Campinas, SP); Léo Nascimento, Coordenador de Pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ) pelas autorizações concedidas para a realização do trabalho de campo.

Agradeço ainda aos Professores André V. Lucci Freitas e Fernando R. Martins pelas explicações esclarecedoras sobre a biogeografia das áreas estudadas nesta tese.

Agradeço ao Prof. Áureo T. Yamada pela autorização para o uso do fotomicroscópio.

Agradeço à Profa. Ana Maria L. de Azeredo-Espin que na colaboração de sucesso entre os dois laboratórios pude iniciar meus estudos com citogenética!

Agradeço especialmente à Dra. Galina Ananina, minha coorientadora, por me mostrar a beleza de se trabalhar com citogenética, por me ensinar a ser rigoroso sem perder o capricho e carinho pelo seu trabalho, além das valiosas lições! Muito obrigado!

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Louis Bernard Klaczko pela amizade, respeito, profissionalismo e sinceridade com que sempre me tratou desde meu início no laboratório há dez anos. Muito obrigado pelos divertidos almoços e conversas sobre política, trabalho, vida e principalmente evolução!

Agradeço às seguintes agências financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e International Atomic Energy Agency (IAEA).

“... E não há melhor resposta que o espetáculo da vida...”

João Cabral de Melo Neto

Índice

Agradecimentos	v
Índice	viii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
Introdução	1
1. Mapas de Cromossomos Politênicos	1
2. Inversões Cromossômicas	2
3. <i>Drosophila mediopunctata</i>	3
3.1. O Polimorfismo de Inversões Cromossômica de <i>Drosophila mediopunctata</i>	5
4. Geomorfologia da Região de Campinas	7
4.1 Fragmentação Florestal na Região de Campinas	9
5. Aquecimento Global	10
5.1 Aquecimento Global e o Polimorfismo de Inversões de <i>Drosophila</i>	11
6. <i>Cochliomyia hominivorax</i>	12
Objetivos	15
Capítulo 1 – Análise Temporal das Frequências de Inversões Cromossômicas da População de <i>Drosophila mediopunctata</i> do Parque Nacional do Itatiaia, RJ	16
Abstract	18
Introduction	19
Material and Methods	20
1. <i>Drosophila mediopunctata</i> Samples	20
2. Cytological Preparations	20
3. Climatic Variation and Geographic Data	20
4. Statistical Analysis	21
Results	21
1. Temporal Variation of the Climatic Variables	21
2. Temporal Variation of the Inversions Frequencies	21
3. Clines and correlations	22
Discussion	22
Acknowledgments	24
References	24

Capítulo 2 - Diferenciação Geográfica de Inversões Cromossômicas.	33
Abstract	35
Introduction	36
1. Forest Fragmentation	36
2. Chromosomal Inversions	37
Material and Methods	39
1. <i>Drosophila mediopunctata</i> Samples	39
2. Cytological Preparations	40
3. Climatic Variation and Geographic Data	40
4. Statistical Analysis	40
Results	41
1. Inversions frequencies and clustering analyses	41
2. Clines and correlations	42
Discussion	42
1. Inversions Frequencies and Clustering Analysis	42
2. Longitudinal Cline	43
Acknowledgments	45
References	46
 Capítulo 3 - Fotomapa dos Cromossomos politênicos de <i>Cochliomyia hominivorax</i>	 59
Abstract	60
Introduction	60
Material and Methods	61
Results	61
Chromosome descriptions	61
Discussion	64
Acknowledgements	64
References	64
 Conclusão Geral	 66
Bibliografia Geral	68

Lista de Figuras

Capítulo 1

Fig. 1	Long-term variation of the temperature at <i>Parque Nacional do Itatiaia, RJ</i> .	28
Fig. 2	Temporal variation of annual precipitation at <i>Parque Nacional do Itatiaia, RJ</i> .	28
Fig. 3	Current and the previous average frequencies of <i>D. mediopunctata</i> chromosome II	29
Fig. 4	Comparison between the current and the previous average frequencies of <i>D. mediopunctata</i> second chromosome collected in the winter and in the summer.	30
Fig. 5	Comparison between the distinct seasons of the <i>D. mediopunctata</i> second chromosome average frequencies collected in 1986-1988 and 2007-2009.	31
Fig. 6	Comparison of the current and previous inversion frequency seasonality.	32
Fig. 7	Distribution of the <i>DA</i> , <i>DI</i> , <i>DS</i> and <i>DP</i> along the altitudinal gradient.	32

Capítulo 2

Fig 1	Map of the studied region and the distribution of the inversion frequencies of each collected site.	57
Fig. 2	Dendrogram of the Clustering Analysis using Ward's algorithm.	58

Capítulo 3

Fig.1	Photomap of chromosome 2L.	61
Fig.2	Photomap of chromosome 2R	61
Fig.3	Photomap of chromosome 3L.	62
Fig.4	Photomap of chromosome 3R.	62
Fig.5	Photomap of chromosome 4L.	63
Fig.6.	Photomap of chromosome 4R.	63
Fig.7	Photomap of chromosome 5L.	63
Fig.8	Photomap of chromosome 5R.	63
Fig.9	Photomap of chromosome 6L.	63
Fig.10	Photomap of chromosome 6R.	64

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Table 1	Second chromosome inversion frequencies of <i>D. mediopunctata</i> from different collections and altitude sites, at <i>Parque Nacional do Itatiaia, RJ</i> .	27
Table 2	Pearson's correlation (r) between the second chromosome inversion frequencies of <i>D. mediopunctata</i> and climatic variables	27

Capítulo 2

Table 1	Geographic and Climatic variables from the collected sites.	51
Table 2	Inversion Frequency Distribution.	52
Table 3	Nei's Genetic Distances Matrix.	53
Table 4	Hierarchical F_{ST} .	54
Table 5	Pearson's Correlation (r) between inversion frequencies (after angular transformation) and latitude, longitude, altitude, average annual temperature, precipitation, aridity index.	55

Resumo

Nesta tese, estudamos uma questão básica e uma aplicada: os determinantes da variação geográfica e temporal do polimorfismo de inversões do segundo cromossomo em populações naturais de *Drosophila mediopunctata*; ainda, adaptamos a técnica para análise de politênicos de *Drosophila* para estudos em *Cochliomyia hominivorax* e assim elaboramos um mapa dos cromossomos politênicos desta praga da pecuária.

Duas décadas depois de estudos anteriores, realizamos cinco novas coletas no Itatiaia e observamos inesperadas mudanças nas frequências dos arranjos mais comuns e em sua variação microgeográfica em relação àquelas antes descritas. No segundo cromossomo, o arranjo *DA* continua sendo o mais frequente, porém não detectamos mais uma correlação significativa com a altitude. Para os arranjos *DS* e *DP*, além de não haver mais correlações significativas com a altitude, suas frequências se mostram ainda mais baixas, principalmente no inverno. Entretanto, o ciclo sazonal observado para estas inversões se mantém. O arranjo *DI* aumentou sua frequência significativamente e agora mostra uma correlação positiva e significativa com a altitude. Estes resultados sugerem que, depois de duas décadas, houve mudanças ambientais incluindo alterações climáticas e provavelmente fatores bióticos que devem ter afetado a arquitetura genética das populações.

Observamos uma diferenciação entre o padrão das frequências de inversões do cromossomo II de populações vizinhas de *D. mediopunctata*. As matas estudadas estão situadas em duas diferentes unidades geomorfológicas, que apresentam diferenças marcantes em relação ao solo, relevo, paisagem, vegetação e fauna. Nossos resultados sugerem que a diferenciação geográfica observada nas frequências de inversões pode ser resultado de uma adaptação local às diferenças florísticas e climáticas. Entretanto, outros marcadores genéticos devem ser pesquisados para analisar os efeitos da fragmentação florestal sobre as populações.

Cochliomyia hominivorax, conhecida no Brasil como a mosca-da-bicheira, é considerada uma das principais moscas causadoras de miíases primária na região Neotropical. Apesar de um fotomapa preliminar de seus cromossomos politênicos ter sido publicado anteriormente, com resultados encorajadores, não havia um mapa dos cromossomos politênicos com boa resolução para a espécie. Desta forma, elaboramos um novo fotomapa dos cinco autossomos com uma resolução total de 1450 bandas.

Abstract

In this thesis, we studied a basic and an applied issue: the determinants of geographical and temporal variation of the second chromosome inversion polymorphism in natural populations of *Drosophila mediopunctata*; and, adapting the squashing technique used for *Drosophila* to *Cochliomyia hominivorax*, we made a map of the polytene autosomes of this livestock pest.

Two decades after previous studies, we carried out five collections in Itatiaia, RJ. We observed unexpected changes in the frequencies of the most common inversions of the second chromosome. The *DA* gene arrangement is still the most common, but we no longer detect a significant correlation between its frequency and altitude. Furthermore, the frequencies of *DS* and *DP* inversions became even lower, especially in winter; and didn't show a significant correlation with altitude. However, the previously observed seasonal cycle for these inversions is still present. *DI* frequency increased significantly, and it is now significantly positively correlated with altitude. These results suggest that, after two decades, there were modifications in the climate, but other variables – such as biotic factors – have also probably changed and may be correlated with the changes in the genetic architecture of the Itatiaia population.

Furthermore, we report a differentiation between frequencies of inversions of the second chromosome in neighboring populations of *D. mediopunctata*. The forests studied are located over two geomorphologic units that have marked differences regarding landscape, topography, soil, vegetation, and fauna. Our results suggest that the observed geographical variation in the inversion frequencies may be a result of local adaptation to climate and floral and faunal changes. However, further analysis with other genetic markers must be performed to assess the possible effects of forest fragmentation on different populations.

Cochliomyia hominivorax, the New World screwworm fly is one of the main flies causing primary myiasis in the Neotropical region. Although a preliminary photomap of the polytene chromosomes of *C. hominivorax* was previously published, a good resolution map of the polytene chromosomes was not available for this species. Here, we present a new photomap of the five autosomes of this species with a total resolution of 1450 bands.

I. Introdução

I.1. Mapa de Cromossomos Politênicos

Um mapa citogenético é uma ferramenta fundamental para a análise e manipulação genética de qualquer espécie. Em Diptera, pela presença de cromossomos politênicos, a elaboração de um mapa de alta resolução é especialmente favorável, já que centenas de bandas podem ser identificadas num único cromossomo. Seu uso para a construção de mapas citogenéticos começou com Painter (1933) que desenvolveu a técnica de esmagamento dos cromossomos para *Drosophila melanogaster*. No entanto, foi o trabalho de Bridges (1935) que estabeleceu o padrão para os mapas de cromossomos politênicos. Ele dividiu os cinco braços principais da espécie em 102 divisões e com grande precisão distinguiu 2650 bandas em sucessivas revisões (*e.g.*, Bridges, 1942; Zhimulev, 1996).

Desde então, este tipo de trabalho foi aplicado a um grande número de Diptera de várias famílias, a partir de várias espécies de *Drosophila*, alcançando também pestes agrícolas e vetores de doenças (Foster *et al.*, 1980; Agoze *et al.*, 1992; Bedo *et al.*, 1994; Puchalla, 1994; Zhao *et al.*, 1998; Hunter, 2002; Ananina *et al.*, 2002; Cecilia *et al.*, 2009; Bernhardt *et al.*, 2009). Para uma história dos mapas de cromossomos politênicos em *Drosophila*, bem como uma série de outros detalhes, veja: Sorza (1988); Spironello & Hunter (2005); Ananina *et al.* (2007). Um exemplo notável fora do gênero *Drosophila* é o trabalho sobre várias espécies de Anophelinae (para revisão veja Severson *et al.*, 2001). E, talvez os casos mais interessantes sejam o complexo *gambiae* de *Anopheles* com suas sete espécies crípticas (Coluzzi *et al.*, 2002), cujas relações filogenéticas foram inferidas pela análise dos cromossomos politênicos; bem como, o das espécies do gênero *Chironomus* (Gunderina *et al.*, 2005).

Os mapas de cromossomos politênicos representam o que há de melhor em termos de mapa citogenético. Eles permitem uma integração entre mapas físicos e genéticos e, ainda, são úteis na medida em que é possível identificar rearranjos cromossômicos com precisão. Desta forma, pode-se fazer inferências filogenéticas, detectar a ação da seleção natural e, em muitas circunstâncias, caracterizar e identificar diferentes espécies (Sperlich & Pfriem, 1986; Anderson *et al.*, 1991; Krimbas & Powell, 1992). Além disto, eles podem ser utilizados para hibridização *in situ* usando a técnica “*fluorescent in situ hybridization*” (FISH), que é importante para localizar

genes nucleares em seus locais respectivos nos cromossomos. Da mesma forma, podem servir como ferramenta na clonagem de genes alvo de interesse (Saunders *et al.*, 1989; Aggarwal *et al.*, 2009; Andreyenkova *et al.*, 2009; Schemerhorn *et al.*, 2009).

I.2. Inversões Cromossômicas

Em eucariotos, rearranjos cromossômicos como inversões, deleções e translocações são bem comuns e ocorrem em diferentes organismos como fungos, plantas e humanos (Coghlan *et al.*, 2005). Tradicionalmente, acredita-se que as inversões cromossômicas são geradas por duas quebras independentes e simultâneas e sua posterior ligação ao cromossomo (Krimbas & Powell, 1992). Em Dípteros, o estudo de inversões se torna um sistema altamente favorável pela presença dos cromossomos politênicos, que em heterozigose apresentam alças facilmente reconhecíveis (Krimbas & Powell, 1992).

Uma das propriedades das inversões é que, em heterozigose, elas são capazes de suprimir o *crossing-over* (Stutervant 1917, 1926, 1931). Dobzhansky (1947) postulou que as inversões que transportariam e manteriam esses complexos gênicos ligados coadaptados seriam favorecidas pela seleção natural e impediriam que conjuntos de genes coadaptados entre si fossem desfeitos pela recombinação (Dobzhansky, 1970). Portanto, o polimorfismo de inversões se tornou um ótimo marcador para estudos genéticos, populacionais e evolutivos como especiação, filogenias, clines e caracterização da seleção natural e de outras forças evolutivas (Sperlich & Pfriem, 1986; Anderson *et al.*, 1991; Krimbas & Powell, 1992; Rieseberg, 2001; Hey, 2003; Navarro & Barton, 2003; Hoffmann *et al.*, 2004; Schimidt *et al.*, 2005; Kirkpatrick & Barton, 2006; Rasic *et al.*, 2007; Hoffmann & Rieseberg, 2008; McAllister *et al.*, 2008; Schaeffer, 2008; Presgraves *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009; Fragata *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2010). Em especial, destaca-se sua importância como um potencial bioindicador para se detectar respostas genéticas às mudanças ambientais (Hoffmann & Danborn, 2007; Hoffmann & Willi, 2008; Balanyà *et al.*, 2009)

Desde o trabalho de Wright & Dobzhansky (1946), vários estudos reiteradamente mostraram que as inversões estão frequentemente sob seleção. No entanto, as múltiplas formas pela quais os polimorfismos de inversões cromossômicas são mantidos continuam sendo uma importante questão a ser investigada.

I.3. *Drosophila mediopunctata*

Drosophila mediopunctata Dobzhansky & Pavan 1943 pertence ao grupo *tripunctata*, do subgênero *Drosophila*. O grupo *tripunctata* é o maior entre os grupos de espécies de *Drosophila* de florestas neotropicais com 79 espécies (Bächli, 2009). *D. mediopunctata* tem ampla distribuição geográfica, tendo sido encontrada em matas de várias localidades do Brasil, da América do Sul e Central, até El Salvador (Val *et al.*, 1981). Durante o inverno, principalmente na região sul do Brasil, ela chega a ser a mais comum entre as *Drosophila* coletadas (Saavedra *et al.*, 1995); no entanto ela é rara ou ausente nas caatingas e cerrados (Tidon-Sklorz & Sene, 1995; Tidon, 2006; Hatadani *et al.*, 2009).

Esta espécie apresenta características marcantes em relação a outras espécies do gênero. Primeiramente, apresenta um ciclo de vida longo – de aproximadamente 28 dias em baixas temperaturas – enquanto outros modelos, como *Drosophila melanogaster*, *D. willistoni*, *D. pseudoobscura* – que pertencem ao subgênero *Sophophora* – apresentam ciclo de vida curto. Ela é uma espécie exclusiva de floresta tropical, ainda que esteja melhor adaptada a temperaturas mais frias. Por fim, apresenta um tempo longo de maturidade sexual; e uma fecundidade relativamente baixa. Estas características a candidatam a ser um bom modelo biológico, justamente por contrastar com a biologia dos outros modelos e, portanto, ter o potencial de revelar peculiaridades e fenômenos que os outros modelos não mostram (Klaczko, 2006).

Drosophila mediopunctata, como muitas espécies pertencentes ao grupo *tripunctata*, apresenta uma ornamentação na região abdominal sob a forma de três pintas na porção média dos últimos tergitos (Frota-Pessoa, 1954). Verificou-se que este caráter apresenta uma variação genética e alta plasticidade fenotípica em resposta à temperatura de desenvolvimento, associada ao polimorfismo do segundo cromossomo (Hatadani *et al.*, 2004). Rocha *et al.* (2009) caracterizaram a norma de reação deste caráter em função da temperatura para alguns genótipos e verificaram que na maioria dos casos estudados ela podia ser descrita por uma função não-linear cuja curvatura estava correlacionada ao valor médio do caráter.

Bitner-Mathé & Klaczko (1998) descreveram a variação e estimaram a herdabilidade “natural” do número de ramos das aristas na população do Parque Nacional do Itatiaia, RJ. Eles mostraram que fêmeas do campo apresentavam um número de ramos de arista significativamente menor que o de suas filhas criadas em condições padronizadas no laboratório; e que o caráter não

apresentava nenhuma variação altitudinal, nem entre as diferentes coletas realizadas no Parque Nacional do Itatiaia, RJ entre setembro de 1986 e novembro de 1988. Analisando os machos coletados, que tiveram seu cariótipo para as inversões do cromossomo II determinado, esses autores não detectaram nenhuma diferença significativa entre os vários cariótipos para o número de ramos da arista.

Entretanto, para a mesma população, Bitner-Mathé *et al.* (1995) mostraram que, para o tamanho da asa, há uma interação entre o cariótipo dos animais e a data de coleta, evidenciando uma interação genótipo ambiente; enquanto que, para a forma da asa, há claras diferenças entre cariótipos, mas não há interação com a data de coleta. Já, Bitner-Mathé & Klaczko (1999a) descreveram um cline altitudinal tanto para o tamanho quanto para a forma ao analisar as filhas de moscas coletadas em diferentes altitudes, porém nas moscas do campo esse cline não era significativo.

Hatadani & Klaczko (2008) mostraram, em condições controladas no laboratório, que o tamanho e a forma da asa sofrem influência do cariótipo do cromossomo II, do sexo e da temperatura. Encontraram, ainda, evidências sugestivas da interação entre o cariótipo e a temperatura sobre a forma da asa, sugerindo a existência da interação genótipo-ambiente sobre este caráter, e que esta interação pode estar correlacionada com diferenças sazonais. Dessa forma, pode ser que o conteúdo genético das inversões esteja acumulando diferentes alelos adaptados a diferentes temperaturas.

Por fim, um novo método para a análise morfométrica da asa foi proposto usando como modelo a figura geométrica da elipse (Klaczko & Bitner-Mathé, 1990; Bitner-Mathé & Klaczko 1999b), com resultados consistentes com os observados usando outras metodologias mais complexas de análise morfométrica.

A variação morfológica do edeago da espécie também foi estudada por Andrade *et al.* (2005) que testaram a influência da temperatura sobre este órgão. Eles mostraram que esta variável ambiental afeta o tamanho e forma do órgão fazendo com que as moscas criadas em temperaturas mais baixas tenham edeagos maiores. Andrade *et al.* (2009) caracterizaram a variabilidade natural para o tamanho e a forma do edeago, sua correlação com o tamanho e a forma da asa e, também, demonstraram que o tamanho do edeago sofre influência do cariótipo do segundo cromossomo.

Carvalho *et al.* (1989) descreveram o fenômeno *sex-ratio* (proles afetadas com grande excesso de fêmeas) em *D. mediopunctata*, demonstrando que ele está associado ao polimorfismo do cromossomo X, em especial, associado ao haplótipo *In(X)21*. Machos X:21/Y têm proles *sex-ratio* enquanto machos X:St/Y têm proles normais. O estudo das causas genéticas da variação da expressão de *sex-ratio*, revelou a existência de genes supressores localizados em cada um dos autossomos principais (Carvalho & Klaczko, 1993). Como também, foi identificado um complexo sistema de supressão ligado aos cromossomos X e Y (Carvalho & Klaczko, 1994; Carvalho *et al.*, 1997).

Por fim, aproveitando-se da complexa determinação genética deste fenômeno, Carvalho *et al.* (1998) fizeram uma demonstração do princípio de Fisher no laboratório.

Entre outros marcadores genéticos desenvolvidos para esta espécie, destacam-se as mutações de efeito visível e microssatélites. Diversas linhagens de mutantes recessivos e dominantes com fenótipos semelhantes aos dos genes *Antennapedia* e *Delta* em *D. melanogaster* foram obtidos por raios X e tiveram sua localização cromossômica determinada (Marques *et al.*, 1991; Anannina, 2003). Tais linhagens são estoques fundamentais para diversas análises genéticas. Além disso, 134 *loci* de microssatélite foram desenvolvidos para *D. mediopunctata* com uma alta taxa de amplificação em outras 30 espécies do gênero (Laborda *et al.*, 2009a, b). O uso de microssatélites abre uma série de possibilidades de estudos com objetivos de estudar estruturas de populações, ou identificar genes associados a características quantitativas.

I.3.1. O polimorfismo de inversões em *Drosophila mediopunctata*

Drosophila mediopunctata apresenta cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de pontuais, que não se politeniza (Katristsis, 1966). Ananina *et al.* (2002) publicaram o mapa dos cromossomos politênicos com uma resolução de 2111 bandas e marcações dos pontos de quebra das inversões que ocorrem naturalmente nessa espécie. Os cromossomos polimórficos são: o cromossomo X, com quatro arranjos; o cromossomo IV, com dois arranjos; e o cromossomo II, o mais polimórfico nesta espécie, que apresenta oito inversões na região distal (*DA*, *DI*, *DV*, *DP*, *DS* *etc.*) e nove na região proximal (*PA0*, *PB0*, *PC0* *etc.*), 17 no total (Peixoto & Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2002).

Em princípio, é possível a ocorrência de 72 possíveis combinações – haplótipos – entre inversões das regiões distal e proximal, já que não há sobreposição entre essas duas regiões do segundo cromossomo (Ananina *et al.*, 2002; Klaczko, 2006). No entanto, há um forte desequilíbrio de ligação entre as inversões nas duas regiões. Peixoto & Klaczko (1991) mostraram que em uma amostra de 2130 cromossomos, apenas 31 dos 72 possíveis haplótipos foram encontrados com valores altos do índice de Desequilíbrio de Ligação Normalizado (D' ; Lewontin, 1964; 1988). Entre os 1086 cromossomos com a inversão *DA* na região distal, 1015 (94%) estavam associados à inversão proximal *PA0* formando o haplótipo *DA-PA0*; com um coeficiente de desequilíbrio de ligação normalizado $D' = 0,976$. Da mesma forma, 91% dos 473 cromossomos *DI* estavam associados a *PB0* formando o haplótipo *DI-PB0* ($D' = 0,857$); 96% dos 284 *DS* associados a *PC0* (*DS-PC0*) ($D' = 0,948$), e 98% dos 156 *DP* a *PC0* (*DP-PC0*) ($D' = 0,974$). Estes quatro haplótipos representaram 87,2% dos haplótipos observados na população do Itatiaia (Peixoto & Klaczko, 1991). As frequências destes quatro arranjos distais somam em torno de 90% nas populações do Sudeste do Brasil. Se acrescentamos a inversão *DV*, elas representam cerca de 95% das inversões distais observadas em todas as populações estudadas até agora.

Dessa forma, levando em conta o desequilíbrio de ligação e as frequências dos haplótipos, podemos restringir as análises das populações do Sudeste brasileiro desta espécie apenas aos quatro arranjos mais frequentes da região distal do cromossomo II. E, mesmo com essa simplificação, teremos capturado a maior parte da informação relevante.

Ananina *et al.* (2004) analisaram o polimorfismo de inversões da população do Parque Nacional do Itatiaia, RJ; eles mostraram que três dos arranjos mais comuns (*DA*, *DP* e *DS*) apresentam variação sazonal ao longo do ano. A frequência de *DA* aumenta nos meses mais frios, enquanto que as frequências de *DP* e *DS* apresentam o padrão oposto. Consistentemente, foi verificada ainda a correlação das frequências destes arranjos com a altitude. O arranjo *DA* apresentou alta correlação positiva com a altitude e negativa com a temperatura média do mês de coleta; enquanto que *DP* e *DS* apresentaram correlação negativa com a altitude, e positiva com a temperatura. Já, *DI* não apresentou correlação nem com a altitude nem com a temperatura. Esses dados levados em conjunto sugerem fortemente que as frequências das inversões reflitam a adaptação da população, na qual *DA* estaria adaptada ao frio e *DS+DP* adaptadas ao calor. Essa correlação poderia explicar tanto a variação sazonal quanto o cline altitudinal.

Entretanto, quando se fez uma análise macrogeográfica comparando-se coletas de diferentes latitudes observou-se que amostras da cidade de Porto Alegre, RS apresentavam frequência de *DA* baixa e de *DS* e *DP* alta. Justamente, o oposto do esperado pelo padrão altitudinal que seria uma frequência mais elevada da inversão *DA* correlacionada ao frio (Ananina *et al.*, 2004).

Ainda no nível macrogeográfico, outro resultado surpreendente foi a alta diferenciação entre as frequências de inversões cromossômicas das populações da Mata Santa Genebra, SP e da Serra do Japi, SP, que distam aproximadamente 40 km. Em contraste, a Serra do Japi apresentou frequências semelhantes às da população do Itatiaia que está a aproximadamente 270 km (Ananina *et al.*, 2004). Isso levou esses autores, à época, a duas conjecturas: ou a diferenciação é fruto da deriva genética, pois a Mata Santa Genebra é um remanescente florestal isolado; ou a diferenciação representa uma adaptação às diferenças florísticas e climáticas locais.

I.4. Geomorfologia da região de Campinas.

A Geomorfologia é a parte da Geografia Física que estuda a origem e as classificações das diferentes formas do relevo e da paisagem (Araújo, 2005). O relevo brasileiro tem formação antiga e resulta principalmente da ação das forças internas da Terra e da sucessão de ciclos climáticos. A alternância de climas quentes e úmidos com áridos ou semi-áridos favoreceu o processo de erosão e a conformação da paisagem atual (Cassetti, 1991).

Diversos autores realizaram várias classificações baseadas em diferentes critérios, que refletem a orientação metodológica utilizada e, por vezes, o estágio de conhecimento à época de sua elaboração. Talvez, o marco pioneiro neste campo seja a publicação de Ab'Saber (1958) que propôs uma classificação considerando não só a altitude, como também os processos orogênicos formadores da paisagem. Numa abordagem distinta, Azevedo (1968) considerando principalmente a altitude, classificou e identificou oito unidades de relevo no Brasil. Posteriormente, Ross & Moroz (1997) baseando-se nos resultados do projeto Radambrasil – um levantamento realizado entre 1970 e 1985 que fotografou o solo brasileiro com um equipamento especial de radar instalado num avião – retomaram e aprofundaram a classificação de Ab'Saber (1958) e propuseram uma nova classificação com 28 unidades de relevo, divididas em planaltos,

planícies e depressões. Finalmente, baseando-se neste trabalho, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística publicou o mapa de Compartimento de Relevo (IBGE, 2000).

Neste mapa, o estado de São Paulo apresenta divisões morfoestruturais; dentre as quais podemos destacar: a) a província do Planalto Atlântico; b) a Depressão Periférica da bacia do Paraná.

O Planalto Atlântico caracteriza-se por uma topografia mais acidentada, com formas de relevo mais altas – cujas altitudes oscilam entre 900 m e 1000 m – que, historicamente, ofereceram maior dificuldade à erosão. Os planaltos podem ser encontrados em qualquer tipo de estrutura geológica como os dobramentos modernos, os maciços antigos (escudos cristalinos) e bacias sedimentares. Nesta última, os planaltos se caracterizam pela formação de escarpas (terreno muito íngreme, que lembra um degrau) em áreas de fronteira com as depressões. Nos planaltos que correspondem aos cinturões orogênicos – dobramentos modernos – predominam morros e montanhas, canais e vales profundos, que dificultam naturalmente a expansão urbana e o desenvolvimento de práticas agrícolas (Martinelli, 2009).

À margem oeste do Planalto Atlântico, encontra-se a Depressão Periférica. Esta unidade é uma área rebaixada, em consequência da atividade erosiva, que se forma entre as bacias sedimentares e as estruturas geológicas mais antigas. É uma área deprimida entre as escarpas e o planalto atlântico com desníveis entre 200-300 m e aproximadamente 450 km de comprimento por 100 km de largura, cujas rochas predominantes são arenitos e basaltos. A Depressão Periférica do estado de São Paulo possui altimetria variando entre 500 e 650 m (Almeida, 1964).

A região metropolitana de Campinas se localiza no encontro dessas duas províncias, com partes situadas numa e partes noutra. A cidade apresenta um clima tropical de altitude, mesotérmico de inverno seco, com verões quentes e estação chuvosa no verão. Apresenta temperatura média do mês mais quente acima de 22°C e, no inverno, uma temperatura média do mês mais frio abaixo de 18°C, com média anual de 20°C. O índice pluviométrico anual é da ordem de 1400 mm, com chuvas concentradas principalmente nos meses de outubro a março (Almeida, 1964).

I.4.1. Fragmentação Florestal na Região de Campinas

A fragmentação de habitat é uma das mudanças mais evidentes da paisagem natural em diferentes ecossistemas do globo e suas consequências podem ser drasticamente prejudiciais à

biodiversidade e à estrutura genética de uma população (Keyghobadi *et al.*, 2005; Laurance, 2008). Em função das altas taxas de desmatamento, os ecossistemas das regiões tropicais se encontram atualmente fragmentados e descontínuos (Whitmore, 1997). Na África, por exemplo, grandes áreas de savana e florestas temperadas separam “ilhas” de florestas tropicais (Cobb *et al.*, 2000). Rozza (2003) aponta que as florestas tropicais estão entre os principais ecossistemas ameaçados pela ocupação humana. Segundo Petenusci (2004), além da expansão urbana, a expansão da fronteira agrícola no Brasil a partir da década de 1970, ocorrida sem um planejamento ambiental prévio, acelerou a devastação das vegetações das margens dos rios e de mananciais.

Os efeitos da fragmentação e da ação antrópica já foram explorados sob diversas óticas (Stuchbury, 2007) Seus efeitos podem não só variar com o ecossistema, mas também com a espécie e os vários bioindicadores – em nosso caso, marcadores genéticos (Keyghobadi, 2007; Schiffer *et al.*, 2007; Laurence, 2008; Vandersgast *et al.*, 2009; Zellmer & Knowles, 2009).

Dessa forma, é preciso não só reavaliar o que os modelos predizem, como também, tomar cuidado com generalizações precipitadas sobre suas consequências em animais e plantas. As implicações destes resultados sobre as políticas de preservação e de manejo podem ser catastróficas (Ewers & Didham, 2006). Simulações com modelos baseados nos dados e parâmetros de cada região representam opções para obter conclusões mais acuradas sobre o impacto da devastação ambiental sobre os organismos (Böhringer & Jochem, 2007; Miller & Hobbs, 2007; Storfer *et al.*, 2007).

O município de Campinas apresenta 197 remanescentes florestais entrecortados por paisagem urbana (Santin, 1999), formando um mosaico de tipos de vegetação. Alguns estudos mostraram que essas florestas são bastante heterogêneas (Salis *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 2004; Cielo Filho *et al.*, 2007). Apesar desta heterogeneidade, os fragmentos florestais do interior do Estado de São Paulo podem ser classificados na categoria Floresta Estacional Semidecídua, com áreas de contato com cerrados e com Floresta Ombrófila Densa (Oliveira, 2006).

As duas maiores e mais bem preservadas matas da região são a Mata de Santa Genebra e a Mata do Ribeirão Cachoeira-Colinas do Atibaia, com 250 ha e 233,7 ha de extensão respectivamente. A primeira mata está inserida na Depressão Periférica, desse modo, estende-se por terrenos de rochas cristalinas na sua porção sudeste e rochas sedimentares associadas com

magmáticas no restante de sua área (Fonseca *et al.*, 2004). Já a Mata do Ribeirão Cachoeira-Colinas do Atibaia está localizada na província geomorfológica do Planalto Atlântico, situada na porção nordeste do município. Contudo, as duas províncias demarcam fronteira na região da bacia do ribeirão Anhumas (Futada, 2007).

Uehara-Prado e Freitas (2009) não observaram o efeito da fragmentação sobre os índices de diversidade e riqueza de espécie da subfamília *Ithomiinae* em populações de fragmentos vizinhos localizados sobre o Planalto Atlântico. Brown & Freitas (2002) mostraram que há diferenças significativas na estrutura, composição e variação da fauna de borboletas das populações dos fragmentos florestais de Campinas. Tais diferenças estão correlacionadas com a heterogeneidade dos fragmentos em relação ao seu tamanho, vegetação, solo, topografia, umidade, grau de distúrbio e recursos usados por borboletas. A composição do grupo *Ithomini* em fragmentos também se mostrou diferente de acordo com cada unidade geomorfológica. Além disto, os táxons *Dismorphiinae*, *Papilionidae* e *Pierinae* também mostram o mesmo padrão geral (Figuras 2c e 3a de Brown & Freitas, 2000).

I.5. Aquecimento Global

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (*IPCC*), em seu último relatório em 2007, mostrou que nos últimos cem anos a temperatura média do ar aumentou consideravelmente seu valor de 0,5 a 0,92°C. Este aumento estaria correlacionado com o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera em consequência do Efeito Estufa.

Resumidamente, estudos independentes no mundo inteiro têm mostrado que a fauna e flora global vêm sofrendo com as alterações climáticas recentes (Parmesan, 2006). E diversos cenários podem ser feitos a partir destas considerações. Joly (2007) acredita que a principal consequência das mudanças climáticas é o aumento exponencial nas taxas de extinção de espécies, particularmente na região Neotropical. Colombo (2007) em um estudo realizado com 38 espécies arbóreas típicas de Mata Atlântica mostra dois cenários: num cenário mais otimista, que prevê um aumento médio superior a 2°C na temperatura da região, haverá uma redução de 30% da área hoje ocupada pela Mata Atlântica; e num cenário pessimista, com um aumento médio superior a 4°C, esta redução pode atingir 65%.

Por outro lado, Ab'Saber projeta que os efeitos do aquecimento global podem proteger e ser benéficos para a Mata Atlântica. Ele acredita que no Brasil, o aquecimento causa maior evaporação na região costeira, tornando-a mais úmida. Consequentemente, a Mata Atlântica fica mais protegida (Ab'Saber, 2009). Entretanto, esse autor ressalta que é preciso separar os efeitos das mudanças climáticas antropogênicas dos fenômenos geoclimáticos cíclicos, como *El Niño*, para se obter uma projeção mais realista (Ab'Saber, 2010); bem como é fundamental não esquecer a expansão da fronteira agrícola e da urbanização.

I.5.1. Aquecimento Global e o Polimorfismo de Inversões Cromossômicas de *Drosophila*

Análises temporais de longo prazo do polimorfismo de inversões cromossômicas em diferentes espécies de *Drosophila* se mostraram uma ferramenta poderosa para detectar rápidas alterações genéticas causadas pela mudança das condições climáticas (Hoffmann & Rieseberg, 2008). Knibb (1982) estudando populações australianas de *D. melanogaster* descreveu um cline latitudinal para a inversão *In(3R)Payne*, no qual sua frequência aumentava em populações mais próximas do equador. Após cerca de vinte anos, Anderson *et al.* (2005) e Umina *et al.* (2005) mostraram que houve aumento da frequência desta inversão em todas as populações da Austrália, sugerindo que esta é uma resposta direta aos efeitos do aquecimento global. Observações semelhantes em diferentes populações norte-americanas de *D. robusta* foram descritas por Levitan & Etges (2005; 2009) e Etges & Levitan (2008).

Um padrão similar foi observado para os arranjos do cromossomo *O* de *D. subobscura*. Primeiro, Rodríguez-Trelles *et al.* (1996) e Rodríguez-Trelles & Rodríguez (1998) mostraram o aumento da frequência de arranjos típicos do sul da Espanha no final da década de 90 em populações espanholas. Balanyà *et al.* (2006, 2009) comparam as frequências de inversão em populações de *D. subobscura* de três continentes; e descreveram alterações nas frequências de inversão consistentes com as alterações climáticas observadas para as localidades, sugerindo que estes padrões podem ser uma resposta às alterações do aquecimento global. No entanto, não se tem certeza de como a temperatura é diretamente responsável por tais mudanças genéticas.

Contrastando com estes exemplos, populações norte-americanas de *D. pseudoobscura* não apresentaram nenhuma variação consistente em 40 anos de monitoramento do polimorfismo de inversões cromossômicas (Anderson *et al.*, 1981), apesar de Schaeffer (2008) apontar uma

oscilação nas frequências das populações da Costa do Pacífico. A análise do polimorfismo em populações indianas de *D. ananassae* também não indicou uma diferenciação temporal em vinte anos de acompanhamento da frequência das inversões cromossômicas (Singh & Singh, 2007). Cabe ressaltar que nenhum dos exemplos acima mencionados foi realizado com uma espécie neotropical, o que deixa uma óbvia lacuna nos estudos das consequências do aquecimento global.

Além disso, outro aspecto que merece especial atenção é o fato de haver, em alguns locais, medidas implantadas pelo poder público no sentido de preservar e recuperar o ambiente. No entanto, ainda não há consenso para a escolha de índices ou indicadores capazes de avaliar possíveis progressos das diferentes medidas de preservação. Nem tampouco quais são os marcadores biológicos e/ou genéticos mais informativos para esta tarefa. Naturalmente, no momento, a posição mais indicada é a de explorar diversos marcadores, em diversos grupos de espécies e diferentes ecossistemas, de tal forma a acumular informações para melhores decisões que guiem e avaliem as políticas públicas (Dramstad, 2009; Stork *et al.*, 2009).

1.6. *Cochliomyia hominivorax*

Cochliomyia hominivorax Coquerel 1858 (Calliphoridae) é conhecida no Brasil como a mosca-da-bicheira. Junto com *Dermatobia hominis* (Oestridae), a mosca do berne, elas são consideradas as mais importantes moscas causadoras de miíase primária na região neotropical (Zumpt, 1965; Guimarães *et al.*, 1983). *C. hominivorax* é um ectoparasita obrigatório e seu ciclo de vida é de aproximadamente 21 dias, em temperatura ambiente (25°C). As fêmeas depositam seus ovos – 200 em média – em feridas recentes que estão expostas ou em orifícios corporais dos hospedeiros. Após 12 horas, as larvas emergem e passam a se alimentar dos tecidos vivos do hospedeiro por aproximadamente sete dias até atingir o terceiro instar, quando caem no solo e se transformam em pupas (Thomas & Mangan, 1989). O período de pupa dura seis dias em média, sendo seguido pela emergência dos adultos. Após oito dias, as fêmeas já estão prontas para serem fecundadas e realizar a oviposição, fechando o ciclo de vida da espécie. Ainda que sua maior importância seja na pecuária, este ectoparasita também ataca, ainda que esporadicamente, o homem (Guimarães *et al.*, 1983; Marquez *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009; de la Ossa *et al.*, 2009).

Originalmente, a distribuição geográfica da mosca da bicheira se estendia do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai (Hall & Wall, 1995). Na década de 1930, esta praga causou um enorme prejuízo na produção pecuária dos Estados Unidos, o que despertou o interesse da comunidade científica em desenvolver medidas de controle e erradicação desta praga. Alguns pesquisadores concluíram que reduzir ou eliminar a população de insetos seria uma solução melhor do que tratar topicamente os animais após estes serem infestados pelas larvas, motivando iniciativas envolvendo a esterilização de machos e a implementação de um programa de erradicação através da liberação de insetos estéreis (IAEA, 1998; Bowman, 2006).

A técnica do inseto estéril TIE (*Sterile Insect Technique* - SIT) foi idealizada por Knippling em 1937. Sua idéia inicial era de que a liberação no campo de um grande número de machos estéreis durante várias gerações sucessivas poderia levar a uma redução da densidade populacional da mosca da bicheira (Knippling, 1955). Essa técnica consiste na criação em massa de machos da espécie em questão, em sua esterilização, normalmente com radiação gama, e conseqüente liberação em determinada região, onde os machos estéreis irão competir com os machos selvagens pelo acasalamento. As fêmeas selvagens que se acasalam com os machos estéreis realizam a postura dos ovos que não eclodem (Baumhover, 2002).

Como *C. hominivorax* é uma espécie-alvo para controle populacional, os diversos aspectos de sua variação genética, morfológica, ecológica e demográfica devem ser estudados a fim de contribuir para a escolha das melhores estratégias para sua erradicação e/ou controle.

Kaufman & Wasserman (1957) foram os primeiros a descrever o cariótipo de *C. hominivorax* ($2n = 12$; XX-fêmea, XY-macho). Richardson *et al.* (1982a, b) descreveram posteriormente cariótipos diferentes e propuseram que *C. hominivorax* apresentaria diversos biótipos, sugerindo que este táxon fosse um complexo de espécies crípticas. Estes resultados foram posteriormente questionados por Gagné & Peterson (1982), que sugeriu que esta é uma única espécie que apresenta polimorfismo. Diversos outros estudos corroboraram essa hipótese (McInnis, 1981; McInnis *et al.*, 1983; LaChance *et al.*, 1982; LaChance & Whitten, 1986; Azeredo-Espin, 1987).

Mais tarde, várias análises moleculares se mostraram com resultados diferentes e contraditórios. Usando isoenzimas, Krafur & Whitten (1993) e Taylor *et al.* (1994) detectaram uma baixa diferenciação entre as populações da América do Norte e Central. Por outro lado,

Infante *et al.* (1999) mostraram que a espécie apresentava um polimorfismo e uma consequente diferenciação geográfica no Brasil. Usando marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA), diversas análises revelaram alto polimorfismo para a espécie. Roehrdanz & Johnson (1988) e Roehrdanz (1989) analisaram populações da América Central e do Norte e mostraram que entre as populações da parte continental havia uma baixa divergência. Porém, uma alta divergência foi detectada ao compará-las com as populações jamaicanas. Já em populações brasileiras, Infante & Azeredo-Espin (1995) e Infante *et al.* (1999) observaram que populações de diferentes partes do estado de São Paulo apresentam uma descontinuidade genética revelando diferenciação geográfica.

Lyra *et al.* (2005) não detectaram nenhuma estruturação nas populações uruguaias de *C. hominivorax*, sugerindo que estas seriam uma única população panmítica. Griffiths *et al.* (2009) a partir de uma análise usando novos *loci* de microssatélites – além daqueles já desenvolvidos para esta espécie (Torres *et al.*, 2004) – encontraram este mesmo padrão e verificaram que ele pode ser estendido à toda parte continental da América do Sul. Destacaram ainda que as populações de Trinidad e Tobago e Jamaica apresentam padrões de estruturação distintos.

Lyra *et al.* (2009) mostraram dois padrões diferentes para a diversidade genética de marcadores mitocondriais (PCR-RFLP) de *C. hominivorax*. Na região do Caribe, foi identificada alta estruturação populacional, onde há baixos índices de diversidade local, enquanto que populações na América do Sul mostraram o padrão oposto. Torres *et al.* (2009), analisando a variação dos microssatélites em 10 populações de quatro ilhas da região caribenha, mostraram uma moderada variabilidade genética nas comparações intra e interinsulares.

As controversas conclusões sobre a dinâmica demográfica e evolutiva desta espécie talvez reflitam a inclusão de diferentes populações nas análises e/ou uso de diferentes marcadores. Considerando o exposto acima, fica claro que o cenário da variabilidade e subdivisão populacional em *C. hominivorax* ainda é uma questão em aberto. Nesse sentido, um estudo abrangente sobre a extensão e distribuição da diversidade genética na espécie ao longo da atual distribuição geográfica é estratégico, uma vez que pode auxiliar na tomada de decisões em futuros programas de controle (Azeredo-Espin & Lessinger, 2006; Lyra, 2008).

Neste contexto, diversos outros marcadores e análises vêm sendo desenvolvidos contribuindo para a formação de um cenário mais favorável, tendo em vista o controle desta

praga. Destacam-se os trabalhos de Lessinger & Azeredo-Espin (2002) e Lessinger *et al* (2000), que apresentaram o primeiro genoma mitocondrial de um inseto totalmente sequenciado em laboratório brasileiro; e os inovadores trabalhos de descrição e caracterização de genes associados a resistência a inseticida (Carvalho *et al.*, 2006, 2009; da Silva *et al.*, 2009).

Entretanto, até agora não havia um mapa dos cromossomos politênicos com boa resolução para a espécie, apesar de um mapa preliminar ter sido publicado (Dev *et al.*, 1985; 1986) com resultados encorajadores. Como os autossomos se politenizam, mas os cromossomos sexuais não sofrem politenização, um mapa padrão dos cromossomos politênicos de *C. hominivorax* descreve os cinco autossomos da espécie (cromossomos 2 a 6).

Desta forma, há clara necessidade da elaboração de um fotomapa para esta espécie. Isto se constitui numa excelente oportunidade de aplicação prática da metodologia de análise de polimorfismos de inversões em *D. mediopunctata* usada tanto em nosso laboratório, quanto na primeira parte desta tese, para auxiliar efetivamente no controle de uma praga.

II. Objetivos

- 1. Estudar a variação temporal e geográfica do polimorfismo de inversões cromossômicas em populações naturais de *Drosophila mediopunctata*.**
- 2. Elaborar um fotomapa dos cinco autossomos politênicos de *Cochliomyia hominivorax*.**

Esta tese está organizada com uma introdução geral seguida de dois capítulos que mostram as análises temporal e geográfica do polimorfismo de inversões cromossômicas de *Drosophila mediopunctata*. Há um terceiro capítulo, que se refere ao artigo publicado em junho de 2009 no volume 23 da revista *Medical and Veterinary Entomology*, com o mapa dos politênicos de *Cochliomyia hominivorax*. Finalmente, há uma conclusão geral seguida da bibliografia geral.

Capítulo 1

Análise Temporal das Frequências de Inversões Cromossômicas da População de
Drosophila mediopunctata do Parque Nacional do Itatiaia, RJ

**The impact of climate change in the inversion polymorphism of a Neotropical
Drosophila species.**

Marcos R. D. Batista, Galina Ananina and Louis B. Klaczko*.

*Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual
de Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brazil.*

Short Title: **Temporal Variation of Inversion Frequencies**

*Corresponding author:

Louis Bernard Klaczko, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes – Instituto de
Biologia – Unicamp – Caixa Postal 6109, Campinas, SP – CEP: 13083-970 – Brasil.

Telephone: 55+19-3521-1150; FAX: 55+19-3521-6235.

E-mail: lbk@unicamp.br

Abstract:

Several long-term studies on *Drosophila* chromosome inversion polymorphisms showed that inversions can be considered a valuable tool to monitor the rapid genetic shifts caused by the changes of climate. However, none of those studies contemplates the effects of climate changes on a Neotropical species. After approximately two decades, new collections were carried out at *Parque Nacional do Itatiaia, RJ*, in order to assess any changes in inversion frequencies and to detect the possible effects of climatic shifts over the inversion polymorphism of the second chromosome of *Drosophila mediopunctata*. Our results show that the inversion frequencies of this species changed in an unexpected pattern in response to climate changes. Other climatic variables underlying the process may be causing this change, but we cannot exclude a possible role of genetic drift or of demographic factors. Further studies evaluating the genetic structure of the population may help to elucidate the observed changes.

Keywords: Global warming, *Drosophila mediopunctata*, chromosomal inversion, Brazilian Atlantic Forest, temporal variation.

I. Introduction

Climate change has driven the global biota to give rapid evolutionary responses (Parmesan, 2006). Several long-term studies on *Drosophila* inversion polymorphisms have shown that changes in inversion frequency can be considered a valuable tool to monitor the rapid genetic shifts caused by the change of climatic conditions (Rodríguez-Trelles *et al.*, 1996; Rodríguez-Trelles & Rodríguez 1998; Anderson *et al.*, 2005; Levitan & Etges, 2005; Umina *et al.*, 2005; Balanyà *et al.*, 2006; Etges *et al.*, 2006; van Heervadeen & Hoffmann, 2007; Etges and Levitan 2008; Balanyà *et al.*, 2009; Levitan & Etges, 2009). However, none of them contemplates the effects of climate changes on a Neotropical species.

Drosophila mediopunctata Dobzhansky & Pavan 1943 belongs to the *tripunctata* group, subgenus *Drosophila*. This is the second biggest Neotropical group with 79 species (Bächli, 2009). It has a wide distribution and it has been reported in many localities in Brazil and in South and Central America (Val *et al.*, 1981). In some places it is the most frequent species among collected flies, especially in the south of Brazil (Saavedra *et al.*, 1995); and it is almost exclusively forest dwelling, being rare or absent in the Brazilian Savanna (Cerrado) and Caatinga (Tidon-Sklorz & Sene, 1995; Tidon, 2006; Hatadani *et al.*, 2009).

Drosophila mediopunctata has five pairs of acrocentric chromosomes and a pair of dots, which does not polytenize (Katristsis, 1966); and is highly polymorphic for chromosome inversions. Chromosome X has three inversions, one of them related to the sex ratio trait (Carvalho *et al.*, 1989). Chromosome IV has two arrangements; and, chromosome II has 17 arrangements – eight in the distal region (*DA*, *DI*, *DP*, *DS*, *etc.*) and nine in the proximal region (*PA0*, *PB0*, *PC0*, *PC1*, *etc.*) (Ananina *et al.*, 2002). There is a strong linkage disequilibrium between inversions on the distal region and on the proximal region of the second chromosome. Only four haplotypes (*DA-PA0*, *DI-PB0*, *DS-PC0* and *DP-PC0*) are common (frequencies above 5%); among the 72 possible combinations of distal and proximal inversions, they represent about 90% of the total haplotypes found (Peixoto & Klaczko, 1991; Klaczko, 2006).

The natural population of *D. mediopunctata* from *Parque Nacional do Itatiaia*, RJ was investigated in the late 80s and an altitudinal cline was detected in inversion frequency (Peixoto & Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2004). Ananina *et al.* (2004) also found that the frequencies of three of the most common inversions (*DA*, *DP* and *DS*) showed cyclical variation throughout the

year. The frequency of *DA* (usually associated with proximal arrangement *PA0*) increased in the cold months and decreased in the warmer months, while *DP* and *DS* (both usually associated with *PC0*) pooled together showed an opposite pattern. Consistently, these patterns were observed in an altitudinal cline, when *DA-PA0* showed a high positive correlation with altitude, while *DP* and *DS* showed a significant negative correlation. The haplotype *DI-PB0* did not show any correlation with neither temperature and altitude, nor cyclical variation. This pattern suggests that natural selection is maintaining the observed variation (Klaczko, 2006).

After approximately two decades new collections were carried out on *Parque Nacional do Itatiaia, RJ* in order to better understand the temporal behavior and to detect the possible effects of the climatic shifts over the inversion polymorphism of the second chromosome of this species.

II. Materials and Methods

II.1. *Drosophila mediopunctata* Samples

Five field trips were carried out at *Parque Nacional do Itatiaia, RJ* between June 2007 and June 2009 considering different seasons and altitudes (from 500 m to 1200 m). The flies were collected with entomological nets and fermented banana baits and then brought back to the laboratory to be analysed. The collection dates were: June 1-4, 2007; February 22-26, 2008; November 19-24, 2008; Mars 10-16, 2009; and May 30 - June 2, 2009.

II.2. Cytological Procedures

Wild caught males were individually crossed with virgin females from the homokaryotypic strain *ITC-229-ET*, routinely maintained under laboratory conditions. From each cross, eight F1 larvae were karyotyped. One F1 larvae from each wild caught isofemale line was also analyzed. Polytene chromosomes were prepared by 1N HCl treatment and subsequent lacto-acetic-orcein staining of salivary gland cells from third instar larvae (Ashburner, 1989).

II.3. Weather and geographic data

The geographic variables (altitude) were obtained using a GPS navigation device. The climatic variables used for the correlation analysis were obtained by the nearer climatic station (*Afonso's Aero Automatic Station*, localized at 2200 m above sea level, inside the park; data available at www.agritempo.gov.br).

II.4. Statistical Analysis

Inversion frequency distributions were estimated after the inversions were karyotyped by the egg sample and male methods (Arnold, 1981; Peixoto and Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2004). As demonstrated by Ananina *et al.* (2004), *DS* and *DP* inversions have similar properties related to seasonality, temperature, precipitation and altitude. So, as they did, we grouped these inversions in our analysis. After angular transformation of the inversion frequency, we compared the frequencies with those published by Ananina *et al.* (2004).

Then, we performed a one-tailed Pearson correlation test to check if the current inversions still showed the same correlations with climatic and geographical variables previously published by Ananina *et al.* (2004).

III. Results

III.1. Temporal Variation of the Climatic Variables

Figure 1 shows the long-term variation of the average annual maximum, mean and minimum temperature. We observe a positive and significant correlation of the temperature (Tmax: $r = 0.63$; $p < 0.01$; Tmean: $r = 0.84$; $p < 0.01$; Tmin: $r = 0.92$; $p < 0.01$). Figure 2 shows a significant decreasing trend in annual precipitation throughout the years in the region ($r = -0.56$; $p = 0.007$).

III.2. Temporal Variation of the Inversion Frequencies

Table 1 shows the second chromosome inversion frequencies of different collections at different altitudinal sites. If we compare the current average frequencies with the previous ones, there is an increase in the values of *DA* and *DI* arrangement frequencies ($X^2 = 31.9$, $p < 0.001$), easily noticed in Figure 3. This change can also be measured in terms of the genetic distance ($d = 0.013$). Furthermore, we still observe this difference if we compare the frequencies of the distinct seasons as shown in Figure 4 (summer: $X^2 = 10.3$, $p < 0.02$; winter: $X^2 = 42.5$, $p < 0.001$). However, the seasonal variation previously described for *DA*, the *DS* and *DP* pooled arrangements remains cycling (Figures 5 and 6).

III.3. Clines and correlations.

Figure 7 shows the correlation between the most common arrangements and altitude.

Ananina *et al.* (2004) previously demonstrated significant correlations of *DA* inversions (positive; $r = 0.87$, $p < 0.01$) and pooled *DS* and *DP* (negative; $r = -0.91$, $p < 0.001$). Now, we no longer observe the effect of altitude over these arrangements (for *DA* $r = 0.02$, $p = 0.96$; for *DS* and *DP* pooled $r = -0.57$, $p = 0.11$). Surprisingly, we found a significant correlation between *DI* and altitude ($r = 0.70$, $p = 0.036$).

Table 2 shows the correlations between the frequency of inversions and different climatic variables. The pattern described in our previous work (Ananina *et al.*, 2004) remains basically the same: *DA* is negatively correlated to temperature and precipitation, while *DS* + *DP* is positively correlated to these variables, and no significant correlation detected for *DI*.

IV. Discussion

The observed changes in the region of the *Parque Nacional do Itatiaia, RJ* might be linked with the effects of global warming, as considered by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Long-term analyses of chromosomal inversion polymorphisms in different *Drosophila* species have linked changes in inversion frequencies to recent climate changes, suggesting that widespread species may undergo adaptative shifts in response to global warming (Hoffmann & Rieseberg, 2008). In Australian *D. melanogaster* populations, inversion *In(3r)Payne* increases its frequency towards the equator in a latitudinal cline (Knibb *et al.*, 1981). After approximately twenty years, Anderson *et al.* (2005) and Umina *et al.* (2005) showed that there was a general increase of this inversion frequency in all Australian populations, suggesting that this is a direct response to the global warming. In *D. subobscura*, a similar pattern was observed for the *O* chromosomal arrangements. First, Rodríguez-Trelles *et al.* (1996) and Rodríguez-Trelles & Rodríguez (1998) showed the influence of the seasonality in the increase of the southern arrangement frequency. Then, Balanyà *et al.* (2006) showed that *D. subobscura* populations from three different continents presented similar patterns in response to the impacts of the global warming. Decreases of northern arrangements for different American populations of *D. robusta* were also described (Levitan & Etges, 2005; Etges & Levitan, 2008).

Contrasting with these examples, American populations of *D. pseudoobscura* did not show any consistent variation in 40 years (Anderson *et al.*, 1981); although Schaeffer (2008) pointed out a variation in the Pacific Coast populations. Indian populations of *D. ananassae* did

not show any temporal variation either in 20 years of monitoring of the chromosomal inversion frequencies (Singh & Singh, 2007).

The *DI* arrangement was the main inversion to have a major change in its frequency, increasing almost 8% in the winter collections and 5% in the summer. This is an unexpected result: it was expected that *DS* and *DP* arrangements would have their frequencies increased, since these inversions have a positive correlation with the temperature. Santos *et al.* (2005) showed that the chromosomal arrangements favored at the high laboratory temperature were not necessarily the same as the most common arrangements in populations of *D. suboscuro* at warmer latitudes. In that manner, the responses of each population to climatic changes may be particularly different for each species and region. Moreover, one cannot discard that the observed variation is a possible effect of genetic drift or other demographic factor.

Ananina *et al.* (2004) also described an altitudinal cline for the *DA*, *DS* and *DP* inversions, in which *DA* increased its frequency at the higher collection sites; and *DS* and *DP* inversions showed an opposite pattern. After two decades, our results do not describe the same altitudinal cline for those inversions. *DI* inversion is the one that now shows a significant altitudinal gradient. This finding must be further investigated, since this arrangement does not show any correlation with any climatic variable.

On the other hand, the seasonal variation of the arrangements remains cycling. Repeated seasonal cycles of changes in inversions frequencies give the clearest and least equivocal evidence of strong selection acting on inversion polymorphism in natural populations (Krimbas & Powell, 1992). Our results show that the polymorphism of *D. mediopunctata* is responding to climate change in an unexpected way. Moreover, other questions remain to be answered: does climate change affect morphological traits in the population of *D. mediopunctata* at *Parque Nacional do Itatiaia, RJ* in a pattern consistent with previous observations? What other environmental variables underlying the process may be causing this response? Further studies evaluating the geographical variation and assessing the genetic structure of the population may help to elucidate the observed pattern.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Léo Nascimento, Coordenador de Pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ) for the authorizations granted for the field work. We appreciate the technical help of Maria Salete Couto and Claudete Couto; and the help of Ayana B. Martins, Felipe Rocha, Diogo Moraes, Galina Ananina and Iuri M. Ventura in the field. Finally, we thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

References:

- Ananina G, Souza WN, Peixoto AA, Klaczko LB (2002). Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem Inst Oswaldo Cruz, **97**: 691-694.
- Ananina G, Peixoto AA, Blanche-Mathé BC, Souza WN, da Silva LB, Valente VLS, Klaczko LB (2004). Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal and latitudinal variation. Genet Mol Biol **27**: 61-69.
- Anderson AR, Hoffmann AA, McKechnie SW, Umina PA, Weeks AR (2005). The latitudinal cline in the *In(3R)Payne* inversion polymorphism has shifted in the last 20 years in Australian *Drosophila melanogaster* populations. Mol Ecol **14**: 851-858.
- Anderson WW, Arnold J, Baldwin DG, Beckenbach AT, Brown CJ, Bryant SH, Coyne JA, Harshman LG, Heed WB, Jeffrey DE, Klaczko LB, Moore BC, Porter JM, Powell JR, Prout T, Schaeffer SW, Stephens JC, Taylor CE, Turner ME, Williams GO, Moore JA (1991). Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. Proc Natl Acad Sci **88**: 10367-10371.
- Bächli G (2009). TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Database 2009/10; v1.03. Available at <http://taxodros.unizh.ch/>. Accessed on May 18, 2009.
- Balanyà J, Solé E, Oller JM, Sperlich D, Serra L (2004). Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. II. European populations. J Zool Syst Evol Res **42**: 191-201.
- Balanyà J, Oller JM, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L (2006). Global genetic change tracks global climatic warming in *Drosophila subobscura*. Science **313**:1773-1775.
- Balanyà J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L (2009). The chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*: a microevolutionary weapon to monitor global change. Heredity **103**: 364-367.

- Bitner-Mathé BC, Peixoto AA, Klaczko LB (1995). Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influences of chromosome inversions. *Heredity* **75**: 54-61.
- Carvalho AB, Peixoto AA, Klaczko LB (1989). "Sex-ratio" in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **62**: 425-428.
- Dobzhansky T (1970). *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York, 505 pp.
- Dobzhansky T, Pavan C (1943). Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bol Fac Filo Ciên S Paulo* **36**: 7-72.
- Etges WJ, Arbuckle KL, Levitan M (2006). Long-term frequency shifts in the chromosomal polymorphisms of *Drosophila robusta* in the Great Smoky Mountains. *Biol J Linn Soc* **88**: 131-141.
- Etges WJ, Levitan M (2008). Variable evolutionary response to regional climate change in a polymorphic species. *Biol. J. Linn. Soc.* **95**: 702-718.
- Hatadani LM, Baptista JC, Souza WN, Klaczko LB (2004). Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* **93**: 525-534.
- Hatadani LM, McInerney JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB (2009). Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and related groups (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* **51**: 595-600.
- van Heerwaarden B, Hoffmann AA (2007). Global warming: fly populations are responding rapidly to climate change. *Cur Biol* **17**: R16-R18.
- Hoffmann AA, Rieseberg LH (2008). Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst* **39**: 21-42.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007). *Climate change 2007: The physical science basis. Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC*, S. Solomon *et al.*, Eds. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2007).
- Kastritsis CD (1966). *Cytological studies of some species of the tripunctata group of Drosophila*, Univ Texas Publs, Texas, p. 413-474.
- Klaczko LB, Otto PA, Peixoto AA (1990). Allele frequency estimates when only heterozygotes can be recognized: method of estimation and application in the case of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila*. *Heredity* **64**: 263-270.
- Klaczko LB (2006). Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* **126**: 43-55.

- Knibb WR (1982). Chromosome inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* II. Geographic clines and climatic associations in Australasia, North America and Asia. *Genetica* **58**: 213-221.
- Levitan M, Etges WJ (2005). Climate change and recent genetic flux in populations of *Drosophila robusta*. *BMC Evol Biol* **5**: 4.
- Levitan M, Etges WJ (2009). Rapid response to perturbation of chromosome frequencies in natural populations of *Drosophila robusta*. *Genetica* **137**: 1-8.
- Parmesan C (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **37**:637–69.
- Peixoto AA, Klaczko LB (1991). Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila*. *Genetics* **129**: 773-777.
- Rodríguez-Trelles F, Alvarez G, Zapata C (1996). Time-series analysis of seasonal changes of the *O* inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **142**: 179-187.
- Rodriguez-Trelles F, Rodriguez MA (1998). Rapid microevolution and loss of chromosomal diversity in *Drosophila* in response to climate warming. *Evol Ecol* **12**:829-38.
- Santos M, Céspedes W, Balanyà J, Trotta V, Calboli FCF, Fontdevila A., Serra L (2005). Temperature-related genetic changes in laboratory populations of *Drosophila subobscura*: Evidence against simple climatic-based explanations for latitudinal clines. *Am Nat* **165**:258-73.
- Saavedra CC, Callegari-Jacques SM, Napp M, Valente VLS (1995). A descriptive and analytical study of Neotropical drosophilid communities. *J Zool Syst Evol Res* **33**: 62-74.
- Schaeffer SW (2008). Selection in heterogeneous environments maintains the gene arrangement polymorphism of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*.**62**: 3082-3099.
- Tidon-Sklorz R, Sene FM. (1995). Evolution of the Buzzatii cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evol Biol* **8**: 71-85. a
- Tidon R (2006). Relationships between drosophilids (Diptera, drosophilidae) and the environment on two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linn Soc* **87**: 233-248.
- Umina PA, Weeks AR, Kearney MR, McKechnie SW, Hoffmann AA (2005). A rapid shift in a classic clinal pattern in *Drosophila* reflecting climate change. *Science* **308**: 691-693.
- Val FC, Vilela CR, Marques MD (1981). Drosophilidae of the Neotropical region. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds) *The genetics and biology of drosophila*, Vol. 3^a, Academic Press, New York. , pp. 123-168.
- Vilela CR, Bächli G (2000). Five new species of Neotropical *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Bull Soc Entomol Suisse* **73**: 49-65.

Tables

Table 1 – Second chromosome inversion frequencies of *D. mediopunctata* from different collections and altitude sites, at *Parque Nacional do Itatiaia, RJ*. (**2N**: number of chromosomes analyzed).

	<i>DA</i>	<i>DI</i>	<i>DS + DP</i>	<i>OT</i>	<i>2N</i>		<i>DA</i>	<i>DI</i>	<i>DS + DP</i>	<i>OT</i>	<i>2N</i>
June 1-4, 2007– Winter						Mars 10-16, 2009 – Summer					
<i>1128 m</i>	0.67	0.33	0.00	0.00	18	<i>1128 m</i>	0.48	0.28	0.18	0.08	40
<i>950 m</i>	0.53	0.41	0.03	0.03	34	<i>950 m</i>	0.42	0.23	0.19	0.15	26
<i>750 m</i>	0.57	0.36	0.02	0.05	44	<i>750 m</i>	0.30	0.26	0.37	0.07	76
Total	0.57	0.38	0.02	0.03	96	Total	0.37	0.26	0.28	0.08	142
February 22-26, 2008– Summer						May 30 - June 2, 2009 – Winter					
<i>1128 m</i>	0.50	0.33	0.17	0.00	12	<i>1200 m</i>	0.58	0.35	0.04	0.04	26
<i>950 m</i>	0.41	0.32	0.23	0.05	22	<i>1100 m</i>	0.50	0.41	0.00	0.09	22
<i>750 m</i>	0.53	0.26	0.18	0.03	38	<i>1050 m</i>	0.60	0.31	0.10	0.00	42
Total	0.49	0.29	0.19	0.03	72	<i>950 m</i>	0.62	0.28	0.07	0.03	60
November 19-24, 2008 – Summer						<i>900 m</i>	0.64	0.25	0.06	0.06	36
<i>1128 m</i>	0.65	0.29	0.00	0.05	92	<i>850 m</i>	0.65	0.24	0.07	0.04	54
<i>950 m</i>	0.48	0.25	0.19	0.08	64	<i>750 m</i>	0.50	0.28	0.11	0.11	46
<i>750 m</i>	0.45	0.30	0.20	0.05	84	<i>590 m</i>	0.60	0.24	0.10	0.06	62
Total	0.54	0.28	0.12	0.06	240	Total	0.59	0.28	0.07	0.05	348

Total number of chromosomes analyzed: 2N = 898.

***OT* – Other arrangements.**

Table 2 – Pearson's correlation (*r*) between the second chromosome inversion frequencies of *D. mediopunctata* and climatic variables. For *DA* and *DS+DP* the significance is given by a one-tailed test assuming the previous significant correlations as the null hypothesis. (***OT***: others).

Inversions	Tmax (°C)	Tmea (°C)	Tmin (°C)	Prec (mm)
<i>DA</i>	-0.78	-0.81*	-0.82*	-0.76
<i>DI</i>	-0.19	-0.25	-0.29	-0.17
<i>DS + DP</i>	0.75	0.80*	0.84*	0.80*
<i>OT</i>	0.22	0.24	0.25	0.02

* $p < 0.05$

Figures

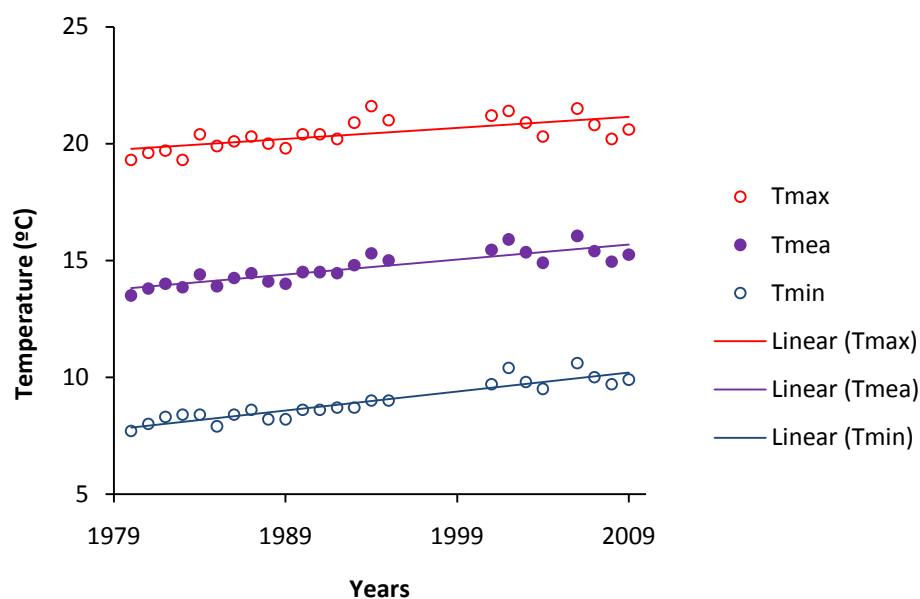


Figure 1 – Long-term variation of the temperature at *Parque Nacional do Itatiaia, RJ*.

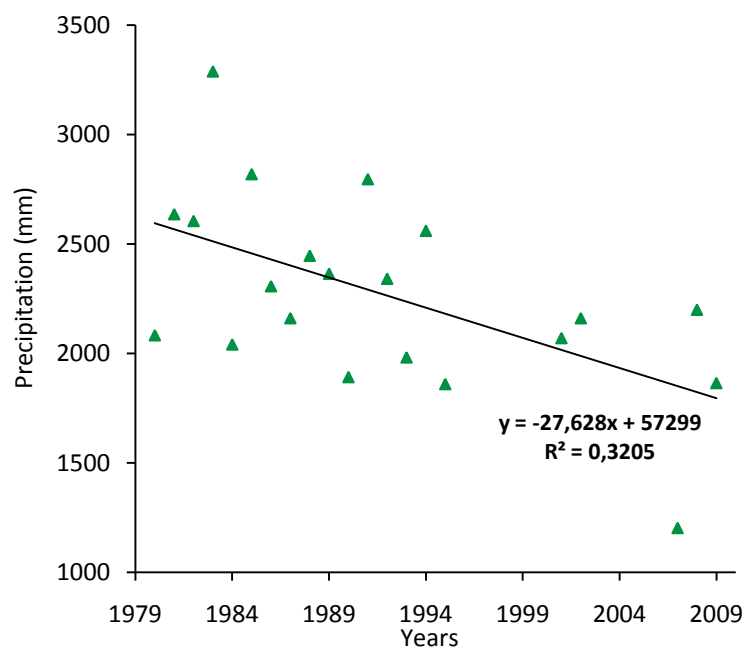


Figure 2 – Temporal variation of annual precipitation at *Parque Nacional do Itatiaia, RJ*.

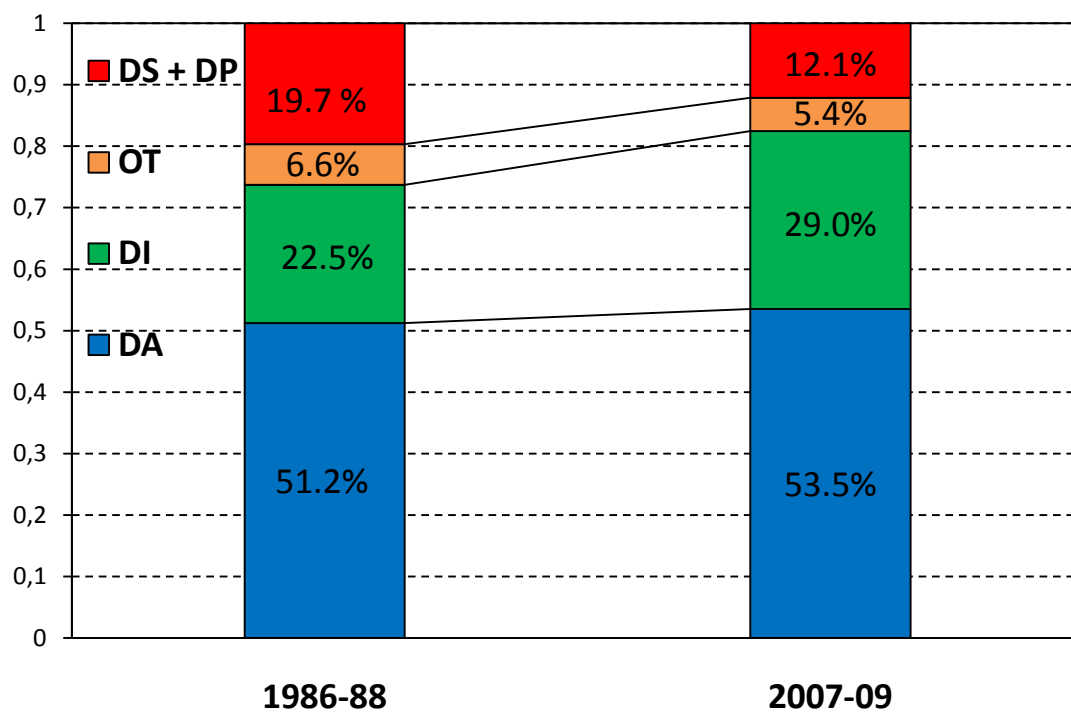


Figure 3 – Comparison between the current (2007-2009) and the previous (1986-1988) average frequencies of *D. mediopunctata* second chromosome inversions.

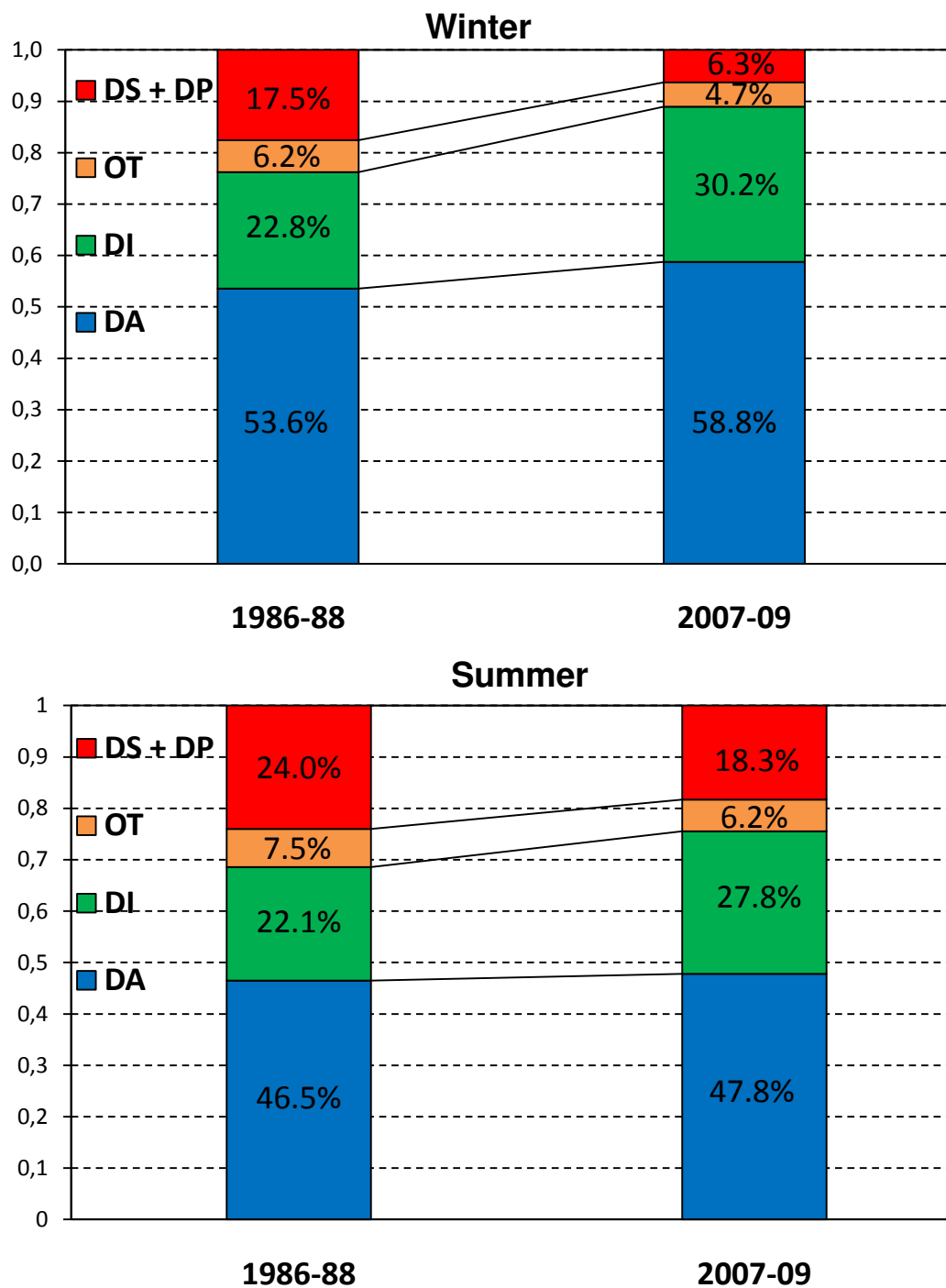


Figure 4 – Comparison between the current and the previous average frequencies of *D. mediopunctata* second chromosome, collected in the winter and in the summer.

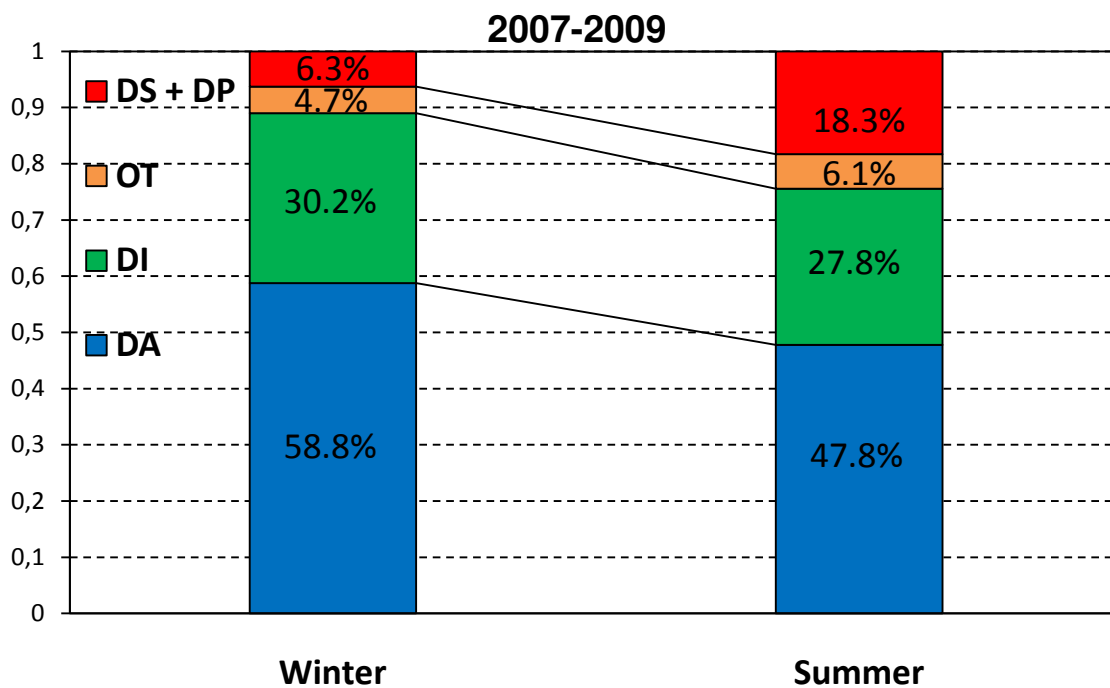
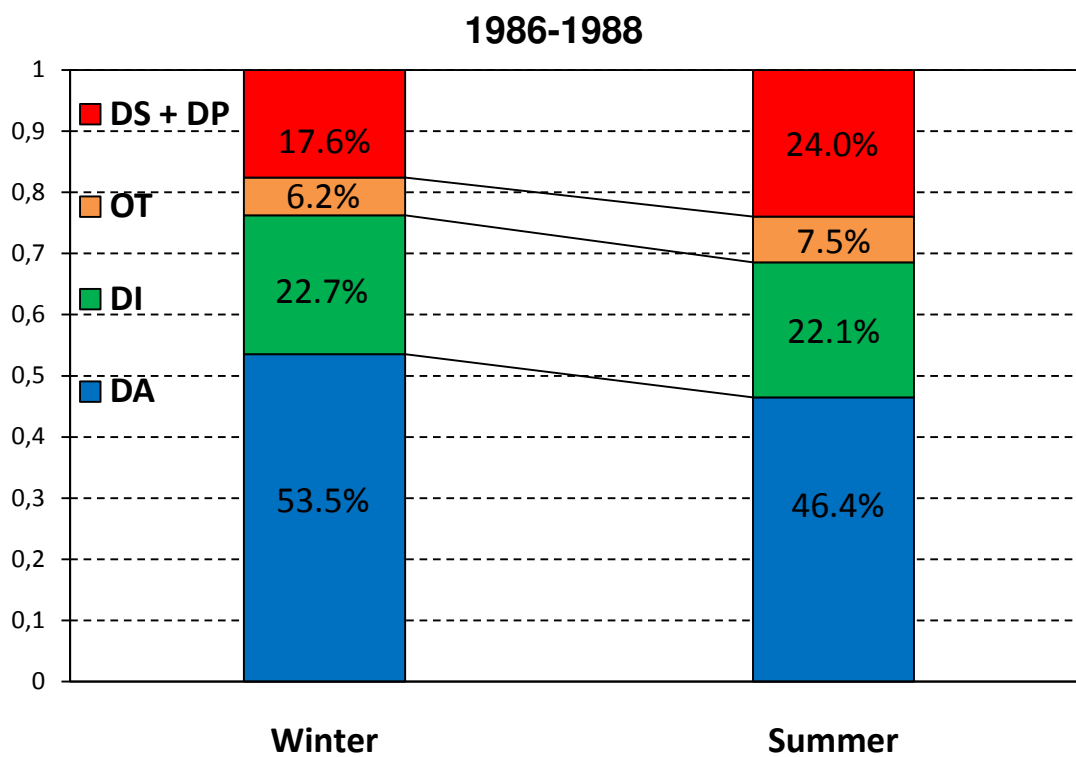


Figure 5 - Comparison between the distinct seasons of the *D. mediopunctata* second chromosome average frequencies collected in 1986-1988 and 2007-2009.

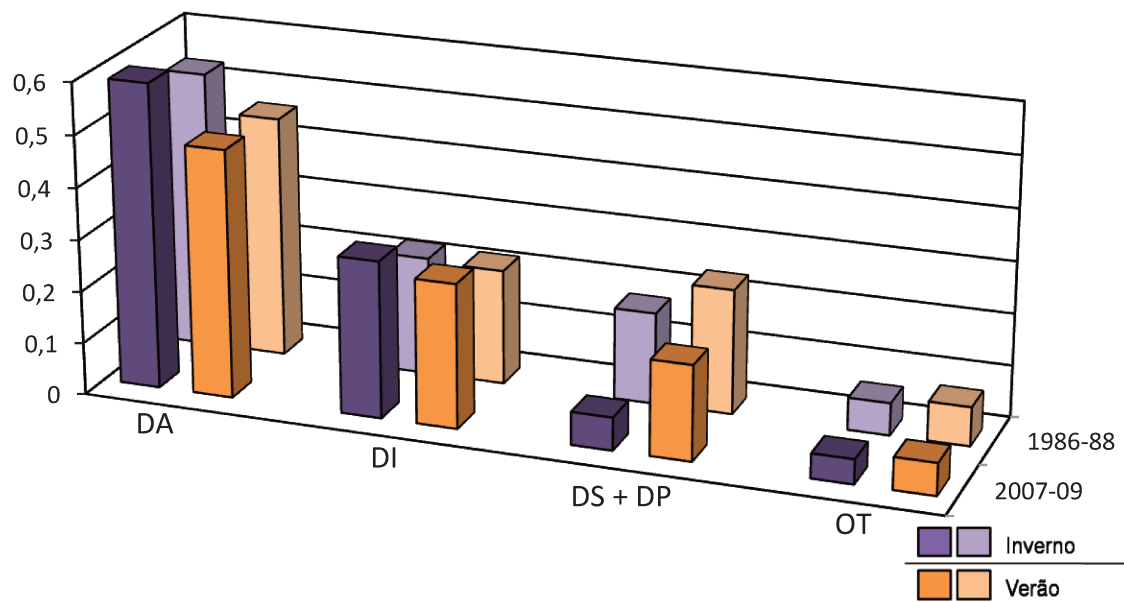


Figure 6 – Comparison of the current and previous inversions frequencies seasonality.

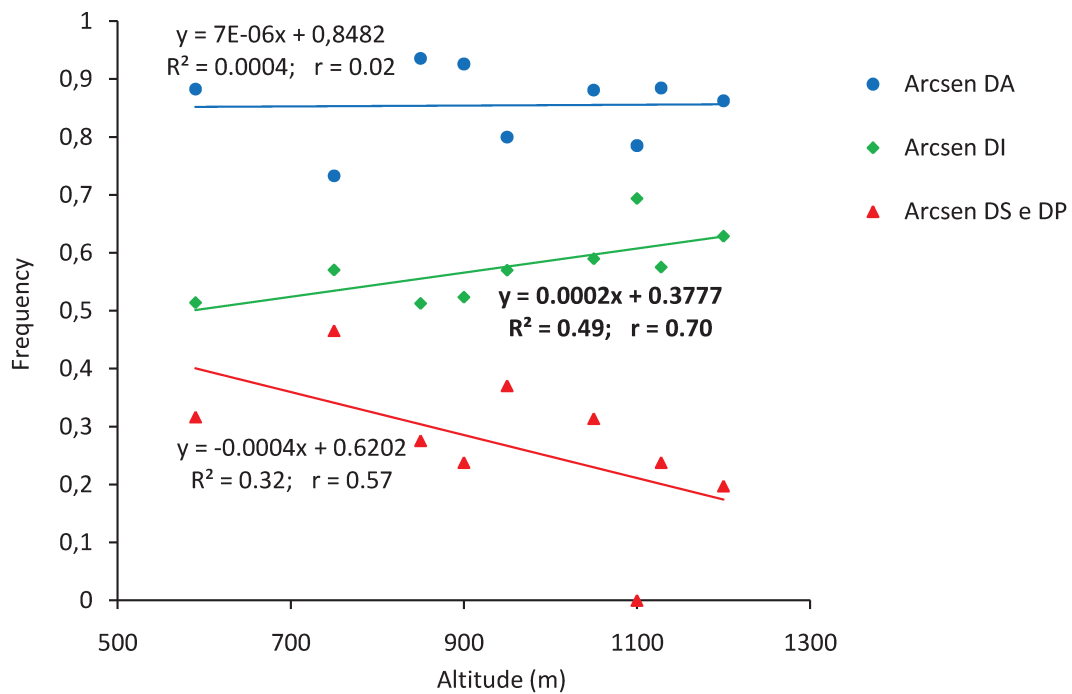


Figure 7 – Distribution of the DA, DI, DS and DP along the altitudinal gradient.

Capítulo 2

Diferenciação Geográfica de Inversões Cromossômicas.

**Geographic Differentiation of Chromosomal Inversions:
Evidence of Natural Selection in a Fragmented Landscape.**

Marcos R. D. Batista, Galina Ananina and Louis B. Klaczko*.

*Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual
de Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brazil.*

Short Title: **Geographic Variation of Inversion Frequencies**

*Corresponding author:

Louis Bernard Klaczko, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes – Instituto de
Biologia – Unicamp – Caixa Postal 6109, Campinas, SP – CEP: 13083-970 – Brasil.

Telephone: 55+19-3521-1150; FAX: 55+19-3521-6235.

E-mail: lbk@unicamp.br

Abstract

Forest fragmentation is a notorious change of the natural landscape in different ecosystems around the world with potentially harmful consequences to biodiversity and to the genetic structure of populations. Since the fast economic development of the city of Campinas, the Seasonal Semi-deciduous Forests of the region have had their composition drastically altered. Nowadays, the city has approximately 190 forest remnants, separated by the urban landscape. These forest fragments are located over two geomorphologic units, which are physiognomically and climatically quite distinct. A geographical differentiation of *Drosophila mediopunctata* populations for chromosomal inversions was reported previously. To test if the divergence is an adaptive response to local differences (related to each geomorphologic unit), or if it is a casual oscillation (genetic drift) caused by forest fragmentation (uncorrelated with the two units), we estimated the chromosome inversion frequencies in various fragments dispersed over the two units. We observed marked differences between the two geomorphologic units, in contrast with small divergence among fragments. Our results suggest that the observed geographical differentiation in the inversion frequency distribution may be a result of local adaptation to floristic and climatic variations, in spite of the forest fragmentation. However, we still cannot discard the possible effects of demographic factors shaping the observed pattern, particularly a combination of migration and genetic drift.

Keywords: Fragmentation, Chromosome Inversions, *Drosophila mediopunctata*, Local Adaptation, Longitudinal Cline.

I. Introduction

I.1. Forest Fragmentation

Forest fragmentation is a notorious change of the natural landscape in different ecosystems around the world (Hobbs & Yates, 2003). It may be very harmful to biodiversity, affecting drastically the genetic structure of populations (Keyghobaldi *et al.*, 2005; Laurance, 2008; Zellmer & Knowles, 2009). Although the consequences of the fragmentation process have been studied under different perspectives, its effect on animals and plants can vary widely among different genetic markers and taxa (Cobb *et al.*, 2000; Keyghobaldi, 2007; Schiffer *et al.*, 2007; Stuchbury, 2007; Mayer *et al.*, 2009; Stanton *et al.*, 2009). Thus, one should be careful with hasty generalizations, and various genetic markers should be used to assess the effects of the fragmentation process on a species.

Different ecosystems in the tropical region are extremely fragmented due to the high deforestation rate (Whitmore, 1997). The Seasonal Semi-deciduous Forests in the state of São Paulo, Brazil are a good example: they have been drastically altered since the fast economic development of the country. Nowadays, the city of Campinas has approximately 190 forest remnants scattered in the urban landscape.

Although all fragments in this region are classified as Seasonal Semi-deciduous Forests, various studies have shown that they are heterogeneous (Salis *et al.*, 1995; Cielo-Filho & Santin, 2002). The forest fragments are located over two geomorphologic units, Peripheral Depression and Atlantic Plateau (Fig. 1). They show marked differences in relation to climatic variables, such as annual temperature and pluviometrical means (Table 1). The two biggest (both with approximately 250 ha) and the best preserved forest remnants of the city are Mata de Santa Genebra and Mata do Ribeirão Cachoeira-Colinas do Atibaia. Each one is located in one of the two geomorphologic units (*cf.* Fonseca *et al.*, 2004 for details).

The Peripheral Depression unit is characterized by a flat topography and lands of magmatic sedimentary rocks with crystalline rocks at its southeast region. The Atlantic Plateau, in the northeast region of the city, is characterized by a continuous range of mountains (Cielo Filho *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2004).

Brown & Freitas (2002) found significant differences in the structure, composition, and variation of the butterfly populations in the forest fragments of the city of Campinas, SP, due to their heterogeneity related to size, vegetation composition, soil type, topography, humidity, degree of disturbance and resources used by butterflies. Moreover, they found out that the species composition for *Ithomini* collected in the fragments of the Campinas areas were different according to the two geomorphologic units (Brown & Freitas, 2000; André V. L. Freitas, personal communication).

I.2. Chromosomal Inversions

In eukariotes, chromosomal rearrangements such as inversions, translocations and duplications are very common in different kingdoms (Coghlan *et al.*, 2005). They are easily recognized in Diptera, due to the polytene chromosomes. Chromosome inversions suppress crossing-over when heterozygous, allowing them to evolve as adapted genic complexes, which are under strong selective pressures (Dobzhansky, 1970; Sperlich & Pfriem, 1986; Krimbas & Powell, 2000; Hoffmann & Rieseberg, 2008). Inversion polymorphisms have been studied for a long time, since they allow insights on the action of different evolutionary processes such as shifts in chromosomal and gene arrangement frequencies, geographical clines and speciation (Anderson *et al.*, 1991; Rieseberg, 2001; Balanyà *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2004; Rasic *et al.*, 2006; Balanyà *et al.*, 2006; Etges and Levitan, 2008; McAllister *et al.*, 2008; Schaeffer, 2008; Mestre *et al.*, 2009). Although many studies have shown that inversions are under selection or correlated to adaptive traits in various organisms, the biological meaning of the inversion polymorphisms remains an issue to be solved (see Hoffmann & Rieseberg, 2008, for a detailed review).

I.3. *Drosophila mediopunctata*

Drosophila mediopunctata Dobzhansky and Pavan 1943 belongs to the *tripunctata* group, subgenus *Drosophila*. This is the second biggest Neotropical group with 79 species (Bächli, 2009). It has a wide distribution and has been reported in many localities in Brazil and in South and Central America (Val *et al.*, 1981). In some places, it is the most frequent species among collected flies, especially in the south of Brazil (Saavedra *et al.*, 1995); and it is almost exclusively forest dwelling, being rare or absent in the Brazilian Savanna (Cerrado) and Caatinga

(Tidon-Sklorz and Sene, 1995; Tidon, 2006; Hatadani *et al.*, 2009).

D. mediopunctata has five pairs of acrocentric chromosomes and a pair of dots, which does not polytenize (Katristsis, 1966). The species is highly polymorphic for chromosome inversions. The polymorphic chromosomes are: chromosome X, with three inversions, one of them related to the sex ratio trait (Carvalho *et al.*, 1989); chromosome IV with two arrangements; and finally, chromosome II, the most polymorphic, with 17 arrangements – eight in the distal region (*DA*, *DI*, *DP*, *DS*, *etc.*) and nine in the proximal region (*PA0*, *PB0*, *PC0*, *PC1*, *etc.*) (Ananina *et al.*, 2002). There is strong linkage disequilibrium between inversions on the distal region and on the proximal region of the second chromosome. In consequence, only four haplotypes (*DA-PA0*, *DI-PB0*, *DS-PC0* and *DP-PC0*) are common (frequencies above 5%); among the 72 possible combinations of distal and proximal inversions, they represent about 90% of the total haplotypes found (Peixoto & Klaczko, 1991; Klaczko, 2006).

Natural populations of *D. mediopunctata* from Itatiaia, a National Park on the Slopes of the Serra da Mantiqueira, which lies on the Atlantic Plateau, were investigated and an altitudinal cline was detected in inversion frequency (Peixoto & Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2004). An interaction of genotype (inversion karyotype) x environment (collecting date) for body size was previously observed (Bitnér-Mathé *et al.*, 1995). In laboratory conditions, Hatadani & Klaczko (2008) showed that wing size and shape are influenced by karyotype, sex and temperature. Besides, suggestive evidences of the interaction between inversion karyotype and temperature over wing shape were reported, indicating that each arrangement might be accumulating different alleles best adapted to different temperatures. Hatadani *et al.* (2004) showed that the inversions are associated with this species polychromatism. These studies have gathered evidences helping to understand the biological meaning of this species inversion polymorphism, using correlations with morphologic characters.

Ananina *et al.* (2004) also found that the frequencies of three of the most common inversions (*DA*, *DP* and *DS*) showed cyclical variation throughout the year. The frequency of *DA* (usually associated with proximal arrangement *PA0*) increased in the cold months and decreased in the warmer months, while *DP* and *DS* (normally associated with *PC0*) showed an opposite pattern. Consistently, these patterns were observed in an altitudinal cline, when *DA-PA0* showed a high positive correlation with altitude, while *DP* and *DS* showed a significant negative

correlation. The haplotype *DI-PB0* did not show any correlation with neither temperature and altitude, nor cyclical variation. This suggests that natural selection is maintaining the observed variation (Klaczko, 2006).

Ananina *et al.* (2004) analyzed two nearby populations (distant 50 km from each other) in the State of São Paulo, Mata Santa Genebra and Serra do Japi, but located on the two geomorphologic units of the region, Peripheral Depression and Atlantic Plateau, respectively. They found out that the inversion frequencies were quite different between these two populations. Moreover, one of them (Serra do Japi) had frequencies similar to Itatiaia, which is about 250 km distant.

To understand the geographical differentiation of chromosomal inversion frequencies, we studied neighbouring populations, distributed over the two geomorphologic units. Our goal was to test if the originally observed difference is an adaptive response to the local floristic and climatic differences, and is thus correlated to each geomorphologic unit; or if it is a casual oscillation (genetic drift) caused by forest fragmentation, and so, uncorrelated with the two units.

II. Materials and Methods

II.1. *Drosophila mediopunctata* Samples

Several field trips were carried out from February 2005 to July 2009 collecting *D. mediopunctata* with entomological nets and fermented banana baits and bringing them back to the laboratory to be analysed. The collections were planned according to the sites location (Fig. 1) in the geomorphologic units, as described in Table 1.

II.2. Cytological Preparations

Wild-caught males were individually crossed with virgin females from the homokaryotypic strain *ITC-229-ET*, routinely maintained under laboratory conditions. Eight F1 larvae were karyotyped. One F1 larvae from each wild caught isofemale line was also analyzed. Polytene chromosomes were prepared by 1N HCl treatment and subsequent lacto-acetic-orcein staining of salivary gland cells from third instar larvae (Ashburner, 1989).

II.3. Climatic and geographic data

The geographic variables shown in Table 1 (latitude, longitude, altitude) were obtained using a GPS navigation device. The meteorological variables (annual temperature and precipitation means) for each site were estimated from the nearest meteorological station data summaries from the following websites: www.agritempo.gov.br and <http://www.ciiagro.sp.gov.br>. The aridity indexes were estimated as suggested by Fonty *et al.* (2009). The data referring to Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi was published by Pinto (1992).

II.4. Statistical Analysis

Inversion frequency distributions were estimated by the egg sample and male methods (Arnold, 1981; Peixoto and Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2004). As shown by Ananina *et al.* (2004), *DS* and *DP* inversions have similar seasonality, temperature, precipitation and altitude related properties. So, as they did, we grouped these inversions in our analysis. We also grouped rare inversions (Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Ananina *et al.*, 2004).

Clustering analysis was done using Ward's algorithm method based on Single Euclidian Distance from the observed frequencies with the program *R*. Nei's Genetic Distances were calculated by the program *Gendist*, from the package *PHYLIP 3.7* (Felsenstein, 1993). Mantel tests were done using the program *zt* (Bonnet and Van de Peer, 2002) in order to test the correlation between the genetic distance and the geographic distance. The correlations between climatic and geographic variables and the observed inversion frequencies were done after angular transformations of the frequencies. Finally, hierarchical F_{ST} statistics of the inversion frequency were calculated by the program *Arlequin* (Schneider *et al.*, 2000).

III. Results

III.1. Inversion frequencies and clustering analyses

The inversion frequencies are shown in Table 2. Figure 1 clearly shows the frequency similarities among populations within the same geomorphologic unit. For example, populations of Parque Ecológico (**PE**) and Mata Ribeirão Cachoeira, Colinas do Atibaia (**CA**), which lie in the Atlantic Plateau, do not differ statistically ($X^2 = 1.04$; d.f. = 3; $p > 0.9$); and have *DS+DP* in frequencies under 30%.

A Ward clustering analysis groups the populations as shown in Figure 2. These similarities can also be viewed in Table 3, which shows Nei's genetic distances between populations. Nearby populations from same geomorphologic unit have distance values smaller than 0.10, while distances between populations in different units are above 0.20.

An exception to this general pattern is the population from Mata da Fazenda Santa Elisa-Costa e Silva (**CS07** and **CS08**), which shows a significant difference ($X^2 = 9.39$, d.f. = 4, $p < 0.05$) between collections in consecutive years (2007 and 2008). Moreover, in 2007 (**CS07**), this population groups with the Peripheral Depression cluster; and, in 2008 (**CS08**), it groups with the Atlantic Plateau cluster. In fact, this population is located right on the border between the two units (Fig. 1).

We performed the partial Mantel test to verify if the geographical differentiation was caused by the geomorphologic differences or by the effect of geographical distance. The observed correlations are:

1. between the genetic and geographical distances: a positive and significant correlation ($r = 0.513$; $p = 0.008$);
2. between the geomorphologic and genetic distances: a positive and significant correlation ($r = 0.534$; $p = 0.004$);
3. between the geomorphologic and geographical distances: a positive and non-significant correlation ($r = 0.063$; $p = 0.147$)
4. Partial Mantel test (among the three matrices): a positive and significant correlation ($r = 0.59$; $p = 0.008$).

We can conclude that both the geographical and geomorphological factors are correlated to the genetic differentiation of the populations. To quantify it, we performed a hierarchical F_{ST} .

The hierarchical F_{ST} analysis (Table 4) shows that, although the populations have a moderate degree of genetic structure ($F_{PT} = 0.11$), the variation observed between different geomorphologic unit is approximately two times bigger, 7.01% of the total variation, than the difference between populations within the same unit, only 3.60%. This result is consistent with the cluster analysis.

III.2. Clines and correlations

The correlations between inversion frequencies and latitude, longitude, altitude, average annual temperature, average annual precipitation and aridity index of the collecting sites are shown in Table 5. *DA* inversion is positively and significantly correlated to altitude ($r = 0.75$, $p = 0.012$); and negatively and significantly correlated with annual average temperature ($r = -0.78$, $p = 0.008$) and with the aridity index ($r = -0.66$, $p = 0.04$). *DS+DP* inversions show a different pattern. They are positively and significantly correlated with latitude, longitude and annual temperature mean ($r = 0.66$, $p = 0.037$; $r = 0.79$, $p = 0.007$; and $r = 0.68$, $p = 0.029$; respectively); yet, the arrangements are negatively and significantly correlated to altitude ($r = -0.71$, $p = 0.022$). *DI*, the other common inversion, shows a significant negative correlation with latitude and with longitude (respectively: $r = -0.89$, $p = 0.001$; $r = -0.86$, $p = 0.002$). At last, *OT* arrangements are positively and significantly correlated to longitude ($r = 0.64$, $p = 0.045$).

IV. Discussion

IV.1 Inversion Frequencies and Clustering Analysis

The dendrogram from the Ward clustering analysis (Fig. 2) summarizes the results, clearly showing three distinct groups: 1. Capivari (**CV**) - Santa Genebra (**SG**) – Fazenda Santa Elisa, Costa e Silva 2007 (**CS07**); 2. Parque Ecológico (**PE**) – Colinas do Atibaia (**CA**) – Costa e Silva 2008 (**CS08**) – Serra do Japi (**JP**); 3. Itatiaia (**IT**) – Teresópolis (**TE**) – Juiz de Fora (**JF**). These groups reflect quite well their location in the two geomorphologic units – Peripheral Depression and Atlantic Plateau. Overall, this pattern suggests that the variation among the inversion frequencies of the populations might represent a probable response to the various floristic or climatic differences observed between the two geomorphologic units. The only exception is the population from Costa e Silva (**CS07** and **CS08**), which is in a transition zone. In this case, the variation in frequencies observed between two consecutive years might be interpreted as a result of demographic factors (mainly migration from adjacent areas).

Argentinean populations of *D. buzzati* showed a highly structured pattern in inversion frequencies according to their location in specific phytogeographic regions (Hasson *et al.*, 1995). Rodriguez *et al.* (2000) analyzed the frequencies of the second chromosome inversions and seven allozyme loci differentially associated in seven natural populations of *D. buzzati*. They found

clines in two isozymes that could be explained by hitchhiking with the inversions, as well as two isozymes showing clines that were not due to hitchhiking and must be maintained by the action of natural selection.

IV.2 Longitudinal Cline

There are several cases describing altitudinal and latitudinal clines in *Drosophila* (Knibb 1982; Krimbas and Powell 2000; Ananina *et al.*, 2004; Hoffmann and Rieseberg 2008) and suggesting that the observed variation could be a consequence of the action of natural selection. However, longitudinal clines usually are not taken as a result of adaptive responses for climatic variables; they are often interpreted as consequences of historic events (Aulard *et al.*, 2002; Simaiakis and Milonas 2006; Samis *et al.*, 2008).

Our results suggest that the most common inversion arrangements may be responding to differences in climatic factors from different localities. Ananina *et al.* (2004) previously demonstrated significant correlations between the frequencies of *DA* (negative; $r = -0.91$) and *DS+DP* (positive; $r = 0.67$) inversions and the average temperature of the collecting month. Now we observed very similar correlation values for the same arrangements and average annual temperature for each location – negative for *DA* ($r = -0.78$) and positive for *DS+ DP* ($r = 0.68$). Surprisingly, we found significant correlations between *DI* and longitude ($r = 0.86$), as shown in Table 5. This gene arrangement presented no correlation with any environmental variable in our previous work (Ananina *et al.*, 2004), nor in this one. This may be interpreted as evidence that this inversion might be associated with biotic factors.

Dobzhansky (1947) showed a longitudinal clinal variation for three arrangements of *D. pseudoobscura* third chromosome (*Standard*, *Arrowhead* and *Pikes Peak*) in populations across western United States. The observed differences were interpreted as an adaptive response produced by natural selection to the environmental differences. After 40 years, Anderson *et al.* (1991) showed that the geographical pattern remained similar and locally stable; suggesting an adaptive response to local differences in climatic and biotic factors along a longitudinal gradient. Similarly, our results suggest that the observed geographical differentiation in the distribution of inversion frequencies among the populations of *D. mediopunctata* may be a result of adaptation

to local climatic or floristic variations, which may be correlated to longitude as one move inland from the coast.

Fernandez Iriarte *et al.* (2002) concluded that different evolutionary processes govern the microgeographical patterns of distribution of genetic variation in *D. buzzati*, depending on the genetic marker used. Schiffer *et al.* (2007) have shown low levels of genetic structuring caused by the fragmentation process, indicating strong influence of migration among Australian populations of *D. birchii*. For a complete understanding of how the fragmentation process is affecting this species, further studies with different genetic markers should be carried out to evaluate the joint effects of migration and genetic drift. For example, the distributions of inversion frequencies from Costa e Silva population have drastically changed from one year to other (**CS07** and **CS08**; $X^2 = 9,39$; d.f. = 4; $p < 0,05$). The causes of this change are unknown, but the fragment region is located just on the border of the two geomorphologic units (Fig. 1). So, in this case, the difference between years is probably due to casual oscillation and migration.

Overall, we must point out that further studies are needed using other genetic markers to characterize the genetic population structure and assess the importance of drift and migration among these populations.

Acknowledgments

The authors would like to thank Oscar Tanner Filho and Maria Aparecida P. Borba, from CEA Santo Antonio (Capivari, SP); Patricia Lia and Cynira Any J. S. Gabriel, from Fundação José Pedro de Oliveira – Reserva Mata Santa Genebra (Campinas, SP); Wilson Barbosa, Diretor do CEC, Fazenda Santa Elisa – IAC (Campinas, SP); Carmen Elias, Diretora do Parque Ecológico Ms. Emílio J. Salim (Campinas, SP); Angela Podolsky, from Condomínio Colinas do Atibaia (Campinas, SP); and Léo Nascimento, Coordenador de Pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ) for the authorizations granted for the field work. We are grateful to André V. Lucci Freitas and Fernando R. Matins for their insightful explanations on the biogeography of the area under study. We appreciate the technical help of Maria Salete Couto and Claudete Couto; and the help of Ayana B. Martins, Felipe Rocha, Diogo Moraes, Gustavo Mori, Prianda Laborda and Iuri M. Ventura in the field. Finally, we thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

References

- Ab'Saber, AN (1970). Províncias geológicas e domínios morfoclimáticos no Brasil. São Paulo: IGEO/USP. 26p (Geomorfologia, 20).
- Almeida, FFM de (1964). Fundamentos Geológicos do relevo paulista. São Paulo: Instituto de Geografia, Universidade de São Paulo. Bol IGG **41**: 167-263.
- Ananina G, Souza WN, Peixoto AA, Klaczko LB (2002). Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem Inst Oswaldo Cruz **97**: 691-694.
- Ananina G, Peixoto AA, Blanche-Mathé BC, Souza WN, da Silva LB, Valente VLS, Klaczko LB (2004). Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal and latitudinal variation. Genet Mol Biol **27**: 61-69.
- Anderson WW, Arnold J, Baldwin DG, Beckenbach AT, Brown CJ, Bryant SH, Coyne JA, Harshman LG, Heed WB, Jeffrey DE, Klaczko LB, Moore BC, Porter JM, Powell JR, Prout T, Schaeffer SW, Stephens JC, Taylor CE, Turner ME, Williams GO, Moore JA (1991). Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. Proc Natl Acad Sci **88**: 10367-10371.
- Arnold SJ (1981). Statistics of natural. I. Estimating an allele probability in cryptic fathers with a fixed number of offspring. Biometrics **37**: 495-504.
- Ashburner M (1989). *Drosophila*: A laboratory manual, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, p 31.
- Aulard S, David JR, Lemeunier F (2002). Chromosomal inversion polymorphism in Afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*. Genet Res **79**:49-63.
- Bächli G (2009). TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Database 2009/04; v1.03. Available at <http://taxodros.unizh.ch/>. Accessed on May 18, 2009.
- Balanyà J, Solé E, Oller JM, Sperlich D, Serra L (2004). Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. II. European populations. J Zool Syst Evol Res **42**: 191-201.
- Balanyà J, Oller JM, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L (2006). Global genetic change tracks global climatic warning in *Drosophila subobscura*. Science **313**: 1773-1775.
- Bitner-Mathé BC, Peixoto AA, Klaczko LB (1995). Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influences of chromosome inversions. Heredity **75**: 54-61.
- Bonnet E, Van de Peer Y (2002). zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. J Stat Softw **7**: 1-12.

- Brown Jr KS, Freitas AVL (2000). Atlantic forest butterflies: indicators for landscape conservation. *Biotropica* **32**: 934-956.
- Brown Jr KS, Freitas AVL (2002). Butterfly communities of urban forest fragments in Campinas, São Paulo, Brazil: Structure, instability, environmental correlates, and conservation. *J Insect Conserv* **6**: 217-231.
- Carvalho AB, Peixoto AA, Klaczko LB (1989). "Sex-ratio" in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **62**: 425-428.
- Cielo Filho R, Gneri MA, Martins FR (2007). Position on slope, disturbance, and tree species coexistence in a Seasonal Semideciduous Forest in SE Brazil. *Plant Ecol* **190**: 189-203.
- Cobb M, Huet M, Lachaise D, Veuille M (2000). Fragmented forests, evolving flies: molecular variation in African populations of *Drosophila teisieri*. *Mol Ecol* **9**: 1591-1597.
- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, Paterson AH, Stein L (2005). Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genet* **21**: 673-680.
- Dobzhansky T (1970). *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York, 505 pp.
- Dobzhansky T, Pavan C (1943). Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bol Fac Filo Ciên S Paulo* **36**: 7-72.
- Dobzhansky T (1947). Adaptive changes induced by natural selection in wild populations. *Evolution* **1**: 1-16.
- Etges WJ, Levitan M (2008). Variable evolutionary response to regional climate change in a polymorphic species. *Biol J Linn Soc* **95**: 702-718.
- Felsenstein J (1993). *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fernandez Iriarte P, Rodríguez C, Hasson E (2002). Inversion and allozyme polymorphism show contrasting patterns of microgeographic population structure in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *J Evol Biol* **15**: 226-234.
- Fonseca MG, Martini AMZ, Santos FAM (2004). Spatial structure of *Aspidosperma polyneuron* in two semi-deciduous forests in Southeast Brazil. *J Veg Sci* **15**: 41-48.
- Fonty E, Sarthou C, Larpin D, Ponge JF (2009). A 10-year decrease in plant species richness on a neotropical inselberg: detrimental effects of global warming? *Global Change Biol* **15**: 2360-2374. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.01923.x

- Hasson E, Rodríguez C, Fanara JJ, Naveira H, Reig AO, Fontdevila A (1995). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXI. Macrogeographic patterns of inversion polymorphism in New World populations. *J Evol Biol* **8**: 369-384.
- Hatadani LM, Baptista JC, Souza WN, Klaczko LB (2004). Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* **93**: 525-534.
- Hatadani LM, Klaczko LB (2008). Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica* **133**: 335-342.
- Hatadani LM, McInerney JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB (2009). Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and related groups (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* **51**: 595-600.
- Hobbs RJ, Yates CJ (2003). Impacts of ecosystems fragmentation on plant population: generalizing the idiosyncratic. *Aust J Bot* **64**: 471-488.
- Hoffmann AA, Sgrò CM, Weeks AR (2004). Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends Ecol Evol* **9**: 482-488.
- Hoffmann AA, Rieseberg LH (2008). Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst* **39**: 21-42.
- Keyghobadi N, Roland J, Matter SF, Strobeck C (2005). Among- and within-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation: an empirical demonstration. *Proc R Soc B* **272**: 553-560.
- Keyghobadi N (2007). The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Can J Zool* **85**: 1049-1064.
- Klaczko LB (2006). Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* **126**: 43-55.
- Knibb WR (1982). Chromosome inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* II. Geographic clines and climatic associations in Australasia, North America and Asia. *Genetica* **58**: 213-221.
- Krimbas CB, Powell JR (2000). Inversion polymorphism in *Drosophila*. In: Singh RS, Krimbas CB (eds) *Evolutionary genetics: from molecules to morphology*. v. 1. Cambridge University Press 2000, pp 284-299.
- Laurance WF (2008). Theory meets reality: How habitat fragmentation research has transcended island biogeographic theory. *Biol Conserv* **141**: 1731-1744.
- Mayer C, Schiegg K, Paschineli G (2009). Patchy population structure in a short-distance migrant: evidence from genetic and demographic data. *Mol Ecol* **18**: 2353-2364.

- McAllister BF, Sheeley SL, Mena PA, Evans AL, Schlötterer C (2008). Clinal distribution of a chromosomal rearrangement: a precursor to chromosomal speciation? *Evolution* **62**: 1852-1865.
- Mestre F, Balanyà J, Pascual M, Concepció A, Gilchrist GW, Huey RB, Serra L (2009). Evolution of Chilean colonizing population of *Drosophila subobscura*: lethal genes and chromosomal arrangements. *Genetica* **136**: 36-48.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290.
- Peixoto AA, Klaczko LB (1991). Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila*. *Genetics* **129**: 773-777.
- Pinto HS (1992). Clima da Serra do Japi. In: Morelato LPC (ed), História natural da Serra do Japi Editora da UNICAMP, Campinas, p.30-38.
- Rasic G, Stamenkovic-Radak M, Savic T, Andjelkovic M (2007). Inbreeding reveals interpopulation differences in inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *J Zool Syst Evol Res* **46**: 31-37.
- Rieseberg LH (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* **16**: 351-358.
- Rodríguez C, Piccinali R, Levy E, Hasson E (2000). Contrasting population genetic structures using allozymes and the inversion polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *J Evol Biol* **13**: 976-984.
- Saavedra CC, Callegari-Jacques SM, Napp M, Valente VLS (1995). A descriptive and analytical study of Neotropical drosophilid communities. *J Zool Syst Evol Res* **33**: 62-74.
- Salis SM, Shephard GJ, Joly CA (1995). Floristic comparison of mesophytic semideciduous forests of the interior of the state of São Paulo, Southeast Brazil. *Vegetatio* **119**: 155-164.
- Samis KE, Heath KD, Stinchcombe JR (2008). Discordant longitudinal clines in flowering time and *Phytochrome C* in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **62**: 2971-2983.
- Schaeffer SW (2008). Selection in heterogeneous environments maintains the gene arrangement polymorphism of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*. **62**: 3082-3099.
- Schiffer M, Kennington WJ, Hoffmann AA, Blacket MJ (2007). Lack of genetic structure among ecologically adapted populations of an Australian rainforest *Drosophila* species as indicated by microsatellite markers and mitochondrial DNA sequences. *Mol Ecol* **16**: 1687-1700.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000). Arlequin ver 2.000: A software for population genetics analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sperlich D, Pfüriem P (1986). Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr, JN (eds) The genetics and biology of *Drosophila*. v.3a. Academic Press, New York, pp 123-168.

- Stanton S, Honnay O, Jacquemyn H, Rodán-Ruiz I (2009). A comparison of the population genetic structure of parasitic *Viscum album* from two landscapes differing in degree of fragmentation. *Plant Syst Evol* **281**: 161-169.
- Stuchbury BJM (2007). The effects of habitat fragmentation on animals: gaps in our knowledges. *Can J Zool* **85**: 1015-1016.
- Simaiakis S, Mylonas M (2006). Intraspecific variation in segment number in *Pachymerium ferrugineum* (C. L. Koch, 1835) (Chilopoda:Geophilomorpha) in the south Aegean Archipelago (north-east Mediterranean, Greece). *Biol. J Linn Soc* **88**: 533-539.
- Suzuki R, Shimodaira H (2006). pvcust: Hierarchical clustering with p-values via multiscale bootstrap resampling. R package version 1.2-0. Available at: accessed on May 5, 2009.
- Tidon-Sklorz R, Sene FM (1995). Evolution of the Buzzatii cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evol Biol* **8**: 71-85. a
- Tidon R (2006). Relationships between drosophilids (Diptera, drosophilidae) and the environment on two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linn Soc* **87**: 233-248.
- Val FC, Vilela CR, Marques MD (1981). Drosophilidae of the Neotropical region. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds) *The genetics and biology of Drosophila*, Vol. 3^a, Academic Press, New York. , pp. 123-168
- Vilela CR, Bächli G (2000). Five new species of Neotropical *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Bull Soc Entomol Suisse* **73**: 49-65.
- Whitmore TC (1997). Tropical forest disturbance, disappearance and species loss. In: WF Laurance and RO Bierregard (eds), *Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 3-12.
- Zellmer AJ, Knowles LL (2009). Disentangling the effects of historic vs. contemporary landscape structure on population genetic divergence. *Mol Ecol* **18**: 3593-3602.

TABLES

Table 1 – Geographic and climatic variables from the collected sites.

Geomorphologic Unit	Site	Date	Latitude	Longitude	Area (ha)	Annual Temperature Mean (°C)	Annual Precipitation Mean (mm)
Peripheral Depression	CV	October 14-16, 2008	23.03°	47.47°	15	22.0	1144
	SG	July 22-24, 2008.	22.82°	47.12°	250	22.3	1411
	CS	April 23-27, 2007.	22.87°	47.07°	14	22.3	1413
		June 3-6, 2008.					
Atlantic Plateau	PE	October 4-11, 2006.	22.91°	47.02°	3	21.6	1488
		May 26-28, 2008.					
	CA	February 23-25, 2005.	22.83°	46.93°	245	21.0	1487
		September 28–October 2, 2005.					
		August 21-23, 2008.					
	JP	Data from Ananina <i>et al.</i> (2004)	23.25°	46.96°	19700	19.5	1501
	IT	June 1-4, 2007.	22.46°	44.60°	30000	19.7	1830
		February 22-26, 2008.					
		November 19-24, 2008.					
		Mars 10-13, 2009.					
		May 30-June 2, 2009.					
	JF	July 2-3, 2009.	21.75°	43.32°	277	20.6	1402
	TE	August 10-14, 2009.	22.45°	43.00°	24024	19.9	1316
		September 24, 2009.					

(**CV**: Capivari; **SG**: Mata Santa Genebra; **CS**: Costa e Silva; **PE**: Parque Ecológico; **CA**: Colinas do Atibaia ; **JP**: Serra do Japi; **IT**: Itatiaia; **JF**: Juiz de Fora; **TE**: Teresópolis).

Table 2 – Inversion frequency distribution (values expressed as percentage; 2N: number of chromosomes analyzed; *OT* – other inversions).

Population	<i>DA</i>	<i>DI</i>	<i>DS + DP</i>	<i>OT</i>	2N
CV	25.0	6.5	55.5	13.0	216
SG	22.9	5.3	59.9	11.9	78
CS07	26.8	11.0	53.7	8.5	82
CS08	45.5	14.8	31.1	8.6	222
PE	41.2	17.7	24.8	16.3	238
CA	41.3	15.6	27.8	15.3	424
JP	56.3	9.2	24.2	10.3	368
IT	51.6	23.7	18.3	6.4	898
JF	41.4	43.1	5.2	10.3	58
TE	56.7	26.1	12.8	4.4	180
Total	2764				

(**CV**: Capivari; **SG**: Mata Santa Genebra; **CS**: Costa e Silva; **PE**: Parque Ecológico; **CA**: Colinas do Atibaia ; **JP**: Serra do Japi; **IT**: Itatiaia; **JF**: Juiz de Fora; **TE**: Teresópolis).

Table 3 – Nei's genetic distances matrix.

Population	CV	SG	CS07	CS08	PE	CA	JP	IT	JF
SG	0.015								
CS07	0.006	0.011							
CS08	0.163	0.080	0.129						
PE	0.209	0.105	0.179	0.017					
CA	0.169	0.080	0.144	0.010	0.002				
JP	0.351	0.227	0.315	0.046	0.065	0.061			
IT	0.393	0.239	0.324	0.041	0.039	0.049	0.051		
JF	0.668	0.444	0.542	0.195	0.154	0.186	0.269	0.077	
TE	0.530	0.338	0.441	0.080	0.075	0.091	0.065	0.006	0.069

(**CV**: Capivari; **SG**: Mata Santa Genebra; **CS**: Costa e Silva; **PE**: Parque Ecológico; **CA**: Colinas do Atibaia ; **JP**: Serra do Japi; **IT**: Itatiaia; **JF**: Juiz de Fora; **TE**: Teresópolis).

Table 4 – Hierarquical Fst.

Source of Variation	d.f.	Sum of Squares	Variance Component	Variation (%)
Among Geomorfologic Units	1	23.14	0.03	7.01
Among Populations Within Geomorphologic Units	8	28.55	0.01	3.60
Within Populations	2750	880.87	0.32	89.39
Total	2759	936.56	0.36	100.00

Fixation Indices

F_{PR} : 0.039F_{PT} : 0.106F_{RT} : 0.070

Table 5 – Pearson’s correlation (r) between inversion frequencies (after angular transformation) and latitude, longitude, altitude, average annual temperature, precipitation and aridity index.

	<i>DA</i>	<i>DI</i>	<i>DS + DP</i>	<i>OT</i>
Latitude	-0.16	-0.89***	0.66*	0.34
Longitude	-0.53	-0.86**	0.79**	0.64*
Altitude	0.75*	0.50	-0.71*	-0.38
Temperature	-0.78**	-0.49	0.68*	0.57
Precipitation	0.42	0.23	-0.31	-0.19
Aridity Index	-0.66*	-0.39	0.54	0.34

* p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1

Fig 1. Map of the studied region and the distribution of the inversion frequencies of each collected site: **CV** - Mata da Fazenda Santo Antônio (**Capivari** – SP); **SG** - Mata **Santa Genebra** (Campinas – SP); **CS** - Mata da Fazenda Santa Eliza-**Costa e Silva**, IAC (Campinas – SP); **PE** - **Parque Ecológico** Ms. Emílio José Salim (Campinas – SP); **CA** - Mata do Ribeirão Cachoeira-**Colinas do Atibaia** (Campinas – SP); **JP** - Reserva Municipal da **Serra do Japi** (Jundiaí – SP); **IT** - Parque Nacional do **Itatiaia** (Itatiaia – RJ); **JF** – Reserva Municipal do Poço D’Anta (**Juiz de Fora** – MG); **TE** – Parque Nacional das Serra dos Órgãos (**Teresópolis** – RJ). Figure drawn based on the map published by Almeida (1964) and Ab’Saber (1970). Note: for Costa e Silva population (**CS**) there are two graphs corresponding to the two collections carried out there.

Figure 2

Fig. 2. Dendrogram of the Clustering Analysis using Ward’s algorithm method based on Single Euclidian Distance from the observed frequencies of the II chromosome inversions of *D. mediopunctata*. (**CV**: Capivari; **SG**: Mata Santa Genebra; **CS07** and **CS08**: Costa e Silva, 2007 and 2008 samples; **PE**: Parque Ecológico; **CA**: Colinas do Atibaia ; **JP**: Serra do Japi; **IT**: Itatiaia; **JF**. Juiz de Fora; **TE**: Teresópolis). This is not a phylogeny, it is just a similarity dendrogram.

FIGURE 1

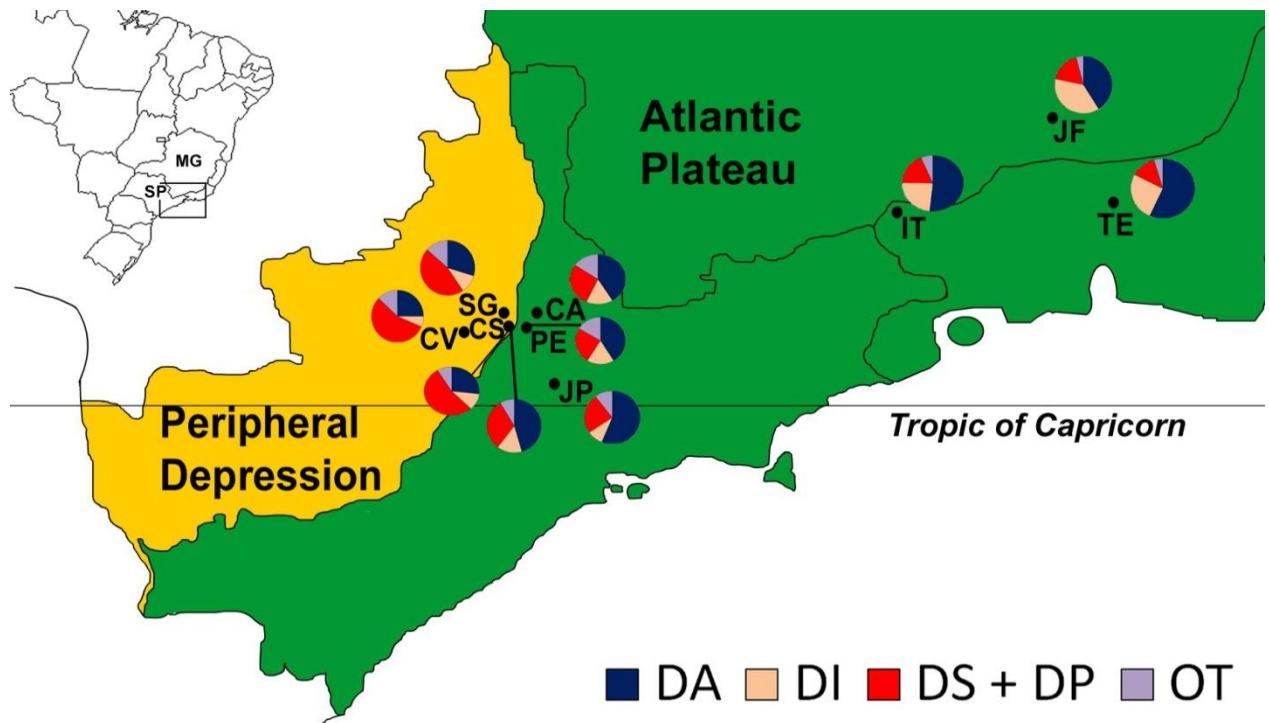
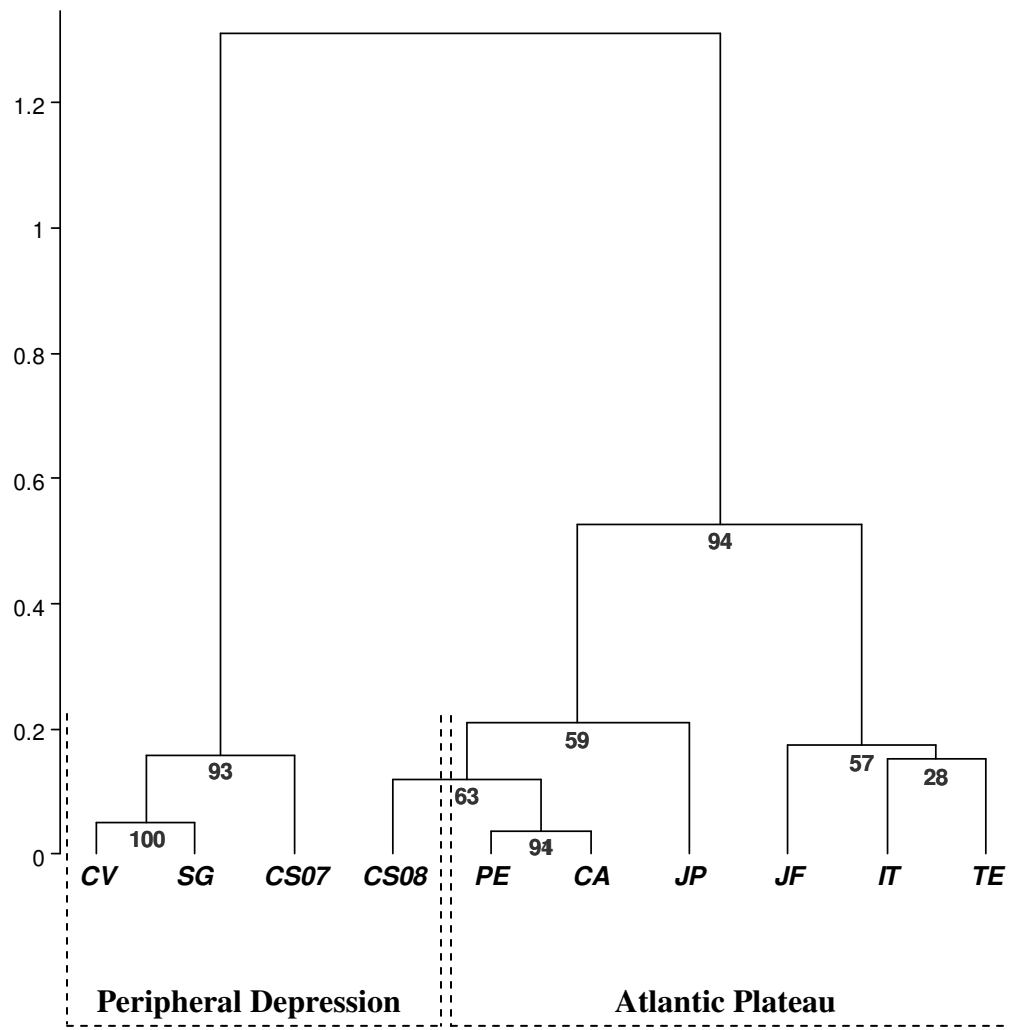


Figure 2



Capítulo 3

Fotomapa dos Cromossomos politênicos de *Cochliomyia hominivorax*.

Photographic map of the polytene chromosomes of *Cochliomyia hominivorax*

M. R. D. BATISTA¹, G. ANANINA¹, A. M. L. AZEREDO-ESPIN^{1,2}
and L. B. KLACZKO¹

¹Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil and ²Laboratório Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brazil

Abstract. *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) is one of the most important myiasis-causing flies and is responsible for severe economic losses to the livestock industry throughout the Neotropical region. A polytene chromosome map is an invaluable tool for the genetic analysis and manipulation of any species because it allows the integration of physical and genetic maps. *Cochliomyia hominivorax* has a diploid number of 12 chromosomes ($2n = 12$): five pairs of autosomes and one pair of sex chromosomes (XX/XY), which do not polytenize. We created a new photomap of the polytene chromosomes of *C. hominivorax* describing its five autosomes (chromosomes 2–6). Pupal trichogen cells, which have chromosomes with a high degree of polytenization, were used to elaborate this map. The photomap was made by comparing 20 different nuclei and choosing, for each chromosome segment, the region with the highest resolution. Thus, we present a new photomap of the five autosomes of this species, with a total resolution of 1450 bands.

Key words. *Cochliomyia hominivorax*, photomap, polytene chromosomes.

Introduction

A cytogenetic map is an invaluable tool for the genetic analysis and manipulation of any species, as it allows the integration of physical and genetic maps. The polytene chromosomes of Diptera have proved to be an especially favorable material because they allow for the identification of hundreds of bands in a single chromosome. Painter (1933) was the first to use them for preparing maps of *Drosophila* chromosomes using the squashing technique. In 1935, Bridges set up a system to assemble polytene chromosome maps. He divided the five main chromosome arms of *Drosophila melanogaster* into 100 divisions and two extra divisions for the small dot fourth chromosome. After successive revisions, he was able to distinguish a total of 2650 bands (e.g. Bridges, 1935, 1942; Zhimulev, 1996).

Polytene chromosome maps may be used to identify with precision chromosome rearrangements in order to differentiate geographical races and species, detect the action of natural selection and make phylogenetic inferences (Sperlich & Pfriem, 1986; Anderson *et al.*, 1991; Krimbas & Powell, 1992). They

can also be used to carry out fluorescence *in situ* hybridization (FISH), to determine the exact location of nuclear genes and allow them to be cloned (Saunders *et al.*, 1989; Grushko *et al.*, 2004; Mahjoubi *et al.*, 2006).

The New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*, and the human bot fly, *Dermatobia hominis* (Linnaeus in Pallas), are considered the most important agents of traumatic myiasis in the Neotropics (Zumpt, 1965; Guimarães *et al.*, 1983). Larvae of *C. hominivorax* are obligate ectoparasites that can infest almost all warm-blooded vertebrates, particularly livestock. Because of the substantial economic losses caused by this species and its influence on the trade of live animals among infested and non-infested countries, an international effort has been devoted to its eradication from endemic areas of Central America (Wyss, 2000), as well as to preventing invasions into screwworm-free areas (Lindquist *et al.*, 1992). The identification of target populations and an understanding of their genetic variability can improve the effectiveness of eradication programmes.

A number of studies on the nuclear and mitochondrial genome of *C. hominivorax* have been carried out (Lessinger *et al.*, 2000;

Correspondence: Louis Bernard Klaczko, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), C.P. 6109, Campinas, CEP 13083-970, São Paulo, Brazil.
Tel.: + 55 19 3521 1150; Fax: + 55 19 3521 6235; E-mail: lbk@unicamp.br

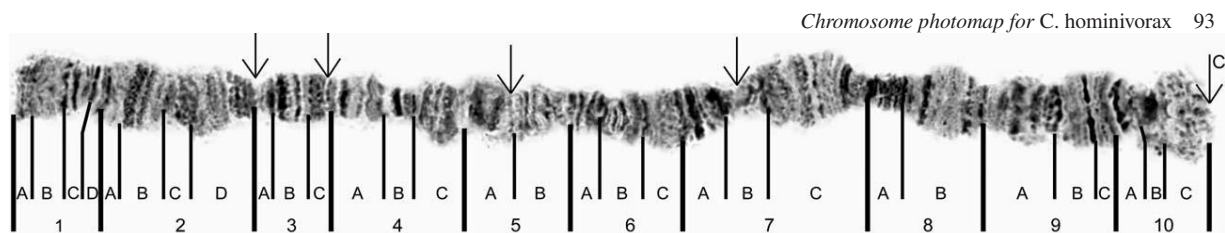


Fig.1. Photomap of chromosome 2L. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

Torres *et al.*, 2004; Lyra *et al.*, 2005; for a detailed review see: Azeredo-Espin & Lessinger, 2006). Although a preliminary photomap of the polytene chromosomes of this species was published (Dev *et al.*, 1985, 1986) with encouraging results, a photomap of higher resolution is required.

Materials and methods

Samples of *C. hominivorax* were collected primarily from Brazil and Argentina, where this species is highly abundant. Additional specimens were obtained from Venezuela and Uruguay and colonies were established in the laboratory. Because the salivary gland polytene chromosomes of *C. hominivorax* have a low degree of polyteny, the cytological preparations were made from trichogen cells from the scutellum of the pupae.

Methods were adapted from Dev *et al.* (1985) and Gariou-Papalexioi *et al.* (2002). Puparium were removed from 5-day-old pupae reared at 24 °C, and were fixed overnight at 4 °C in fresh Carnoy's fixative. To prepare the slides, the abdomen and first cuticular external layer of each pupa were removed in absolute ethanol. Then, the scutellum was dissected and transferred to a drop of acetic acid (60%) on a coverslip. The scutellum tissue was carefully separated from the second chitinous layer. A drop of lacto-acetic orcein stain was put on the material immediately and left for 5–10 min. A slide was then slowly placed on top of the coverslip, turned over and gently tapped to spread the chromosomes. The preparation was squashed under an absorbent paper and sealed with nail polish.

The slides were photographed with Cool SNAP-Pro (Color) using a Nikon Eclipse E800 microscope (1000×). They were then digitized using the software Image Pro-Plus Version 4.1 and finally edited in Corel Photopaint Version 9 and Adobe Photoshop Version 7.0.1. The photomap of each chromosome was made by comparing at least 20 different nuclei. For each chromosome segment, the region which presented the highest degree of resolution was chosen to make the map.

Results

Cochliomyia hominivorax has a diploid number of 12 chromosomes ($2n = 12$): five pairs of autosomes and a pair of sex chromosomes (XX/XY), which do not polytenize (Dev *et al.*, 1985, 1986). Thus, a photomap of the polytene chromosomes of *C. hominivorax* must describe its five autosomes (chromosomes 2–6).

The polytene chromosomes of *C. hominivorax* are frequently found fragmented because of the presence of weak spots, as well as the centromere; these can be consistently mapped. The second chromosome is the longest and is metacentric, with seven weak spots. Its two arms, 2L and 2R, show 192 and 155 bands, respectively. The third chromosome is the second longest metacentric chromosome; its arms show 151 (3L) and 157 (3R) bands. It has few weak spots and large unfragmented pieces are frequently observed. The fourth chromosome shows the smallest number of weak spots – only two were observed and it can be seen intact. The left and right arms show 137 and 139 bands, respectively. Although the fifth chromosome is small, it shows eight weak spots. The left arm shows 138 bands and the right 134. The sixth chromosome is submetacentric and its left and right arms show 174 and 73 bands, respectively. It has five weak spots.

Each arm of the chromosomes has a characteristic band sequence and particular landmarks which allow them to be differentiated and identified. These landmarks are: distal and proximal endings; puffs, and weak spots. The divisions we used for this map are the same as those used in the previous map (Dev *et al.*, 1986).

Chromosome descriptions

Chromosome 2L (Fig. 1). The main landmark of this arm is its proximal region. This region begins with puff 8A followed immediately by two other puffs (8B and 9A), with a very thick, darkly stained band at the end. Two other characteristic regions

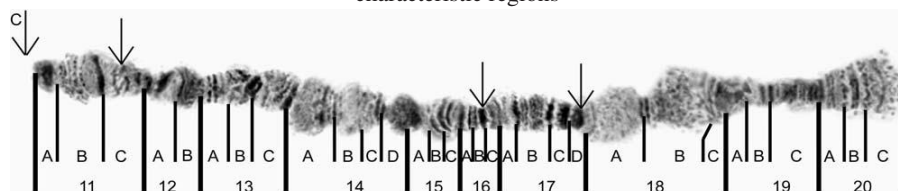


Fig.2. Photomap of chromosome 2R. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

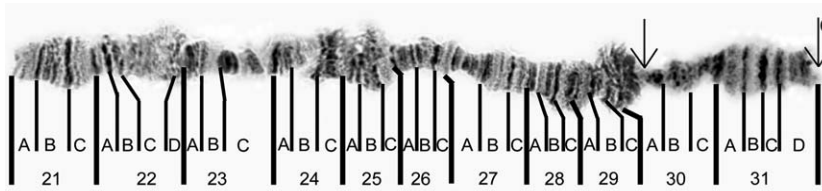


Fig. 3. Photomicrograph of chromosome 3L. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

are: puff 4C, with a dark thick band, and division 10, with a rectangular big band and a crown of uncondensed chromatin (the centromeric region). There are four weak spots in this chromosome arm located at 2B–C, 3C, 4C and 7C.

Chromosome 2R (Fig. 2). The proximal region begins with a dark squared band, which is followed by an easily recognizable sequence of bands. Division 14 is a good landmark for this arm. There are two puffs in division 18 that are also very evident. Finally, the distal region is marked by a thick band in 19 and a series of bands in 20, which culminate in a larger, rectangular puff with a free end (20C). The three weak spots of this arm are in divisions 11C, 16B and 17D.

Chromosome 3L (Fig. 3). This arm is characterized by three particular regions: the distal region (21), a pear-shaped puff with three bands; puff 29C next to 30A, the only breakpoint on this arm, and a large puff in the proximal region with five bands (31A–31D). It is common to find fragments of this arm, including stretches from 21 up to 29C.

Chromosome 3R (Fig. 4). The proximal region of this arm has a series of puffs, two in division 32, one in 33 and one more in 34. They are split by a constriction in division 32D, immediately after four clear bands. Although it is rich in bands, this region is frequently observed with its structure uncondensed and disorganized. Two other segments can also be used as landmarks: puff 36 and the distal region (38, 39 and 40), which are both very rich in bands. There are two weak spots: in divisions 34B and 36C.

Chromosome 4L (Fig. 5). This arm is easily identified by the following landmarks: the distal region (41A–C), which shows evident bands, especially those from division 41C; the puff at 42B, just after the distal region, and the breakpoint located at 43C–D, which is frequently observed. The puffs located in division 46 and between 47C and 48C represent other useful landmarks. The second breakpoint is located in division 49C, but in many preparations whole stretches ranging from 43C to the centromere can be seen.

Chromosome 4R (Fig. 6). This arm is peculiar in that it does not have a breakpoint and thus is observed in one piece in most preparations. The main landmark, the proximal region, is made up of two similar puffs (52 and 53) split by a constricted region. Another landmark is the puff in division 56, which shows as a bright region between two darkly stained bands. There is also the distal region, division 60, which shows an oval puff with four evident bands in which the telomere dot is always present.

Chromosome 5L (Fig. 7). This chromosome arm can be identified by two landmarks: the distal region of division 61, which shows a very characteristic fan-like structure with clear bands, and the puff that begins in division 68C and runs to the centromeric division, 70C, where there are two dark bands with crowns of expanded chromatin. The latter is, perhaps, the best landmark of the chromosome. It has three weak spots (63C, 64C and 65C).

Chromosome 5R (Fig. 8). This chromosome arm shows a large number of weak spots, five in total, located in divisions 73A, 74A, 75A, 76B and 78C. However, the arm still presents a distinctive structure that allows its identification. Its main landmark is the proximal region, with two puffs, the first smaller and darker (71), and the second a bright region between thick dark bands (72). Another useful landmark is a large puff, rich in bands, that ranges from division 76C up to 78A. The distal region (80) is also a good landmark thanks to the tip, division 80C (a thick, dark band topped with a degranulated, clear, fan-like area), which follows a well-banded region (division 79).

Chromosome 6L (Fig. 9). This is the longest chromosome arm and it shows five weak spots (83A, 85C, 86C, 90C and 92A). Its main landmark is the distal region (81, 82 and 83), which has four puffs followed by characteristic bands. Other landmarks are: the puffs in divisions 86 and 87, which are very similar but are split by a constriction (87A); a large puff – which may appear unpaired in some preparations – between divisions 89A and 90C, and, finally, the proximal region of this

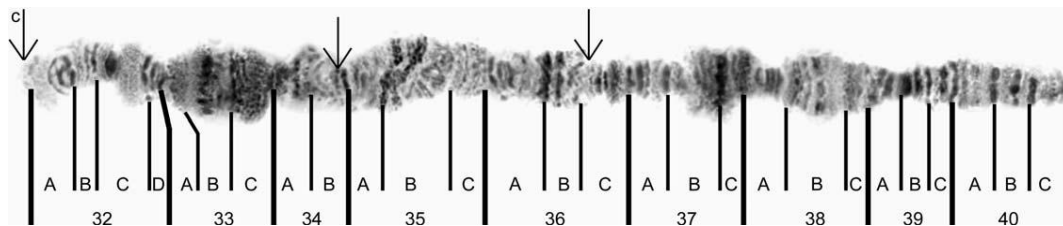


Fig. 4. Photomicrograph of chromosome 3R. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

Fig.5. Photomap of chromosome 4L. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

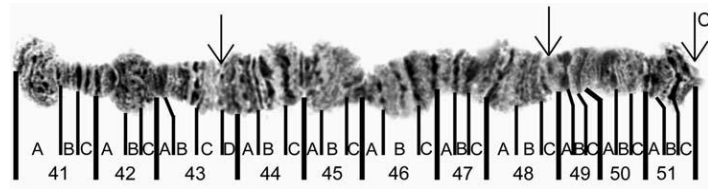


Fig.6. Photomap of chromosome 4R. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

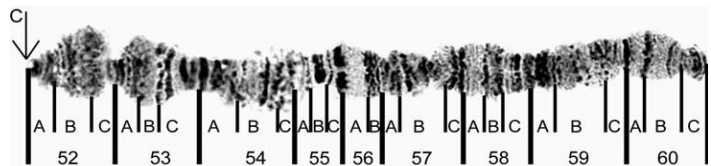


Fig.7. Photomap of chromosome 5L. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

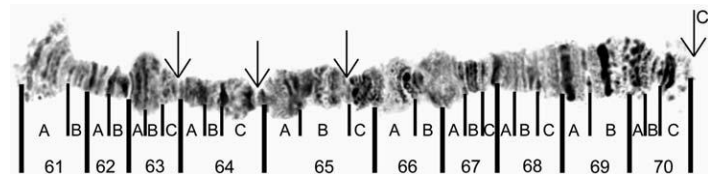


Fig.8. Photomap of chromosome 5R. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

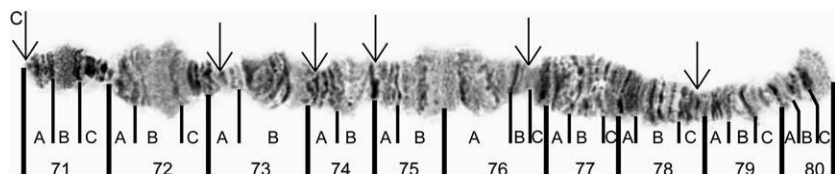
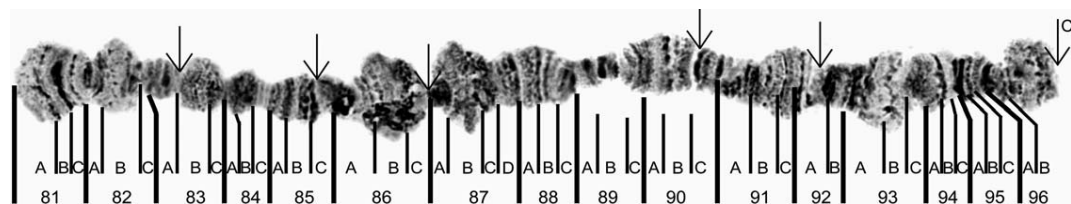


Fig.9. Photomap of chromosome 6L. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.



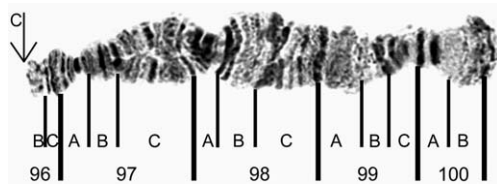


Fig. 10. Photomap of chromosome 6R. Arrows show the weak spots. Arrow C points to the centromere.

chromosome, which is not well banded and not very well structured.

Chromosome 6R (Fig. 10). This is the smallest chromosome arm. It is easily recognized by the four darkly banded puffs of which it is composed, and by the bands in divisions 97C, 98A–C and 99C–100A. The main landmark is the distal region, which looks like a rose bouquet. This arm shows no weak spot and is often found intact.

Discussion

Polytene chromosome maps usually have between 1500 and 5000 bands, depending on the technique used (Zhimulev, 1996). This photomap is just under the lower limit (1450 bands). As the sex chromosomes do not polytenize – they generally appear in preparations as uncondensed chromatin bodies – we expected the map to have fewer than the typical number of bands. Thus, this map can be considered to have a resolution comparable with those published in the Diptera literature. It represents an improvement over the preliminary map (Dev et al., 1986), but it should be used as a step towards an enhanced map with even higher resolution.

The large number of weak spots (25) visible as constrictions or chromosome breaks in cytological preparations was of some interest. It is noteworthy that this was first pointed out by Dev et al., (1986), who observed approximately the same weak spots as we report in the current study. It may be worth investigating their origin and nature. Although these weak spots may only represent regions rich in heterochromatin, it is possible that they represent interesting genetic phenomena such as those recently found in *D. melanogaster* (for details, see: Zhimulev et al., 2003; Belyaeva et al., 2006; Gvozdev et al., 2007).

Acknowledgements

We thank Maria Salete do Couto Campos for technical help. We also thank Professor Dr Áureo Tatsumi Yamada for making photomicrographic facilities available. This work was supported by grants from the International Atomic Energy Agency (IAEA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) and Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP-UNICAMP).

Conflicts of interest

All authors declare no conflicts of interests.

References

- Anderson, W.W., Arnold, J., Baldwin, D.G. et al., (1991) Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 10367–10371.
- Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica*, **126**, 111–131.
- Belyaeva, E.S., Demakov, A.S., Pokholkova, G.V., Alekseyenko, A.A., Kolesnikova, T.D. & Zhimulev, I.F. (2006) DNA under-replication in intercalary heterochromatin regions in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* correlates with the formation of partial chromosomal aberrations and ectopic pairing. *Chromosoma*, **115**, 355–366.
- Bridges, C.B. (1935) Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity*, **26**, 60–64.
- Bridges, C.B. (1942) A new map of the salivary gland 2L-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity*, **33**, 402.
- Dev, V., Lachance, L.E. & Whitten, C.J. (1985) Polytene chromosomes of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Journal of Heredity*, **76**, 132–133.
- Dev, V., Lachance, L.E. & Whitten, C.J. (1986) Polytene chromosomes, karyotype correlations, and population cytology of the primary screwworm fly. *Journal of Heredity*, **77**, 427–434.
- Gariou-Papalexioi, A., Yannopoulos, G., Zacharopoulou, A. & Gooding, R.H. (2002) Photographic polytene chromosome maps for *Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae): cytogenetic analysis of a colony with sex ratio distortion. *Genome*, **45**, 871–880.
- Grushko, O.G., Sharakhova, M.V., Shevshenko, A.I., Karagodin, D.A., Karamsyheva, T.V., Rubtsov, N.B. & Stigin, V.N. (2004) Characterization and comparative analysis of DNA from the pericentric heterochromatin of the chromosome 2 of *Anopheles atroparvus* V. Tiel (Culicidae, Diptera). *Russian Journal of Genetics*, **40**, 1085–1094.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. & Prado, A.P. (1983) As Míases na Região Neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Rev Bras Zool*, **1**, 239–416.
- Gvozdev, V.A., Yu Abramov, A., Kogan, G.L. & Lavrov, S.A. (2007) Distorted heterochromatin replication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes as a result of euchromatin–heterochromatin rearrangements. *Russian Journal of Genetics*, **43**, 12–19.
- Krimbas, C.B. & Powell, J.R. (1992) *Drosophila Inversion Polymorphism*, pp. 1–52. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lessinger, A.C., Junqueira, A.C.M., Lemos, T.A. et al., (2000) The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Molecular Biology*, **9**, 521–529.
- Lindquist, D.A., Abusowa, M. & Hall, M.J. (1992) The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Medical and Veterinary Entomology*, **6**, 2–8.
- Lyra, M.L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2005) Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, **42**, 589–595.
- Mahjoubi, F., Hill, R.J. & Peters, G.B. (2006) Chromosome microdissection identifies genomic amplifications associated with drug resistance in leukaemia cell line: an approach to understanding drug resistance in cancer. *Chromosome Research*, **14**, 263–276.

- Painter, T.S. (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science*, **78**, 585–586.
- Saunders, R.D.C., Glover, D.M., Ashburner, M. *et al.*, (1989) PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Research*, **17**, 9027–9037.
- Sperlich, D. & Pfriem, P. (1986) Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. *The Genetics and Biology of Drosophila* (ed. by M. Ashburner, H. L. Carson & J. N. Thompson Jr), Vol. 3a, pp. 123–168. Academic Press, New York, NY.
- Torres, T.T., Brondani, R.P.V., Garcia, J.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2004) Isolation and characterization of microsatellite markers in the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, **4**, 182–184.
- Wyss, J.H. (2000) Screwworm eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Science*, **916**, 186–193.
- Zhimulev, I.F. (1996) Morphology and structure of polytene chromosomes. *Advances in Genetics*, **34**, 1–490.
- Zhimulev, I.F., Belyaeva, E.S., Makunin, I.V. *et al.*, (2003) Influence of the *SuUR* gene on intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*, **111**, 377–398.
- Zumpt, F. (1965) *Myiasis in Man and Animals in the Old World*, 267 pp. Butterworths, London.

Accepted 15 October 2008 © 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 The Royal Entomological Society,
Medical and Veterinary Entomology, **23** (Suppl. 1), 92–97

Conclusão Geral

Embora acredite-se que os impactos do aquecimento global nos trópicos sejam menores do que os observados nas regiões temperadas e árticas, alterações no sentido de aumento da temperatura com o passar dos anos foram observadas na região do Parque Nacional do Itatiaia (Tmáx: $r = 0,63$; $p < 0,01$. Tméd: $r = 0,84$; $p < 0,01$. Tmín: $r = 0,92$; $p < 0,01$); o que está de acordo com as considerações do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC).

Os estudos de inversões cromossômicas em populações naturais de *Drosophila mediopunctata* revelam padrões de variação consistentes com os observados anteriormente e padrões inesperados; reiterando a complexidade de sua evolução.

Mudanças significativas nas frequências médias de inversões do cromossomo II na população de *D. mediopunctata* do Parque Nacional do Itatiaia foram observadas ($X^2 = 31,9$; $p < 0,001$). Houve um inesperado aumento da frequência de *DI* e diminuição dos arranjos *DS* e *DP*. No entanto, o ciclo estacional para os arranjos *DA*, *DS* e *DP* se mantém (*DA* aumenta de frequência nos meses mais frios, *DS* e *DP* têm padrão oposto).

As mudanças observadas nas frequências de inversões cromossômicas nos últimos 20 anos podem estar refletindo alterações:

1. em fatores climáticos subjacentes.
2. na flora e nas relações ecológicas, em decorrência de:
 - a) políticas de preservação do Parque.
 - b) mudança climática.
3. no conteúdo genético de cada inversão.
4. da estrutura demográfica da população.

Futuras análises usando marcadores genéticos diferentes podem elucidar a que fatores as mudanças observadas nas frequências das inversões cromossômicas estão ligadas. Investigações macrogeográficas também podem contribuir para a resolução desta questão.

Em coletas realizadas nestes e em outros fragmentos da região metropolitana de Campinas, foram observadas diferenças marcantes nas distribuições das frequências de inversões cromossômicas de *D. mediopunctata*, apesar da proximidade geográfica. Sendo assim, pode-se concluir que os determinantes da variação geográfica do polimorfismo de inversões cromossômicas de *Drosophila mediopunctata* nos fragmentos florestais da região de Campinas

podem estar relacionados a ação da seleção natural em resposta às variações florísticas ou climáticas locais.

Apesar de clines longitudinais não indicarem sempre respostas adaptativas para diferentes caracteres, é inegável que há uma forte diferenciação entre os diferentes ambientes analisados. Portanto, é preciso realizar novas investigações para poder avaliar os efeitos históricos e demográficos na formação deste gradiente. Assim, não podemos descartar o efeito da migração e da deriva genética sobre estas populações. Dessa forma, convém usar outros marcadores genéticos para avaliar como as diferentes forças evolutivas estão influenciando a dinâmica desta espécie nestas populações.

A preparação de um fotomapa dos cromossomos politênicos de *Cochliomyia hominivorax* dispõe para esta espécie uma ferramenta poderosa para estudos genéticos. Em geral mapas de cromossomos politênicos têm entre 1500 e 5000 bandas, dependendo da técnica utilizada. O fotomapa proposto apresenta uma resolução de 1450 bandas, próximo ao limite inferior. Como os cromossomos sexuais não se politenizam, um mapa de boa resolução para esta espécie deve ter número de bandas menor que o usual. Deste modo, este mapa pode ser considerado como tendo uma resolução comparável àqueles publicados na literatura de Díptera. Ele representa uma melhoria sobre o mapa preliminar (Dev *et al.*, 1986), mas deve ser usado como um passo no sentido de um mapa com resolução maior ainda. O grande número de pontos fracos (25) visíveis como constrições, pausas ou quebras dos cromossomos em preparações citológicas tem algum interesse. É de salientar que este foi o primeiro fato apontado por Dev *et al.* (1986), que observaram aproximadamente os mesmos pontos fracos que nós relatamos no presente estudo. Além disso, a investigação de sua origem e natureza pode revelar-se uma questão com resultados frutíferos e interessantes.

Bibliografia Geral

- Ab'Saber AN (1956). "A terra paulista". *Boletim Paulista de Geografia* **23**.
- Ab'Saber AN (2009). A propósito da periodicidade climato-hidrológica que vem provocando grandes crises em Santa Catarina. *Estudos Avançados* **23**: 297-306.
- Ab'Saber AN (2010). Como morrem as casas. Entrevista concedida ao Jornal Estado de São Paulo em sábado, 9 de janeiro de 2010. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/suplementos,como-morreram-as-casas,493106,0.htm..> Acesso 20 de janeiro de 2010.
- Almeida, FFM de (1964). Fundamentos geológicos do relevo paulista. São Paulo: Instituto de Geografia, Universidade de São Paulo. *Bol IGG* **41**: 167-263.
- Aggarwal R, Benatti TR, Gill N, Zhao CY, Chen MS, Fellers JP, Schemerhorn BJ, Stuart JJ (2009). A BAC-based physical map of the Hessian fly genome anchored to polytene chromosomes. *BMC Genomics* **10**: 293.
- Agoze ME, Lemeunier F, Periquet G (1992). Mitotic and salivary gland chromosome analyses in the *Musca domestica* L. (house fly) (Diptera: Muscidae) *Heredity* **69**: 57-64.
- Ananina GA (2003). Polimorfismo de inversões cromossômicas de *Drosophila mediopunctata*. Tese de Doutorado: UNICAMP, Campinas Brasil: x + 52 pp. UNICAMP Press.
- Ananina GA, Peixoto AA, Souza WN, Klaczko LB (2002). Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**: 691-694.
- Ananina GA, Peixoto AA, Blanche-Mathé BC, Souza WN, da Silva LB, Valente VLS, Klaczko LB (2004). Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal and latitudinal variation, *Genet Mol Biol* **97**: 61-69.
- Ananina G, Rohde C, David JR, Valente, VLS, Klaczko, LB (2007). Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970) (Diptera: drosophilidae). *Genetica* **131**: 117-125.
- Anderson AR, Hoffmann AA, McKechnie SW, Umina PA, Weeks AR (2005). The latitudinal cline in the *In(3R)Payne* inversion polymorphism has shifted in the last 20 years in Australian *Drosophila melanogaster* populations. *Mol Ecol* **14**: 851-858.

- Anderson WW., Arnold J, Baldwin DG, Beckenbach AT, Brown CJ, Bryant SH, Coyne JA, Harshman LG, Heed WB, Jeffrey DE, Klaczko LB, Moore BC, Porter JM, Powell JR, Prout T, Schaeffer SW, Stephens JC, Taylor CE, Turner ME, Williams GO, Moore JA (1991). Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10367-10371.
- Andrade CAC, Hatadani LM, Klaczko LB (2005) Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*. *J Therm Biol* 30:518-523.
- Andrade, CAC, Vieira, RD, Ananina G, Klaczko LB (2009). Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* **135**: 13-23.
- Andreyenkova NG, Kokoza EB, Semeshin VF, Belyaeva ES, Demakov SA, Pindyurin AV, Andreyeva EN, Volkova EI, Zhimulev IF (2009). *Chromosoma* **118**: 747-761.
- Araújo GH de S (2005). Gestão ambiental de áreas degradadas. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil.
- Azeredo-Espin AML (1987). Análise cariotípica, morfométrica e de compatibilidade sexual, em linhagens brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 149 pp.
- Azeredo-Espin AML (1993). Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. *Int Atomic Energy Agency*, **327**: 161-165.
- Azevedo A (1968). *As Regiões Brasileiras*, São Paulo: Companhia Editora Nacional. 4.ed.
- Bächli G (2009) TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Database 2009/10; v1.03. Available at <http://taxodros.unizh.ch/>. Accessed on January 18, 2010.
- Balanyà J, Oller JM, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L (2006). Global genetic change tracks global climatic warning in *Drosophila subobscura*. *Science* **313**:1773-1775.
- Balanyà J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L (2009). The chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*: a microevolutionary weapon to monitor global change. *Heredity* **103**: 364-367.
- Baumhover AH (2002). A personal account of developing the sterile insect technique to eradicate the screw worm from Curacao, Florida and the Southeastern United States. *Florida Entomol* **85**: 666-673.

- Bedo DG, Spradbery JP, Mahon RJ (1994). Cytogenetic variation in natural populations of the Old World screwworm fly *Chrysomya bezziana*. *Genome* **37**: 390-398.
- Bernhardt SA, Blair C, Sylla M, Bosio C, Black WC (2009). Evidence of multiple chromosomal inversions in *Aedes aegypti* formosus from Senegal. *Insect Mol Biol* **18**: 557-569.
- Bitner-Mathé BC, Peixoto AA, Klaczko LB (1995). Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influences of chromosome inversions. *Heredity* **75**: 54-61.
- Bitner-Mathé BC, Klaczko LB (1998). Variation and heritability of arisal morphology in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. *Hereditas* **128**: 67-71.
- Bitner-Mathé BC, Klaczko LB (1999a). Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. *Genetica* **105**: 35-42.
- Bitner-Mathé BC, Klaczko LB (1999b). Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity* **83**: 688-696.
- Bowman DD (2006). Successful and currently ongoing parasite eradication programs. *Vet Parasitol* **139**: 293-307.
- Böhringer C, Jochem PEP (2007). Measuring the immeasurable – A survey of sustainability indices. *Ecol Econ* **63**: 1-8.
- Bridges CB (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Hered* **26**: 60-64.
- Bridges CB (1942). A new map of the salivary gland 2L-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J Hered* **33**: 402.
- Brown Jr KS, Freitas AVL (2000). Atlantic forest butterflies: indicators for landscape conservation. *Biotropica* **32**: 934-956.
- Brown Jr KS, Freitas AVL (2002). Butterfly communities of urban forest fragments in Campinas, São Paulo, Brazil: Structure, instability, environmental correlates, and conservation. *J Insect Conserv* **6**: 217-231.
- Carvalho AB, Peixoto AA, Klaczko LB (1989). "Sex-ratio" in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **62**: 425-428.

- Carvalho AB, Klaczko LB (1993). Autosomal suppressors of sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **71**: 546-551.
- Carvalho AB, Klaczko LB (1994). Y-linked suppressors of the sex-ratio trait in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **73**: 573-579.
- Carvalho AB, Vaz SC, Klaczko LB (1997). Polymorphism for Y-linked suppressors of sex-ratio in two natural populations of *Drosophila mediopunctata*. *Genetics* **146**: 891-902.
- Carvalho AB, Sampaio MC, Varandas FR, Klaczko LB (1998). An experimental demonstration of Fisher's principle: evolution of sexual proportion by natural selection. *Genetics* **148**: 719-731.
- Carvalho RA, Torres TT, Paniago MG, Azeredo-Espin AML (2009). Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med Vet Entomol* **23**: 86-91.
- Carvalho RA, Torres TT, Azeredo-Espin AML (2006). A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. *Vet Parasitol* **140**: 344-351.
- Cecilia GM, Milla F, Manso FC (2009). Structural map of the polytene chromosomes from the salivary glands of South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* Wied (Diptera, Tephritidae). *Caryologia* **62**: 204-212.
- Cassetti W. *Ambiente e apropriação do relevo*. São Paulo, Contexto, 1991.
- Cielo Filho R, Gneri MA, Martins FR (2007). Position on slope, disturbance, and tree species coexistence in a Seasonal Semideciduous Forest in SE Brazil. *Plant Ecol* **190**:189-203.
- Cobb M, Huet M, Lachaise D, Veuille M (2000). Fragmented forests, evolving flies: molecular variation in African populations of *Drosophila teisieri*. *Mol Ecol* **9**: 1591-1597.
- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, Paterson AH, Stein L (2005). Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends in Genet* **21**: 673-680.
- Colombo AF (2007). Consequências das mudanças climáticas globais para as espécies arbóreas da Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado: UNICAMP, Campinas Brasil: 86 pp. UNICAMP Press.
- Coluzzi M, Sabatini A, Torre A, Deco MAD, Petrarca V (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* **298**: 1415-1418.

- Coquerel C (1858). Note sur les larves appartenant à une espèce nouvelle de Diptère, (*Lucilia hominivorax*) développées dans les sinus frontaux de l'homme à Cayenne. *Annls So Ent Fr* **3**:171-176.
- Costa LGS, Mantovani W (1995). Flora arbustivo-arbórea de trecho de mata mesófila, no sítio de Ibicatu, Piracicaba (SP). *Hoehnea* **22**: 47-59.
- Dev V, Lachance LE, Whitten CJ (1985). Polytene chromosomes of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J Hered* **76**: 132-133.
- Dev V, LaChance LE, Whitten CJ (1986). Polytene chromosomes, karyotype correlations, and population cytology of the primary screwworm fly. *J Hered* **77**: 427-434.
- Dobzhansky T, Pavan C (1943). Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bolm Fac Filos Ciênc S Paulo* **36**: 7-72.
- Dobzhansky T (1947). Genetics of Natural Populations. XIV. A Response of Certain Genes Arrangements in the Third Chromosome of *Drosophila pseudoobscura* to natural selection. *Genetics* **32**: 142-160.
- Dobzhansky T (1970). *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York, 505 pp.
- Dramstad WE (2009). Spatial metrics – useful indicators for society or mainly fun tools for landscape ecologists? *Norw J Geol* **63**: 246-254.
- Etges WJ, Levitan M (2008). Variable evolutionary response to regional climate change in a polymorphic species. *Biol J Linn Soc* **95**: 702-718.
- Ewers RM, Didham, RK (2006). Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biol Rev* **81**: 117-142.
- Fernandes LF, Pimenta FC, Fernandes FF (2009). First report of human myiasis in Goiás state, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. *J Parasitol* **95**: 32-38.
- Fonseca MG, Martini AMZ, Santos FAM (2004). Spatial structure of *Aspidosperma polyneuron* in two semi-deciduous forests in Southeast Brazil. *J Veg Sci* **15**: 41-48.
- Foster GG, Whitten MJ, Konovalov C, Bedo DG, Maddern RH, Boon DJ (1980). Cytogenetic studies of *Lucilia cuprina dorsalis* R.-D. (Diptera: Caliphoridae). Polytene chromosome maps

- of the autosomes and cytogenetic localization of visible genetic markers. *Chromosoma* **81**: 151-168.
- Fragata I, Balanyà J, Rego C, Matos M, Rezende EL, Santos M (2010). Contrasting patterns of phenotypic variation linked to chromosomal inversions in native and colonizing populations of *Drosophila subobscura*. *J Evol Biol* **23**: 112-124.
- Frota-Pessoa O (1954). Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera), with 107 figures. *Arq Museu Paranaense* 10: 253-303.
- Futada SM (2007). Fragmentos Remanescentes da Bacia do Ribeirão das Anhumas (Campinas-SP): Evolução e Contexto. Dissertação de Mestrado: UNICAMP, Campinas Brasil: xxv + 220 pp. UNICAMP Press.
- Gagné RJ, Peterson II RD (1982). Physical changes in the genitalia of male of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), caused by mating. *Ann Entomol Soc Am* **75**: 574-578.
- Griffiths AM Evans LM, Stevens JR (2009). Characterization and utilization of microsatellite loci in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med Vet Entomol* **23**: 8-13.
- Guimarães JH, Papavero N, Prado AP (1983). As miíases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev Bras Zool* **1**: 239-416.
- Gunderina LI, Kiknadze II, Gusev VD, Miroshnichenko LA (2005). Divergence of the polytene chromosome banding sequences as a reflection of evolutionary rearrangements of genome linear structure. *Rus J Genet* **41**: 130-137.
- Hall M, Wall R (1995). Myiasis of human and domestic animals. *Adv Parasitol* **35**: 256-333.
- Hatadani LM, Baptista JC, Souza WN, Klaczko LB (2004). Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* **93**: 525-534.
- Hatadani LM, Klaczko LB (2008). Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica* **133**: 335-342.

- Hatadani LM, McInerney JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB (2009) Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and related groups (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* **51**: 595-600.
- Hey J (2003). Speciation and inversions: chimps and humans. *BioEssays* **25**: 825-828.
- Hoffmann AA, Danborn PJ (2007). Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecol Let* **10**: 63-76.
- Hoffmann AA, Riesenberg LH (2008). Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst* **39**: 21-42.
- Hoffmann AA, Willi Y (2008). Detecting genetic responses to environmental changes. *Nat Rev Genet* **9**: 421-432.
- Hoffmann AA, Sgrò CM, Weeks AR (2004). Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trend in Evol Ecol* **9**: 482-488.
- Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Graves TA, van Daalen SK, Minx PJ, Fulton RS, McGrath SD, Locke DP, Friedman C, Trask BJ, Mardis ER, Warren WC, Repping S, Rozen S, Wilson RK, Page DC (2010). Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* **463**: 536-539.
- Hunter FF (2002). Polytene chromosomes of *Simulis craigi* (Diptera: Simuliidae). *Adv Genetic* **114**: 207-215.
- Infante MEV, Azeredo-Espin AML (1995). Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Bioch Genetics* **33**: 737-756.
- Infante MEV, Yotoko KS, Azeredo-Espin AML (1999). Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae), from South-east of Brazil and North of Argentina. *Genome* **42**: 772-779.
- Instituto Brasileiro de geografia e Estatística (IBGE) (2000). Mapa de Compartimento de relevo. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/solos/viewer.htm>. Acessado em 05 de fevereiro de 2010.
- International Atomic Energy Agency (IAEA) (1998). Thematic plan for the Sterile Insect Technique for Old and New World screwworm. Viena, Áustria – 1998.

- International Atomic Energy (IAEA) (2000). Genetic sexing and population genetics of screwworms. Report of International Atomic Energy Agency and Food and Agriculture Organization of the United Nations, IAEA-314-D4-00CT02176, 17 pp.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007). *Climate change 2007: The physical science basis. Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC*, S. Solomon *et al.*, Eds. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2007).
- Joly CA (2007). Biodiversidade e mudanças climáticas: contexto evolutivo, histórico e político. *Ambiente & Sociedade* **10**: 169-172.
- Kastritsis CD (1966). *Cytological studies of some species of the tripunctata group of Drosophila*, Univ Texas Publs, Texas, p. 413-474.
- Kaufman G, Wasserman M (1957). Effects of irradiation on the screwworm, *Callitroga hominivorax* (Coq). University of Texas Publication Number 5721: 246-259.
- Kennington WJ, Partridge L, Hoffmann AA (2006). Patterns of diversity and linkage disequilibrium within the cosmopolitan inversion *In(3R)Payne* in *Drosophila melanogaster* are indicative of coadaptation. *Genetics* **172**: 1655-1663.
- Keyghobadi N (2007). The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Can J Zool* **85**: 1049-1064.
- Keyghobadi N, Roland J, Matter SF, Strobeck C (2005). Among- and within-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation: an empirical demonstration. *Proc R Soc B* **272**: 553-560.
- Kirkpatrick M, Barton N (2006). Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* **173**: 419-434.
- Klaczko LB (2006). Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* **126**: 43-55.
- Klaczko LB & Bitner-Mathé BC (1990). On the edge of a wing. *Nature* **346**: 231 doi:10.1038/346321a0.
- Knipling EF (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J Econ Entomol* **48**: 459-462.
- Knibb WR (1982). Chromosome inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* II. Geographic clines and climatic associations in Australasia, North America and Asia. *Genetica* **58**: 213-221.

- Krafsur ES, Whitten CJ (1993). Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) in Colima, Mexico. *J Med Entomol* **30**: 477-480.
- Krimbas CB, Powell JR (1992). *Drosophila inversion polymorphism*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Laborda PR, Mori G, de Souza AP (2009a). *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. *Conserv Genet Resour* **1**: 297-307.
- Laborda PR, Mori G, de Souza AP (2009b). *Drosophila mediopunctata* microsatellites II: cross-species amplification in the *tripunctata* group and other *Drosophila* species. *Conserv Genet Resour* **1**: 281-296.
- LaChance LE, Bartlett AC, Bram RA, Gagne RJ, Graham OH (1982). Mating types in screwworm populations? *Science* **218**: 1142-1145.
- LaChance LE, Whitten CJ (1986). Cytogenetic studies of screwworm (Diptera: Calliphoridae) populations from southern Mexico and Jamaica. *Ann Entomol Soc Am* **79**: 792-798.
- Laurance WF (2008). Theory meets reality: How habitat fragmentation research has transcended island biogeographic theory. *Biol Conserv* **141**: 1731-1744.
- Lessinger AC, Azeredo-Espin AML. (2002). Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* **14**: 71-80.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Lemos, TA Kemper EL, Silva FR, Vettore AL, Arruda P, Azeredo-Espin AML (2000). The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera : Calliphoridae). *Insect Mol Biol* **9**: 521-529.
- Levitan M, Etges WJ (2005). Climate change and recent genetic flux in populations of *Drosophila robusta*. *BMC Evol Biol* **5**: 4.
- Levitan M, Etges WJ (2009). Rapid response to perturbation of chromosome frequencies in natural populations of *Drosophila robusta*. *Genetica* **137**: 1-8.
- Lewontin RC (1964). The interaction of selection and linkage. I. General considerations; Heterotic models. *Genetics* **49**: 49-67.
- Lewontin RC (1988). On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* **120**: 849-852.

- Lyra ML, Fresia P, Gama S, Cristina J, Klaczko LB, Azeredo-Espin AML (2005). Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J Med Entomology* **42**: 589-595.
- Lyra ML, Klaczko LB, Azeredo-Espin AML (2009). Complex patterns of genetic variability in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med Vet Entomol* **23**: 32-42.
- Lyra ML (2008). Variabilidade mitocondrial e morfológica em populações naturais da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* / Mariana Lúcio Lyra. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. xxvi + 148 pp. UNICAMP Press,
- Martinelli M (2009). Relevô do Estado de São Paulo. *Confins* 7. Posto online em 09 novembro 2009, Consultado o 05 fevereiro 2010. URL: <http://confins.revues.org/index6168.html>
- Marques HVS, Carvalho AB, Elias CA, Klaczko LB (1991). Mutants of *Drosophila. mediopunctata*. *Dros Inf Serv* **70**: 280.
- Marquez AT, Mattos, MD, Nascimento SB (2007). Myiasis associated with some socioeconomic factors in five urban areas of the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Tro* **40**: 175-180.
- McInnis DO (1981). Cytogenetics of a local population of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, from Northeastern Mexico. *Ann Entomol Soc Am* **74**: 582-589.
- McInnis DO, Whitten CJ, Mackley JW, Peterson II RD, Spencer JP (1983). Cytogenetic studies of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Chiapas, Mexico. *Ann Entomol Soc Am* **76**: 628-640.
- McAllister BF, Sheeley SL, Mena PA, Evans AL, Schlötterer C (2008). Clinal distribution of a chromosomal rearrangement: a precursor to chromosomal speciation? *Evolution* **62**: 1852-1865.
- Miller JR, Hobbs RJ (2007). Habitat restoration – Do we know what we’re doing? *Restor Ecol* **15**: 382-390.
- Navarro A, Barton NC (2003). Evolution in rearranged chromosomes. *Science* **300**: 321-324.
- Navarro A, Gazave E. (2005). Inversions in classic style and trendy lines. *Nature Genetics* **37**: 115-116.

- Oliveira RJ (2006). Variação da composição florística e da diversidade alfa das florestas atlânticas no estado de São Paulo. Tese de Doutorado: UNICAMP, Campinas Brasil: vii + 140 pp. UNICAMP Press.
- de la Ossa N, Castro LE, Visbal L, Santos AM, Diaz E, Romero-Vivas CME (2009). Cutaneous myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera Calliphoridae) in Hospital Universidad del Norte, Soledad, Atlantico. *Biomedica* **29**: 12-17.
- Painter TS (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* **78**: 585-586.
- Parmesan C (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **37**:637-69.
- Peixoto AA, Klaczko LB. (1991) Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila*. *Genetics* **129**: 773-777.
- Petenusci MC (2004). Plano de manejo para parque em área urbana. Estudo de caso: ribeirão Viracopos (Campinas, SP). Dissertação de mestrado. Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo - Universidade Estadual de Campinas. xiv + 313p.
- Presgraves DC, Gerard PR, Cherukuri A, Lyttle TW (2009). *Plos Genet* **5**: e1000463. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000463.
- Puchalla S (1994). Polytene chromosomes of monogenic and amphogenic *Chrysomia* species (Calliphoridae, Diptera): analysis of banding patterns and in situ hybridization with *Drosophila* sex determining gene sequences. *Chromosoma* **103**: 16-30.
- Rasic G, Stamenkovic-Radak M, Savic T, Andjelkovic M (2007). Inbreeding reveals interpopulation differences in inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *J Zool Syst Evol Res* **46**: 31-37.
- Rego C, Balanyà J, Fragata I, Matos M, Rezende EL, Santos M (2009). Clinal patterns of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila subobscura* are partly associated with thermal preferences and heat stress resistance. *Evolution* **64**: 385-397.
- Richardson RH, Ellison JR, Averhoff WW (1982a). Autocidal control of Screwworm in North America. *Science* **215**: 361-370.
- Richardson RH, Ellison JR, Averhoff WW (1982b). Matting types in Screwworm populations? *Science* **218**: 1143-1145.

- Rieseberg LH (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* **16**: 351-358.
- Rocha FB, Medeiros HF, Klaczko LB (2009). The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* **63**: 280-287.
- Rodrigues RR (1989). Análise estrutural das formações florestais ripárias. *In*: Anais do Simpósio sobre Mata Ciliar. Campinas: Fundação Cargill. 335p. 99-119.
- Rodrigues RR, Gandolfi S (2000). Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares *In*: Rodrigues, R.R. & Leitão-Filho, H.F. (ed). Matas ciliares: conservação e recuperação. 2000. Barbosa, L M. 2000. São Paulo: Ed. da USP/FAPESP. 320p. 235-247.
- Rodríguez-Trelles F, Alvarez G, Zapata C (1996). Time-series analysis of seasonal changes of the *O* inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **142**: 179-187.
- Rodríguez-Trelles F, Rodríguez MA (1998). Rapid microevolution and loss of chromosomal diversity in *Drosophila* in response to climate warming. *Evol Ecol* **12**:829-38.
- Roehrdanz RL (1989). Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem Genet* **27**: 551-569.
- Roehrdanz RL, Johnson DA (1988). Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*. *J Med Entomol* **25**: 136-141.
- Ross JLS (1996). “Os fundamentos da geografia da natureza”. *In*: Ross, JLS (org.). *Geografia do Brasil*, São Paulo, EDUSP, 1996.
- Ross JLS, Moroz IC (1997). *Mapa geomorfológico do estado de São Paulo*. São Paulo, DG-FFLCH-USP, IPT, FAPESP.
- Rozza AF (2003). Manejo e regeneração de trecho degradado de floresta estacional semidecidual: Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP. Doctoral Thesis: UNICAMP, Campinas Brasil: ix + 140 pp. UNICAMP Press.
- Saavedra CC, Callegari-Jacques SM, Napp M, Valente VLS (1995). A descriptive and analytical study of Neotropical drosophilid communities. *J Zool Syst Evol Res* **33**: 62-74.
- Salis SM, Shephard GJ, Joly CA (1995). Floristic comparison of mesophytic semideciduous forests of the interior of the state of São Paulo, Southeast Brazil. *Vegetatio* **119**: 155-164.

- Santin DA (1999). A vegetação remanescente do Município de Campinas. Mapeamento, caracterização fisionômica e composição florística visando a conservação. Doctoral Thesis: UNICAMP, Campinas Brasil: xviii + 199 pp., 4 anexos (map, 163 pp.; 3pp.+ 178 sites x 478 species matrix.; 70 pp.) UNICAMP Press, thesis number 38966-7.
- Santos K, Kinoshita LS (2003). Flora arbustivo-arbórea do fragmento de floresta estacional semidecidual do Ribeirão Cachoeira Município de Campinas- SP. Acta Bot Bras **17**: 325-341.
- Saunders RDC, Glover DM, Ashburner M, Siden-Kiamos I, Louis C, Monastirioti M, Savaski C, Kafitos F (1989). PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. Nuc Ac Res **17**: 9027-9037.
- Schaeffer SW (2008). Selection in heterogeneous environments maintains the gene arrangement polymorphism of *Drosophila pseudoobscura*. Evolution. **62**: 3082-3099.
- Schaeffer SW, Anderson WW (2005). Mechanism of genetic exchange within the chromosomal inversions in *Drosophila pseudoobscura*. Genetics **171**: 1729-1739.
- Schemerhorn BJ, Crane YM, Morton PK, Aggarwal R, Benatti T (2009). localization and characterization of 170 BAC-derived clones and mapping of 94 microsatellites in the Hessian fly. J Hered **100**: 790-797.
- Schiffer M, Kennington WJ, Hoffmann AA, Blacket MJ (2007). Lack of genetic structure among ecologically adapted populations of an Australian rainforest *Drosophila* species as indicated by microsatellite markers and mitochondrial DNA sequences. Mol Ecol **16**: 1687-1700.
- Schmidt S, Claussen U, Liehr T, Weise A (2005). Evolution versus constitution: differences in chromosomal inversions. Hum Genet **117**: 213-219.
- Severson DW, Brown SE, Knudson DI (2001). Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. Annu Rev Entomol **46**: 183-219.
- da Silva NM, Azeredo-Espin AML (2009). Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Genet Mol Res **8**:1067-1078.
- Singh P, Singh BN (2007). Population genetics of *Drosophila ananassae*: genetic differentiation among Indian natural populations at the level of inversion. Genet Res Camb **89**: 191-199.

- Sorza V (1988). vols. I and II. Chromosome maps of *Drosophila*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Sperlich D, Pfriem P (1986). Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr, JN (eds) The genetics and biology of *Drosophila*. v.3a. Academic Press, New York, pp 123-168.
- Spironello M, Hunter FF (2005). Polytene chromosomes of an archipelagic subgenus, *Inseliellum* (Diptera:Simuliidae). *Genetica* **123**: 217-226.
- Storfer A; Murphy MA; Evans JS; Goldberg CS; Robinson S; Spear SF; Dezzani R; Delmelle E; Vierling L; Waits, LP (2007). Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* **98**: 128-142.
- Stork NE, Coddington JA, Colwell RK, Chazdon RL, Dick CR, Peres CA, Sloan S, Willis K (2009). vulnerability and resilience of tropical forest species to land-use change. *Conserv Bio* **23**: 1438-1447.
- Stuchbury BJM (2007). The effects of habitat fragmentation on animals: gaps in our knowledge. *Can J Zool* **85**: 1015-1016.
- Stutervant AH (1917). Genetic factors affecting the strength of linkage in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **7**: 235.
- Stutervant AH (1926). A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to inversion of a section of the third chromosome. *Biol Zentralbl* **46**: 697.
- Stutervant AH (1931). Known and probable inverted section of the autosomes of *Drosophila melanogaster* to crossing over and disjunction. *Carnegie Inst Washington Publ* **42**: 1.
- Taylor DB, Peterson II RD (1994). Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Ann Entomol Soc Am* **87**: 626-633.
- Thomas DB, Mangan RL (1989). Oviposition and wound visiting behavior of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*(Coquerel). *Ann Entomol Soc Am* **82**: 526.
- Tidon R (2006). Relationships between drosophilids (Diptera, drosophilidae) and the environment on two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linn Soc* **87**: 233-248.
- Tidon-Sklorz R, Sene FM (1995). Evolution of the Buzzatii cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evol Biol* **8**: 71-85.

- Torres TT, Brondani RPV, Garcia JE, Azeredo-Espin AML (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the new-world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Mol Ecol Notes* **4**: 182-184.
- Torres TT, Azeredo-Espin AML (2009). Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Med Vet Entomol* **23**: 23-31.
- Umina PA, Weeks AR, Kearney MR, McKechnie SW, Hoffmann AA (2005). A rapid shift in a classic clinal pattern in *Drosophila* reflecting climate change. *Science* **308**: 691-693.
- Uehara-Prado M, Freitas AVL (2009). The effect of rainforest fragmentation on species diversity and mimicry ring composition of ithomiine butterflies. *Insect Conserv Divers* **2**: 23-28.
- Val FC, Vilela CR, Marques MD (1981). Drosophilidae of the Neotropical region, pp. 123-168 in *The genetics and biology of Drosophila*, Vol. 3^a, edited by M. Ashburner, HL Carson, JN Thompson Jr., Academic Press, new York.
- Vandergast, AG; Lewallen, EA; Deas, J; Bohonak, AJ; Weissman, DB; Fisher, RN (2009). Loss of genetic connectivity and diversity in urban microreserves in a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmatidae: *Stenopelmatus* n. sp "santa monica"). *J Insect Conserv* **13**: 329-345.
- Whitmore TC (1997). Tropical forest disturbance, disappearance and species loss. In: WF Laurance and RO Bierregard (eds), *Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 3-12.
- Wright S, Dobzhansky T (1946). Genetics of natural populations. XIII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in some populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **31**: 125.
- Zellmer AJ, Knowles LL (2009). Disentangling the effects of historic vs. contemporary landscape structure on population genetic divergence. *Mol Ecol* **18**: 3593-3602.
- Zhao JT, Frommer M, Zhimulev JA, Zacharopoulou A (1998). Mitotic and polytene chromosome analyses in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Genome* **41**: 510-526.
- Zhimulev IF (1996). Morphology and structure of polytene chromosomes. *Adv Genet* **34**: 1-497.
- Zumt F (1965). Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London, pp.267.