

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/56146

IB/ 82010

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia



Galina Ananina

Polimorfismos de Inversões Cromossômicas em
Drosophila mediopunctata

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Galina Ananina
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia – UNICAMP,
para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética Animal e Evolução

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Campinas, 2003

UNIDADE IB/82 010
 Nº CHAMADA Unicamp
An14p
 V _____ EX _____
 TOMBO BC/ 56146
 PROC. 16-12-4103
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 10/10/03
 Nº CPD _____

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

An14p

Ananina, Galina

Polimorfismos de inversões cromossômicas em drosophila
 mediopunctata / Galina Ananina.--
 Campinas, SP: [s.n.], 2003.

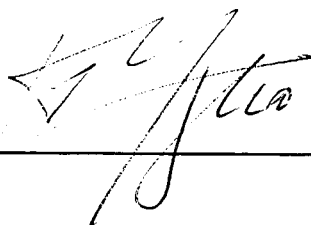
Orientador: Louis Bernard Klaczko

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
 Instituto de Biologia.

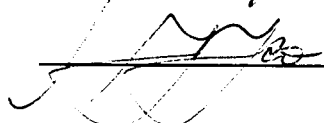
1. Insetos. 2. Diptera. 3. Mapeamento cromossômico. 4. Cromossomos--
 Polimorfismo. I. Klazko, Louis Bernard. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (orientador)



Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin




Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis



Profa. Dra. Nilda Maria Diniz



Profa. Dra. Cláudia Rohde



Prof. Dr. Vera Nisaka Solferini

Prof. Dr. Paulo Sérgio Moreira Carvalho de Oliveira

Campinas, 15 de agosto de 2003

Agradecimentos

Às diversas pessoas que investiram nas minhas formações, pessoal e profissional, de quem eu nunca esquecerei, e cuja lista é grande demais para ser apresentada aqui.

Ao meu orientador de mestrado, Boris Fedorovich Chadov, que me introduziu no campo de genética de *Drosophila*.

À Wilma, técnica do laboratório, pelas ajudas no trabalho e na minha adaptação no Brasil, o que ela sempre fez com um grande profissionalismo e delicadeza.

À dona Cida, à Glória, à Patrícia, ao Sr. Laércio e ao Prof. Luciano pela ajuda técnica no trabalho.

Ao Áureo Tatsumi Yamada, Ivanira José Bechara, Maria Alice da Cruz Höfling, e Paulo Pinto Joazeiro, professores do Departamento de Histologia e Embriologia (IB, Unicamp) pela ajuda com a utilização do microscópio ótico.

A Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Cláudia Rohde, Nilda Maria Diniz, Vera Nisaka Solferini, Vera Lucia da Silva Valente-Gaiesky, Alexandre Afranio Peixoto, Sérgio Furtado dos Reis, por participarem da pré-banca e banca e pelas sugestões que certamente melhoraram a qualidade da tese.

Aos meus colegas de laboratório, Cacá, Hermes, Luciane, Horácio, Luciana, Roberto, Marcos e Felipe, que compartilharam comigo os momentos alegres e difíceis da minha vida durante esses cinco anos. Pela ajuda, dada sempre que precisei, fosse em coletas no campo ou até mesmo na revisão dos meus textos em português. Pela clima de entusiasmo e dedicação à pesquisa por eles criado. Com certeza, a tese não seria a mesma ou nem mesmo teria sido feita, sem a presença de vocês.

Aos meus queridos Alexandre e Tatyana, pela compreensão e apoio.

E ao meu orientador, Louis Bernard Klaczko, pela chance de trabalhar em seu laboratório, bem como pela orientação e amizade.

Ao CNPq, à FAEP-UNICAMP, à FAPESP e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Sumário

Agradecimentos	iv
Sumário	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract	x
I. Introdução Geral	1
1. - Mapeamento cromossômico	1
2. - Polimorfismo de inversões em <i>Drosophila</i>	3
3. - <i>Drosophila mediopunctata</i> Dobzhansky & Pavan 1943	9
4. - Objetivos	12
5. - Organização da tese	13
6. - Contribuição da autora	13
II. Artigos	14
1. - Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in <i>Drosophila mediopunctata</i> . Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 97, n. 5, p. 691-694, 2002	14
2. - Chromosomal Inversion Polymorphism in <i>Drosophila mediopunctata</i> : Seasonal, Altitudinal, and Latitudinal Variation	18
III. Conclusões Gerais	44
IV. Apêndice	46
V. Bibliografia Geral	48

Lista de Figuras

Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 97, n. 5, p. 691-694, 2002.

- | | |
|--|----|
| Figure 1. Polytene chromosome map of <i>Drosophila mediopunctata</i> with inversion breakpoints presented. | 15 |
| Figure 2. The most frequent inversions of <i>Drosophila mediopunctata</i> : a: <i>DA-PA0/DI-PB0</i> ; b: <i>DS-PC0/DI-PB0</i> ; c: <i>DV/DI</i> ; d: <i>DP/DI</i> ; e: <i>PA0/PC0</i> . | 16 |
| Figure 3. Diagram of the proximal inversions showing the sections and subdivisions of the standard map. | 17 |

Chromosomal Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: Seasonal, Altitudinal, and Latitudinal Variation.

- | | |
|--|----|
| Figure 1. Distribution of <i>DA</i> , <i>DI</i> and <i>DS+DP</i> inversion frequencies in relation to altitude (Parque Nacional do Itatiaia). | 38 |
| Figure 2. Seasonal variation in the <i>DA</i> inversion frequency (Parque Nacional do Itatiaia). | 39 |
| Figure 3. <i>DI</i> inversion frequencies in the various collections according to the seasons (Parque Nacional do Itatiaia). | 40 |
| Figure 4. Seasonal variation in the <i>DS</i> and <i>DP</i> (grouped) inversion frequency (Parque Nacional do Itatiaia). | 41 |
| Figure 5. Distribution of <i>DA</i> , <i>DI</i> and <i>DS+DP</i> inversion frequencies in relation to average temperature (Parque Nacional do Itatiaia). | 42 |
| Figure 6. Distribution of haplotype frequencies in <i>D. mediopunctata</i> from the Parque Nacional do Itatiaia, Serra do Japi, Campinas, and Porto Alegre. | 43 |

Apêndice

Figura 1. Apresentação esquemática dos pontos de quebra da translocação <i>Delta3</i> .	46
Figura 2. Translocação <i>Delta3</i> .	46
Figura 3. Apresentação esquemática dos pontos de quebra da translocação <i>Antennapedia</i> .	47
Figura 4. Translocação <i>Antennapedia</i> .	47

Lista de Tabelas

Chromosomal Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: Seasonal, Altitudinal, and Latitudinal Variation

Table 1. Second chromosome inversion frequencies in <i>D. mediopunctata</i> from different collections and areas in the Parque Nacional do Itatiaia.	32
Table 2. Pearson correlation coefficients (r) between inversion frequencies (after angular transformation) and altitude and other climatic data.	35
Table 3. Frequencies of distal inversions in the second chromosome in various localities and different dates.	36
Table 4. Heterozygosity expected from the Hardy-Weinberg equilibrium.	37

Resumo

Drosophila mediopunctata é uma espécie do grupo *tripunctata*, ela é bastante comum em várias localidades da América Latina, especialmente no inverno. O trabalho apresenta um mapa dos cromossomos politênicos de *D. mediopunctata*. Os pontos de quebra das inversões encontradas em populações naturais estão marcados no mapa. Os cromossomos X, II e IV mostram polimorfismos de inversões. O cromossomo II é o mais polimórfico, e nele foram encontradas 17 inversões, sendo oito inversões na região distal e nove na região proximal. Cromossomo X possui quatro arranjos gênicos diferentes, e o cromossomo IV, dois.

O trabalho apresenta uma análise do polimorfismo de inversões do segundo cromossomo de *D. mediopunctata* em relação às variações sazonal, altitudinal e latitudinal. No Parque Nacional do Itatiaia as frequências das inversões *DA*, *DS* e *DP* mostram variação sazonal e clines altitudinais. O arranjo *DA* aumenta de frequência no inverno e com a altitude. O inverso se dá com os arranjos *DS* e *DP*. Contudo, este padrão microgeográfico não encontra paralelo na escala macrogeográfica, uma vez que em amostras de populações do Sul do Brasil *DA* está em baixa frequência ou ausente.

As populações de *D. mediopunctata* de Porto Alegre são menos polimórficas para inversões, com a redução mais notável de polimorfismo na região proximal do cromossomo II. As populações de Campinas e da Serra do Japi são bastante diferentes pelas frequências de inversões – ainda que estejam separadas por apenas 50 km – enquanto as amostras da Serra do Japi se assemelham mais às do Parque Nacional do Itatiaia, distantes de aproximadamente 200 km.

Abstract

Drosophila mediopunctata belongs to the *tripunctata* group, and is one of the commonest *Drosophila* species collected in some places in Brazil, especially in the winter. A standard map of the polytene chromosomes is presented. The breakpoints of the naturally occurring chromosomal rearrangements are marked on the map. The distribution of breaking points through the chromosomes of *D. mediopunctata* is apparently non-random. Chromosomes X, II and IV show inversion polymorphisms. Chromosome II is the most polymorphic, with 17 inversions, 8 inversions in the distal region and 9 in the proximal region. Chromosome X has four different gene arrangements. While chromosome IV has only two.

We present an analysis of the chromosome II inversion polymorphism with respect to seasonal, altitudinal and latitudinal variation. In *D. mediopunctata* from the Parque Nacional do Itatiaia, the frequencies of *DA*, *DS*, and *DP* inversions vary seasonally. These inversions also show altitudinal clines in their frequencies. This microgeographic pattern does not occur macrogeographically. *D. mediopunctata* from Porto Alegre are less polymorphic for inversions, than are other populations, with the most notable reduction occurring in the proximal region of chromosome II. There is a considerable difference between *D. mediopunctata* from Campinas and specimens from Serra do Japi, which are separated by only 50 km. In contrast, *D. mediopunctata* from Serra do Japi are much more similar to specimens from the Parque Nacional do Itatiaia, which is 200 km from the former location.

I. Introdução Geral

1. - Mapeamento cromossômico

O mapeamento cromossômico é baseado predominantemente no número e na clareza dos detalhes estruturais ao longo dos cromossomos. Técnicas modernas de coloração conseguem induzir, em cromossomos mitóticos, padrões específicos de bandas, isto é, alterações consistentemente observadas com zonas mais coradas e menos coradas. Todavia, a comparação dos cromossomos interfásicos politenizados com cromossomos mitóticos humanos mostra a grande vantagem dos primeiros no que diz respeito ao número de bandas e ao conteúdo de DNA por banda. Por exemplo, nos cromossomos politênicos a quantidade básica de DNA por banda é 100 vezes menor do que em uma banda média induzida nos cromossomos mitóticos humanos. O padrão de bandas nos cromossomos politênicos é visível porque o DNA cromossômico foi amplificado 2^n vezes, onde n pode chegar a 10, i.e., 1024 vezes, provendo uma sequência para produzir sinal suficientemente forte para ser visualizado (Sorsa, 1988; Zhimulev, 1996).

A história do estudo de cromossomos gigantes começou em 1881, quando Balbiani descobriu as “cordas nucleares” nas células de glândulas salivares em larvas de *Chironomus*. Embora estruturas similares tivessem sido descritas em células de alguns tecidos de outras espécies de *Diptera*, a idéia que estas estruturas gigantes pudessem corresponder aos cromossomos surgiu somente 30 anos depois. Os estudos que, finalmente, provaram isto foram promovidos por Heitz e Bauer nas células de tubos de Malpighi de *Bibio*, por Painter nas células de glândulas salivares de *Drosophila* e por King e Beams nas células de glândulas salivares de *Chironomus* em 1932 e 1933 (para revisão veja Sorsa, 1988.)

Nos anos de 1910 a 1928, Morgan e colaboradores compilaram o mapa genético de *D. melanogaster* baseados nos dados de recombinação gênica. A correspondência entre grupos de ligação e cromossomos mitóticos foi estabelecida através de um estudo de rearranjos cromossômicos, mas até mesmo uma localização aproximada dos genes individuais era extremamente difícil, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos metafásicos dessa espécie (para revisão veja Sorsa, 1988; Zhimulev 1996).

Painter iniciou seu trabalho com cromossomos das glândulas salivares de *D. melanogaster* em 1932 e durante os dois anos seguintes publicou uma série de trabalhos com mapas dos cromossomos de glândulas salivares de *Drosophila* (Sorsa, 1988; Zhimulev, 1996). Uma das dificuldades para usar o mapa cromossômico de Painter era a ausência de um sistema de referência para as bandas. Esta lacuna foi preenchida por Bridges, que propôs um código geral de identificação de bandas, o qual, com algumas variações, tem sido aplicado desde então por todos os pesquisadores do campo. O sistema de referências proposto por Bridges (1935) divide os cromossomos das glândulas salivares de *D. melanogaster* em 102 segmentos. Cada um dos cinco grandes braços (X, 2L, 2R, 3L, e 3R) contém 20 segmentos e o pequeno cromossomo IV apenas dois segmentos. Os segmentos iniciam-se com uma banda proeminente e são divididos em mais 6 subdivisões designadas com letras maiúsculas de A até F. Cada subdivisão começa com uma banda bem definida. Assim, cada banda individual nos cromossomos politênicos pode ser identificada com um número de divisão, uma letra de subdivisão e um número de banda, a partir do começo da subdivisão.

Entretanto, o primeiro mapa publicado por Bridges não apresentava ainda numeração de bandas, porque o autor considerava que novas bandas podiam aparecer nos estudos futuros. Neste mapa, ele apresentava o número mínimo de bandas para os cromossomos de glândulas salivares de *D. melanogaster*: 2650 bandas para o genoma inteiro, contando as bandas duplas como singulares.

O melhoramento contínuo das técnicas de preparação cromossômica tornou necessária uma revisão. Bridges iniciou este trabalho em 1937 com o cromossomo X e depois continuou com o 2R (Bridges, 1937). Este trabalho foi terminado por seu filho, P. N. Bridges, que compilou os mapas revisados para os braços cromossômicos 3L, 3R e 2L, usando o mesmo sistema de símbolos, depois da morte de Bridges em 1939. Na nova versão, as bandas duplas foram contadas como duas bandas singulares e deste modo, o número de bandas chegou a 3286 para o genoma inteiro (Sorsa, 1988).

O mapa original de Bridges, bem como as suas versões revisadas, foi republicado e completado com dados genéticos (Bridges & Brehme, 1944 *apud* Sorsa, 1988; Lindsley & Grell, 1968). Para facilitar a comparação entre preparações reais dos cromossomos e o mapa de

referência, uma representação fotográfica quase idêntica foi composta e publicada junto com a cópia original do mapa (Lefevre, 1976).

Contudo, existem algumas discrepâncias na interpretação dos mapas de Bridges. A existência de bandas duplas e de algumas bandas muito finas, difíceis ou impossíveis de observar no microscópio ótico, gera polêmicas na discussão do problema do número de bandas. Numa tentativa de resolver esta dificuldade e verificar a validade dos mapas de Bridges, os métodos de microscopia eletrônica foram aplicados no mapeamento dos cromossomos politênicos (Sorsa, 1988, Zhimulev, 1996).

Os esforços de muitos pesquisadores resultaram na construção do mapa de referência atual para *D. melanogaster*. Os cromossomos politênicos se mostraram vantajosos para produção e integração de mapas genéticos e físicos. A abundância de detalhes que oferecem permite localizar no microscópio ótico bandas compostas por cromômeros, que contêm fragmentos de DNA menores que 5 kb (Sorsa, 1988). Isso abre a possibilidade de localizar cDNAs ou outros pequenos pedaços de DNA diretamente em cromossomos politênicos ao usar técnicas básicas de hibridização *in situ*, mas, por outro lado, coloca maiores exigências de precisão e confiança na elaboração dos mapas cromossômicos. O futuro do mapeamento físico está claro, e os mapas citogenéticos físicos vão progredir em seu grau de resolução até que as seqüências primárias sejam determinadas. Todavia enquanto os estudos de *D. melanogaster* estão embarcando na era genômica, há outras espécies em fase de mapeamento físico em progresso. O paradigma de *D. melanogaster* pode e continua beneficiando estudos em outros organismos.

2. - Polimorfismo de inversões em *Drosophila*

As inversões cromossômicas foram primeiramente detectadas como supressores de recombinação (Sturtevant, 1926). Com a introdução da técnica de esmagamento dos cromossomos gigantes das glândulas salivares das larvas (Painter, 1933 *apud* Sorsa, 1988), tornou-se fácil e precisa a detecção e descrição de inversões e outras aberrações cromossômicas em *Drosophila*. Logo depois, descobriu-se que as inversões não são curiosidades de laboratório, mas características genéticas comuns em populações naturais de muitas espécies.

2.1. - Distribuição do polimorfismo entre as espécies de *Drosophila*

Estima-se que três quartos das espécies examinadas de *Drosophila* são naturalmente polimórficas para inversões (Krimbas & Powell, 1992; Powell, 1997). É uma proporção muito alta para qualquer mutação cromossômica. Uma particularidade da gametogênese em *Drosophila* pode explicar este fenômeno, pelo menos em parte. Em primeiro lugar, no caso de inversões paracêntricas (que são mais comuns em *Drosophila*), somente os produtos da recombinação em heterozigotos podem gerar gametas não-funcionais. Porém a espermatogênese na maioria das espécies de *Drosophila* é aquiasmática, isto é, não tem crossing-over. Assim, a heterozigosidade para inversões não causa infertilidade em machos. Em fêmeas, somente um dos quatro produtos meióticos entra no ovo funcional, e os três quartos restantes se transformam em corpúsculos polares (Mckim *et al.*, 2002). Provavelmente, a ponte dicêntrica atrasa a separação das cromátides recombinantes, enquanto as cromátides normais (que na maioria dos casos são não recombinantes), sendo mais rápidas, são incorporadas ao pronúcleo e entram no ovo funcional (Sturtevant & Beadle, 1936 *apud* Powell, 1997). Com isso, espera-se que inversões paracêntricas sejam mais ou menos neutras em relação à produção de gametas funcionais.

O polimorfismo de inversões adquire características diferentes em diferentes espécies de *Drosophila*. Algumas espécies, como *D. willistoni*, *D. paulistorum* e *D. subobscura*, possuem um polimorfismo extremamente rico, que se estende a todos os cromossomos, inclusive ao X. Outras espécies, como *D. pseudoobscura* e *D. persimilis*, mostram um polimorfismo rico, porém limitado a um ou dois cromossomos. Há ainda um grupo de espécies que tem um só arranjo gênico dominante em todos os cromossomos com inversões simples infreqüentes, como em *D. melanogaster*. Finalmente, existem espécies sem inversões, por exemplo *D. simulans* (Krimbas & Powell, 1992; Powell, 1997). Esta heterogeneidade entre as espécies ainda não está adequadamente compreendida. Talvez, isto seja o resultado de condições ecológicas diferentes, histórias singulares, peculiaridades genéticas e estrutura demográfica (Dobzhansky, 1970; Krimbas & Powell, 1992; Singh, 2001).

2.2. - Inversões e a seleção natural

Populações experimentais. Dobzhansky com seus colaboradores (Wright & Dobzhansky, 1946) foram os primeiros a demonstrar a utilidade das caixas populacionais na observação direta da dinâmica evolutiva das inversões. Os estudos mais completos e elaborados foram feitos com

D. pseudoobscura, mas inversões foram estudadas também em populações experimentais de várias espécies (para revisão veja Powell, 1997). Nos seus experimentos clássicos, Dobzhansky observava comportamento de dois arranjos gênicos oriundos da mesma população, introduzidos em proporções diferentes ao formar várias populações experimentais. Os experimentos eram consistentes: sempre um polimorfismo estável evoluía independentemente das frequências iniciais das inversões e houve uma repetibilidade alta dos resultados. Os coeficientes de seleção calculados foram da ordem de 0,1–0,8; o que implica numa seleção extremamente forte. É necessário mencionar que o cálculo foi baseado na suposição que o valor adaptativo de um cariótipo é constante e não depende da sua frequência na população. Dobzhansky explicou os resultados desses experimentos com valor adaptativo superior dos heterocariótipos, heterose (Dobzhansky, 1970). Porém, com igual sucesso, os resultados podem ser explicados admitindo seleção dependente da frequência (Krimbas & Powell, 1992). Experimentos com maior número de arranjos gênicos também foram feitos. Os resultados nem sempre eram previsíveis e o equilíbrio dependia das frequências iniciais dos arranjos.

Os resultados de maior interesse foram obtidos nos experimentos com arranjos gênicos com origem geográfica diferente. Quando os dois arranjos eram oriundos de uma mesma população, o equilíbrio se estabelecia repetidamente, mas quando os arranjos procederam de populações distintas, o resultado era errático e nem sempre era alcançado um equilíbrio estável. Isso levou Dobzhansky a formular hipótese de **coadaptação**. Primeiro, os genes dentro de um arranjo gênico são coadaptados entre si produzindo um genoma haplóide balanceado fisiologicamente ou coadaptado, provavelmente através de interações epistáticas. Depois, os arranjos gênicos alternativos de mesma origem geográfica são coadaptados entre si, produzindo aptidão heterótica superior à dos homocariótipos, o que não vale para arranjos procedentes de populações distintas. Este último fato indica que, ao longo da sua história, inversões acumulam variabilidade genética sujeita à seleção natural. (Dobzhansky, 1970; Krimbas & Powell, 1992)

Populações naturais. A ausência de modificações visuais na aparência externa de uma mosca, independentemente dos arranjos gênicos de seus cromossomos, levou inicialmente a uma convicção errônea de que as inversões seriam adaptativamente neutras. Mas os estudos posteriores das variações sazonais cíclicas nas frequências das inversões de *D. pseudoobscura* forneceram o primeiro indício convincente da atuação da seleção natural sobre estes polimorfismos (Dobzhansky, 1970). As modificações genéticas sazonais pareceram

surpreendentes no momento de sua descoberta pois, devido à rapidez com que se processam, foi preciso admitir uma pressão de seleção muito alta. Com isto, Dobzhansky inaugurou um campo de estudos de polimorfismos cromossômicos que tem se mostrando muito produtivo. Igualmente, variações sazonais nas frequências das inversões foram observadas em outras espécies do gênero *Drosophila* (para revisão veja Powell, 1997).

Atualmente, várias evidências indiretas demonstram a ação da seleção natural nas inversões. Além das variações sazonais, a diferenciação espacial vem sendo observada. Dois tipos de padrão geográfico podem ser distinguidos: heterogêneo e homogêneo (bem mais raro). Um exemplo de homogeneidade geográfica é *D. pavani* no Chile. As populações naturais desta espécie mostram as frequências quase uniformes de arranjos gênicos em toda área da sua distribuição (Brncic, 1973).

Quando se observa uma heterogeneidade em frequências de inversões, esta frequentemente é atribuída à seleção. Cline é um dos tipos de diferenciação geográfica mais citados em favor de seleção. Considera-se que os clines latitudinais são uma consequência da resposta adaptativa às diferenças climáticas. Este argumento é reforçado nos casos em que paralelismos são observados entre continentes que abrigam populações com histórias diferentes. Os clines geográficos mais estudados são os de *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. subobscura*, *D. robusta* e *D. willistoni* (para revisão veja Krimbas & Powell, 1992).

Os clines geográficos, que correm na direção norte-sul, são extremamente marcantes em *D. subobscura*. Na Europa, a variação na frequência das inversões mostra uma correlação muito alta com as variáveis climáticas, temperatura e umidade. Aparentemente, as temperaturas anuais, máxima e mínima, são responsáveis por esta correlação (Menozzi & Krimbas, 1992). Logo depois da invasão da América do Sul (Chile) e América do Norte por *D. subobscura* no final dos anos 70, os clines nas frequências dos arranjos gênicos se formaram, enquanto a espécie ainda estava em processo de expansão (Prevosti *et al.*, 1988). Os clines na América do Sul se estabeleceram e aprofundaram com o tempo e atualmente mostram o mesmo padrão encontrado na Europa, porém invertido, como seria esperado a partir da direção invertida das condições climáticas no Hemisfério Sul (Prevosti *et al.*, 1990). Variações sazonais nas frequências de inversões desta espécie também foram encontradas (Rodriguez-Trelles *et al.*, 1996).

Em *D. melanogaster*, quatro inversões são cosmopolitas, isto é, são encontradas com frequências razoavelmente altas em muitas populações do mundo. Cada braço dos dois cromossomos metacêntricos grandes possui uma dessas inversões. Clines latitudinais foram encontrados nos dois hemisférios (Lemeunier & Aulard, 1992). Em populações da América, Europa e Austrália, as frequências destes arranjos mostram uma correlação com a latitude (Knibb, 1982).

A altitude é uma outra variável estudada em relação à distribuição espacial das frequências de inversões. Os clines altitudinais foram encontradas em várias espécies de *Drosophila* (para revisão veja Powell, 1997). *D. robusta* é especialmente notável, pois esta espécie dispõe de clines altitudinais semelhantes em ampla área geográfica (Etges, 1984), o que pode servir como evidência da ação da seleção na formação dos clines altitudinais desta espécie. Além disso, os dois tipos de clines, altitudinal e latitudinal, se encontram em conformidade: arranjos gênicos do norte são encontrados em altas altitudes, mas diminuem de frequência com a altitude (Etges, 1984).

Populações marginais. Maior homogeneidade das populações marginais foi observada inicialmente para espécies polimórficas fenotipicamente (Mayr, 1963). Ainda mais, o monomorfismo maior de populações marginais se estende para variações cromossômicas. O padrão geral é populações do centro da distribuição mostrando alto grau de heterozigosidade para inversões, enquanto na direção das margens esta diminui, chegando até ao monomorfismo cromossômico, em muitos casos. Soulé (1973) menciona 15 espécies de *Drosophila* que seguem este padrão. Uma das dificuldades do modelo centro-margem é o relacionamento entre marginalidade periférica e ecológica. Usualmente, está implícito que a marginalidade ecológica prevalece em áreas periféricas. Porém, não se pode excluir a possibilidade de que certas características das populações periféricas podem resultar de eventos históricos e não de seleção imposta pelas condições extremas ecologicamente (Powell, 1997).

Da Cunha e Dobzhansky (1954) propuseram a hipótese de que o nível de polimorfismos em populações de *D. willistoni* está diretamente relacionado à diversidade de habitat ocupado pelas populações. Para quantificar a heterogeneidade ecológica, foi proposto um índice de diversidade de habitat, baseado em variação biótica (número das espécies vegetais) e abiótica (temperatura). Eles mostraram que existe uma correlação positiva alta entre heterozigosidade

para inversões e o índice. A idéia é que uma população em ambiente mais diversificado pode manter mais inversões, pois cada cariótipo vai encontrar um nicho onde possui superioridade em valor adaptativo. Na direção das margens da área de distribuição, a espécie encontra menos ambientes favoráveis e, assim, menos inversões podem ser mantidas.

Carson (1958) apresentou uma hipótese diferente, enfatizando o papel das inversões como repressores de recombinação. Ele achava que as inversões não estão relacionadas aos componentes específicos do ambiente, mas contribuem para um vigor geral em heterozigose. Altos níveis de heterozigosidade cromossômica estrutural são vantajosos no centro de extensão de uma espécie porque o efeito heterótico leva a um melhor desempenho em todos os tipos de habitat disponíveis. Além disso, populações centrais podem tolerar melhor a produção de homozigotos com valor adaptativo menor. A taxa de recombinação reduzida protege genótipos selecionados previamente de serem quebrados. Por outro lado, em populações marginais, pequenas e freqüentemente instáveis, os fenótipos extremos produzidos por homozigotos podem ser vantajosos. Em homozigotos a recombinação é maior, o que aumenta a flexibilidade adaptativa das populações em ambiente instável. A seleção que elimina o polimorfismo cromossômico aumentando a flexibilidade de uma população em habitat marginal foi chamada homoseleção, enquanto a seleção de heterocariótipos em populações centrais — heteroseleção.

As duas hipóteses acima mencionadas prevêm diminuição de diversidade genética e de inversões nas populações marginais, o que não encontra apoio nos dados de variação de alozimas; as populações marginais mostram heterozigosidade total próxima à de populações centrais. Lewontin (1974) modificou a hipótese de Carson, reenfatizando o fator de recombinação em vez de homozigosidade genética. De acordo com Lewontin, a instabilidade dos habitats marginais favorece a flexibilidade adaptativa, aumentada em cromossomos homozigotos estruturalmente, mas heterozigotos geneticamente. Existem também outras hipóteses visando a explicação deste fenômeno. Independentemente da variedade dos mecanismos genéticos sugeridos, todas estas hipóteses admitem a seleção natural como um fator principal (Krimbas & Powell, 1992; Powell, 1997; Krimbas & Powell, 2000).

2.3. - Outros aspectos

Os recentes avanços da genética molecular permitiram analisar a variabilidade no nível de nucleotídeos e fluxo gênico entre rearranjos (Navarro *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 2000;

Andolfatto, 2001; Andolfatto *et al.*, 2001; Laayouni *et al.*, 2003). Alguns resultados interessantes surgiram. Um dos principais, é que os dados moleculares comprovam a origem única de inversões (Andolfatto *et al.* 1999).

A respeito da manutenção dos polimorfismos de inversões, os dados estão em melhor consonância com o modelo de polimorfismo balanceado recente (Andolfatto *et al.* 1999), entretanto, uma história evolutiva neutra para as inversões não pode ser descartada (Innan & Tajima, 1997). Em vista das evidências independentes da seleção natural atuando nas inversões, existe a possibilidade de que as frequências de inversões sejam determinadas por episódios de seleção direcional intercalados com episódios curtos de seleção balanceada (Andolfatto *et al.* 2001).

Os estudos sobre fluxo gênico entre rearranjos resultaram na reavaliação do papel de mutações cromossômicas na especiação: uma nova série de modelos sugere que os rearranjos cromossômicos podem servir como barreiras genéticas fortes através da redução de recombinação em heterozigotos, facilitando a divergência nas regiões invertidas.(Navarro & Barton, 2003¹; Navarro & Barton, 2003²; Rieseberg & Livingstone, 2003).

3. - *Drosophila mediopunctata* Dobzhansky & Pavan 1943

3.1. - Distribuição e biologia

Drosophila mediopunctata é uma espécie do grupo *tripunctata* do subgênero *Drosophila*. Atualmente, o grupo é dividido em quatro subgrupos (Frota-Pessoa, 1954) e contém 56 espécies (Vilela, 1992). Além disso, mais duas espécies foram descritas recentemente (Bächli, *et al.*, 2000). O grupo representa o segundo maior grupo em número de espécies excedido apenas pelo grupo *repleta* (Val *et al.*, 1981).

D. mediopunctata é bastante comum em várias localidades da América Latina, especialmente no inverno (Saavedra *et al.*, 1995). Sua distribuição geográfica conhecida se estende de El-Salvador até o sul do Brasil (Frota-Pessoa, 1954; Val *et al.*, 1981). Alguns aspectos biológicos fazem de *D. mediopunctata* um modelo interessante para estudos da genética das populações naturais (Klaczko, 1995). O seu ciclo de vida é bem diferente das outras espécies comuns em estudos genéticos, cuja maioria pertence ao subgênero *Sophophora*, como *D.*

melanogaster e *D. pseudoobscura*. *D. mediopunctata* tem um tempo longo de maturidade, começando a pôr ovos no sétimo dia depois de eclodir, tem fecundidade relativamente baixa e a longevidade estendida.

3.2. - Variação morfológica

Uma série de estudos foi feita para caracterizar a variação morfológica da asa de *D. mediopunctata* em populações naturais, bem como no laboratório. Foi desenvolvido um método original para analisar a asa de *Drosophila* como uma figura geométrica, a elipse, que foi aplicado para análise da variação na asa de *D. mediopunctata* (Klaczko & Bitner-Mathé, 1990; Bitner-Mathe & Klaczko, 1999).

Outra estrutura estudada é a arista. A arista de *Drosophila* é uma estrutura ramificada composta por três segmentos antenais, o que abre a possibilidade de caracterizá-la numericamente em termos do número de ramos. A análise de sua variação em *D. mediopunctata* mostrou que existe uma significativa influência ambiental: fêmeas do campo possuíam menos ramos do que suas filhas criadas em laboratório. Contudo, altitude e mudanças sazonais não tinham efeito sobre o número de ramos (Bitner-Mathé & Klaczko, 1998). Futuros estudos sobre a base genética e fatores ambientais que são responsáveis por esta variação podem ser interessantes.

Uma das características típicas do grupo *tripunctata* é a presença de três manchas escuras no quarto, quinto e sexto tergitos abdominais. Entretanto, em algumas espécies do grupo este padrão é variável, tal é o caso de *D. mediopunctata* (Frota-Pessoa, 1954). Foi possível determinar a influência da temperatura e concluir que esta tem um efeito intenso sobre o polimorfismo (Hatadani, 2002). A análise genética mostrou que o segundo cromossomo tem maior importância na determinação genética do polimorfismo. Além disto encontrou-se uma associação não aleatória entre o número de manchas e as inversões *PA0* e *PC0* (Hatadani, 2002).

3.3. - "Sex ratio"

O fenômeno de "sex ratio" é caracterizado pela produção excessiva na prole de um dos sexos, em geral de fêmeas, distorcendo a proporção sexual 1:1. Vários fatores podem ser responsáveis pelo fenômeno, encontrado em várias espécies de *Drosophila* (Powell, 1997). Em *D. mediopunctata*, impulso meiótico do cromossomo X contra o Y causa a produção excessiva de

fêmeas. O cromossomo X, que dirige este impulso (usualmente chamado "SR"), carrega inversões cromossômicas específicas. O cromossomo X normal ("ST") é transmitido por machos para metade da sua prole (ou seja, para as filhas), enquanto o cromossomo SR consegue atingir até 100% de transmissão. O caráter "sex ratio" encontrado em *D. mediopunctata* está associado à inversão $In(X)2$ (Carvalho *et al.*, 1989). Graças a suas vantagens durante a meiose, a expectativa é de aumento na frequência do cromossomo SR, o que não acontece nas populações naturais de *D. mediopunctata*. Por exemplo, no Parque Nacional do Itatiaia, a frequência de cromossomo SR manteve-se estável em torno de 13% no período de 1987 – 1996 (Carvalho *et al.*, 1989; Carvalho *et al.*, 1997).

A expressão de "sex ratio" em *D. mediopunctata* é bastante variável com produção de machos férteis de 0% até 65% (Klaczko, 1995). A análise da base genética desta variação mostrou que na população de Itatiaia existe um sistema complexo de supressores do caráter (Carvalho & Klaczko, 1994; Carvalho *et al.*, 1997). Supressores também foram encontrados em autossomos de *D. mediopunctata*, um para cada grande autossomo, com um maior efeito localizado no cromossomo IV (Carvalho & Klaczko, 1993).

3.4. - Elementos *P*

Seqüências homólogas aos elementos *P* de *D. melanogaster* foram identificadas em *D. mediopunctata* (Loreto *et al.*, 1998). O genoma de *D. mediopunctata* possui de três até cinco cópias do elemento *P*. Um sítio de inserção é fixo, enquanto os outros provavelmente são polimórficos, o que indica atividade relativamente recente do elemento *P*. Este foi o primeiro caso de presença de um elemento *P* canônico encontrado fora do subgênero *Sophophora* (Loreto *et al.*, 2001).

3.5. - Polimorfismo cromossômico

D. mediopunctata tem cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos pontuais, o qual não se politeniza. Kastritsis (1966) publicou mapas dos cromossomos politênicos de espécies do grupo *tripunctata*, incluindo um mapa para *D. mediopunctata*. No entanto, os mapas têm baixa resolução, por isso o número de bandas só pode ser estimado em aproximadamente 1200 para *D. mediopunctata*. Neste mesmo trabalho, o autor relata ter encontrado apenas dois arranjos no segundo cromossomo desta espécie. Entretanto,

somente uma linhagem isofêmea foi analisada, o que explica o pequeno número de inversões encontrado. Os estudos subsequentes mostraram que cromossomos X, II e IV apresentam polimorfismo de inversões (Klaczko *et al.*, 1990; Peixoto & Klaczko, 1991).

O cromossomo X possui quatro arranjos gênicos: *Padrão* e três inversões. Existe um forte desequilíbrio de ligação entre as inversões *In(X)1* e *In(X)2*; desta forma, praticamente só se encontram três haplótipos: *Padrão*; *In(X)1+In(X)2*; e *In(X)3*.

O cromossomo II é o mais polimórfico com 17 inversões. Para simplificar a descrição, as inversões podem ser divididas em dois grupos, distal e proximal, conforme a sua posição no cromossomo. O grupo distal possui oito inversões: *DA*, *DI*, *DS*, *DP*, *DV*, *DR*, *DL*, e *DJ*. Na região proximal encontram-se nove inversões: *PC0*, *PC1*, *PC2*, *PC3*, *PC4*, *PC5*, *PB0*, *PA0*, e *PA8* (Peixoto & Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2002).

Praticamente em qualquer combinação de inversões distais e proximais não há sobreposição entre as duas regiões. Em princípio, a recombinação entre as inversões distais e proximais pode ocorrer, no entanto existe um forte desequilíbrio de ligação e o número de configurações realmente encontradas nas populações de campo é reduzido. Por exemplo, *DA* está associado a *PA0* ($D' = 0,98$), *DP* associado a *PC0* ($D' = 0,97$), e *DS* a *PC0* ($D' = 0,95$) (Peixoto & Klaczko 1991; Zapata, 2000).

4. - Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

1. Elaborar um novo mapa dos cromossomos politênicos de *D. mediopunctata* com boa resolução.
2. Localizar os pontos de quebra de todos os rearranjos cromossômicos conhecidos de *D. mediopunctata*.
3. Examinar a variação geográfica das frequências das inversões do segundo cromossomo de *D. mediopunctata*.

5. - Organização da tese

A tese está organizada da seguinte forma: introdução geral, dois artigos, apêndice e a conclusão geral. O primeiro artigo, "Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*", foi publicado na revista "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz" (Rio de Janeiro, 2002, Jul., v. 97, n. 5, p. 691-694). O segundo artigo "Chromosomal Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: Seasonal, Altitudinal, and Latitudinal Variation" foi aceito à publicação na revista "Genetics and Molecular Biology" da Sociedade Brasileira de Genética. No apêndice se encontram os resultados de mapeamento dos dois rearranjos artificiais: *Delta3* e *Antennapedia*.

6. - Contribuição da autora

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida pelo Prof. Louis Bernard Klaczko desde década de 80, na qual são estudados diversos aspectos de biologia e genética de *Drosophila mediopunctata*.

Fazem parte do trabalho que eu desenvolvi durante o doutorado a análise citogenética das populações de *D. mediopunctata* de Campinas, Serra do Japi e Porto Alegre, a análise da variação das frequências de inversões nessas populações, a elaboração de um mapa dos cromossomos politênicos de *D. mediopunctata* e o mapeamento de pontos de quebra de todos os rearranjos cromossômicos encontrados em *D. mediopunctata*.

Dessa forma, estão apresentados nos artigos, mas não fazem parte de meus trabalhos de doutorado: a análise da variação sazonal e altitudinal das frequências de inversões de *D. mediopunctata* no Parque Nacional do Itatiaia, a análise filogenética das inversões de *D. mediopunctata* (eu somente formalizei essa análise em termos citogenéticos), que foram desenvolvidos pelos demais co-autores dos respectivos artigos.

Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*

Galina Ananina, Alexandre A Peixoto*, Wilma N Souza, Louis B Klaczko⁺

Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Caixa Postal 6109, 13083-9790 Campinas, SP, Brasil *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Drosophila mediopunctata belongs to the tripunctata group, and is one of the commonest *Drosophila* species collected in some places in Brazil, especially in the winter. A standard map of the polytene chromosomes is presented. The breakpoints of the naturally occurring chromosomal rearrangements are marked on the map. The distribution of breaking points through the chromosomes of *D. mediopunctata* is apparently non-random. Chromosomes X, II and IV show inversion polymorphisms. Chromosome II is the most polymorphic, with 17 inversions, 8 inversions in the distal region and 9 in the proximal region. Chromosome X has four different gene arrangements, while chromosome IV has only two.

Key words: linkage disequilibrium - gene order - cytogenetic analysis - chromosome mapping

Drosophila mediopunctata is a Neotropical species with a wide geographical distribution, found in many parts of Brazil and in El Salvador (Val et al. 1981). In some areas, particularly in the South or at high altitudes during the winter, it may be the commonest of the *Drosophila* species collected (Saavedra et al. 1995). *D. mediopunctata* belongs to the tripunctata group (Frota-Pessoa 1954), which is the second largest group of the Neotropical region (Vilela 1992). Its identification is relatively easy, contrasting with most species of the group that are difficult to identify (Vilela 1992). Various aspects of its biology make *D. mediopunctata* an interesting model for studies of the genetics of natural populations (for a review and discussion, see Klaczko 1995).

D. mediopunctata has 5 pairs of acrocentric chromosomes and a pair of dots (Kastritsis 1966). Chromosomes X, II and IV show inversion polymorphisms. Chromosome II is the most polymorphic with 17 inversions. Chromosome X has four different gene arrangements, one of them associated to the "sex-ratio" phenomenon. Chromosome IV has only two gene arrangements (Carvalho et al. 1989, Klaczko et al. 1990, Peixoto & Klaczko 1991).

The presence of chromosome inversion polymorphisms is typical of various species of *Drosophila* (Krimbas & Powell 1992, 2000). These polymorphisms are often under selection, being dynamic with seasonal, geographical and long-term frequency variations (Sperlich & Pfriem 1986, Anderson et al. 1991). In *D. mediopunctata*

we also found seasonal, micro- and macrogeographic variations in the frequencies of the karyotypes (Klaczko 1995). Moreover, there are differences among karyotypes for characters associated with fitness, such as size and shape (Bitner-Mathé et al. 1995).

Kastritsis (1966) made a map of the polytene chromosomes of *D. mediopunctata* using a single isofemale line. However, he was able to identify two inversions on chromosome II. We now present a more detailed map, locating the breaking points of all the inversions.

MATERIALS AND METHODS

Strains used and field collection - To analyse the gene arrangements, we used *D. mediopunctata* isofemale lines maintained in our laboratory (Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de Drosophilídeos, Unicamp, Brazil). They were originally set up with flies collected in various places in Brazil (Atibaia, SP; Campinas, SP; Itatiaia, MG; Juiz de Fora, MG; Jundiaí, SP; Porto Alegre, RS). This ensured the sampling of the most common inversions. To obtain the missing arrangements, we made field trips to the Reserva Santa Genebra (Campinas, SP) and to the Japi Mountains (Jundiaí, SP). However, the mapping of some very rare inversions (*DL*, *PA8*, *PC5* and *PC3*) was based only on the analysis of old chromosome preparations and of photographs from the laboratory collection.

In the field collections, we used fermented banana baits or traps, as described in Peixoto and Klaczko (1991) and Medeiros and Klaczko (1999). The analysis methodology followed the procedure described by Peixoto and Klaczko (1991).

Preparation of the polytene chromosomes - The polytene chromosomes were prepared using third instar larvae, following the method described by Ashburner (1989), with 1N HCl and lacto-acetic orcein.

Map drawing - Various drawings of *D. mediopunctata* polytene chromosomes were made using a camera lucida (1700x magnification). To prepare the consensus map, we used up to 10 drawings for each region from different nuclei.

Supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes); Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (Fapesp); Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (Faep-Unicamp).

⁺Corresponding author. Fax: +55-19-378.86535. E-mail: LBK@unicamp.br

Received 12 November 2001

Accepted 6 February 2002

RESULTS AND DISCUSSION

Cytological map - The cytological map of the five acrocentric chromosomes of *D. mediopunctata* is shown in Fig. 1. We followed the convention of Bridges (1935) in *D. melanogaster*, dividing the polytene chromosomes of *D. mediopunctata* in a total of 100 regions, numbered from 1 to 100. Each chromosome has 20 segments and a remarkable band at the beginning of each segment. The numerical regions were subdivided in smaller fragments named with letters.

In the map published by Kastritsis (1966) each chromosome was divided in 10-11 segments named with letters. Our map is more detailed, but we preserved, whenever possible, Kastritsis divisions. However, we adopted numbers for the description of inversions, since it is more convenient, except for the second chromosome (see below).

In the map presented, there are 372 bands in chromosome X; 422 in chromosome II; 446 in chromosome III; 440 in chromosome IV; and 431 in chromosome V; with a total of 2,111 bands.

In spite of the misleading simplicity, the exact determination of the number of bands in the cytological maps remains an unsolved problem. In species of Diptera, the numbers vary from 1,500 to 5,000. It is unlikely that this is due to a fundamental genomic variation. Of course, there

are objective and subjective factors that affect the determination of the number of bands. We now know that artifacts of fixation with acetic acid cause the appearance of double bands and consequently an overestimate of the number of bands. Moreover the identification of bands depends also on the physiological state of the cell, on the degree of polytenization and on the stretching of the chromosomes. Using electron microscopy in three species, (*Chironomus tentans*, *D. melanogaster* and *D. hydei*) the best estimates of the number of bands were obtained as being around 3,500. This number is considered typical for all Diptera. But, in chromosomes normally stretched, 2,500 bands can usually be identified (Zhimulev 1996). Thus, the number we obtained in our work (2,111) corresponds to the normal stretching of the chromosomes.

Description of the gene arrangements - The most convenient way to describe a gene arrangement is by comparison to a standard. For chromosomes X, III, IV and V we chose the commonest configuration in natural populations as the standard. For the second chromosome there are too many arrangements and no single one can be considered the most representative of the species. We chose *DI-PC0* as standard, since both *DI* and *PC0* are, respectively, the probable ancestrals for the distal and proximal regions (Peixoto & Klaczko 1991). The breaking points for each of the inversions are shown in Fig. 1.

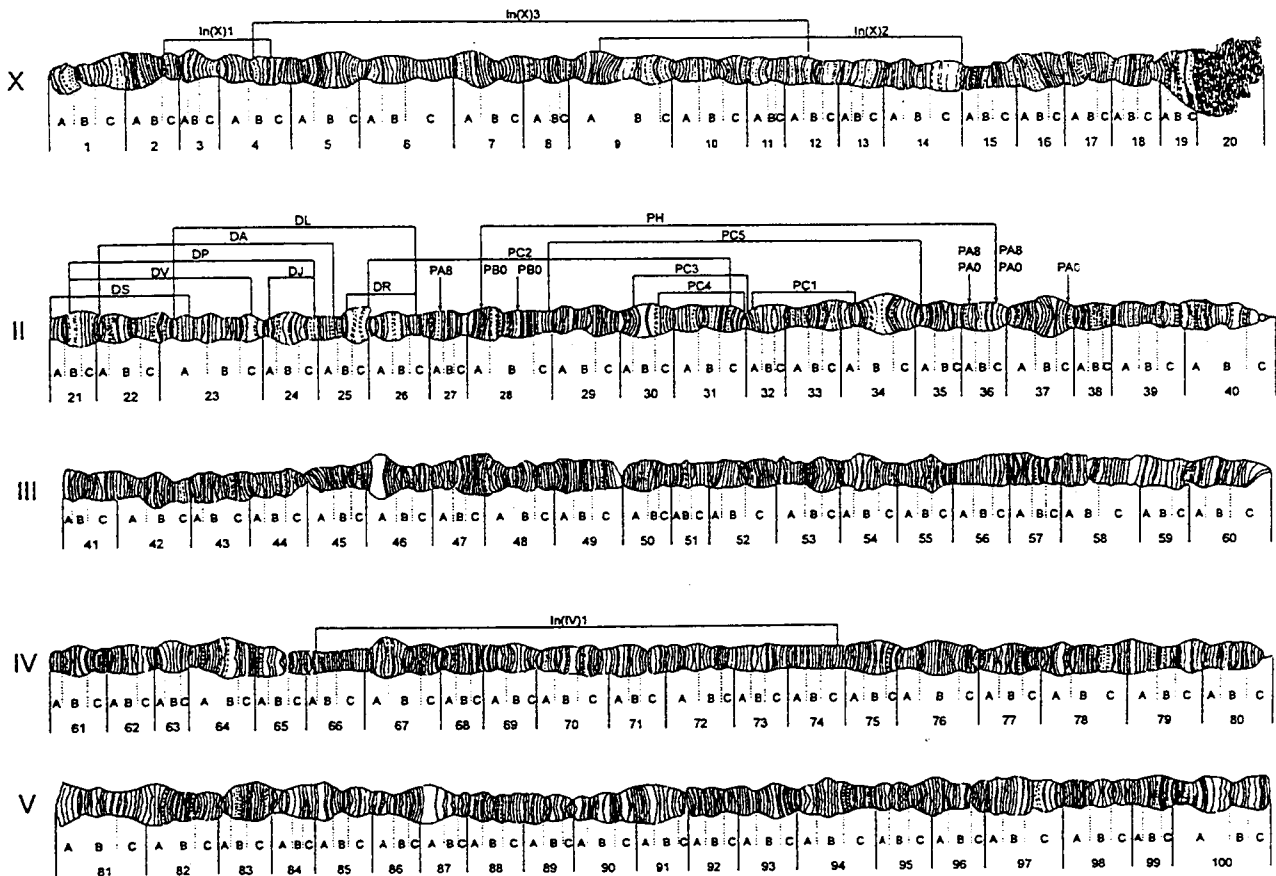


Fig. 1: polytene chromosome map of *Drosophila mediopunctata* with inversion breakpoints presented. Centromeres are shown to the right, telomeres to the left.

Chromosome II is the most polymorphic for inversions. Its complexity can be simplified by assigning the inversions to two groups according to the chromosome region: distal and proximal. Figs 2A, D show, respectively, the double heterokaryotypes *DA-PA0/DI-PB0* and *DS-PC0/DI-PB0* which are characteristic of the configurations found in nature and where one can clearly see the two regions. The distal group includes 8 inversions: *DI*, *DS*, *DV*, *DP*, *DA*, *DL*, *DR* and *DJ*. In the proximal region, there are 9 inversions: *PC0*, *PC1*, *PC2*, *PC3*, *PC4*, *PC5*, *PB0*, *PA0* and *PA8*. Figs 2B, C, E show, respectively the heterokaryotypes *DP/DI*, *DV/DI*, and *PA0/PC0*.

In almost all combinations between proximal and distal inversions there is no overlap between the two regions. Thus, in principle recombination between them can occur. However, there is a very strong linkage disequilibrium and consequently, the number of configurations found in nature is reduced (Peixoto & Klaczko 1991).

The distal inversions and their relation to *DI* are shown diagrammatically in Fig. 1. Inversion *DJ* is presented as a separated arrangement, but it is nearly always found associated to *DV* which is also a distal inversion. This latter can be found isolated with good frequency. The combination *DV+DJ* was previously called *DT* (Peixoto & Klaczko 1991).

The proximal inversions can be divided in three phylads (Dobzhansky 1970): *PC*, *PB* and *PA*. The phylad

PC (Fig. 1) is made up of six gene arrangements: *PC0*, *PC1*, *PC2*, *PC3*, *PC4* and *PC5*. These latter five can be considered derived from *PC0*.

The *PA* phylad has two gene arrangements: *PA0* and *PA8* (Fig. 1). *PA0* is complex, since it is an intrachromosomal transposition of two inverted fragments: *In(2)PA0* [= *In(2)28A; 36A; 36C; 37C*]. The heterokaryotypes *PC0/PA0* and *PB0/PA0* display complicated configurations (with segments 36A-36C always unpaired).

PB0 is isolated in the *PB* phylad (Fig. 1). Compared to *PC0*, it is an inverted insertional transposition in the second chromosome: *In(2)PB0* [= *In(2)28A; 28B; 36C*].

The arrangements *PA0*, *PB0* and *PC0* are overlapping inversions. This allows us to make inferences about their phylogenetic relations (Dobzhansky & Sturtevant 1938). If compared, one can not relate any two of these inversions through a single inversion event. However, it is possible to assume and draw a hypothetical arrangement (*PH*) that is a parsimonious explanation relating the three gene inversions (Fig. 3) as it was done with the chromosomes of *D. pseudoobscura* (Dobzhansky 1970).

Chromosome X has four gene arrangements: *Standard*, *1*, *2* and *3* (Fig. 1). There is a strong linkage disequilibrium between *In(X)1* and *In(X)2*. They are often found together (Peixoto & Klaczko 1991).

In chromosome IV, aside from the *Standard* gene arrangement, we found only one inversion, *In(IV)1* (Fig. 1).

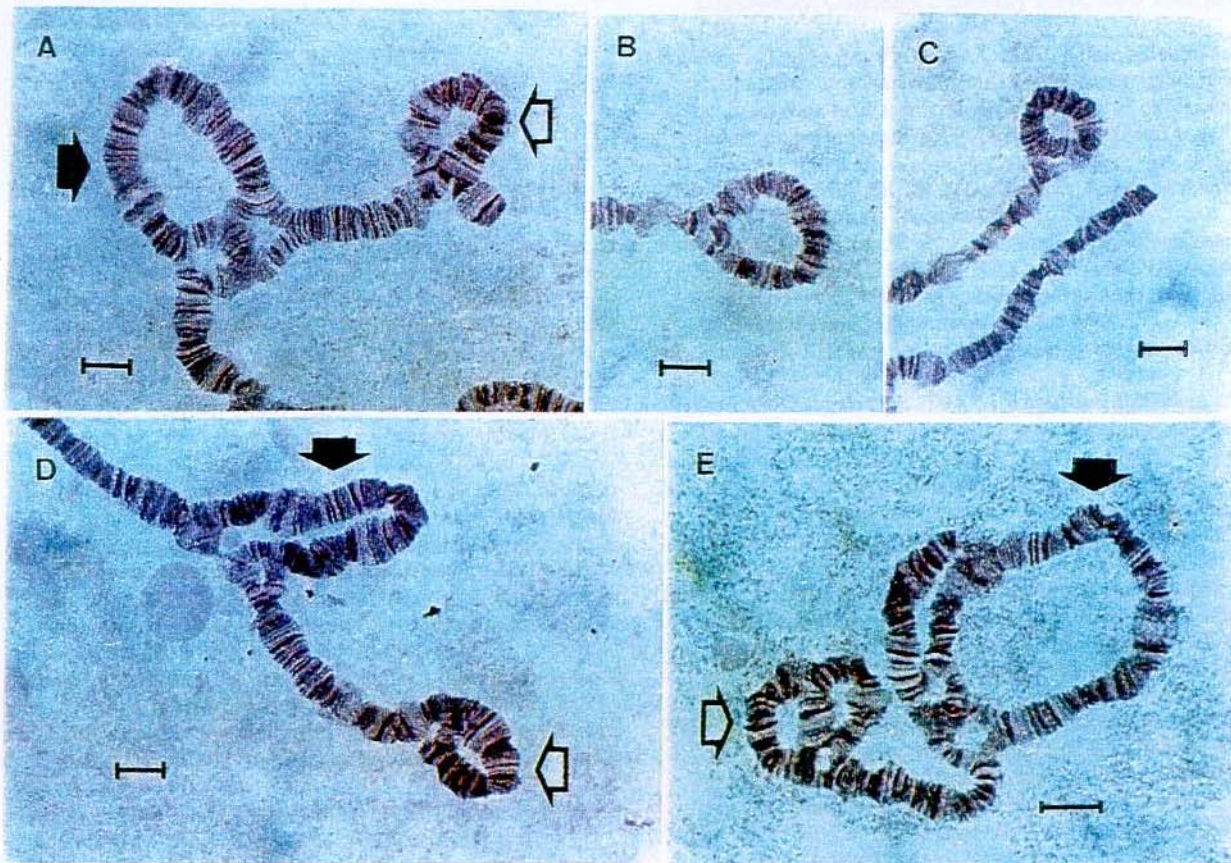


Fig. 2: the most frequent inversions of *Drosophila mediopunctata*. A: *DA-PA0/DI-PB0*; B: *DP/DI*; C: *DV/DI*; D: *DS-PC0/DI-PB0*; E: *DA-PA0/DS-PC0*. The open arrows point to the distal region and the closed arrows to the proximal region. Bar = 100 μ m

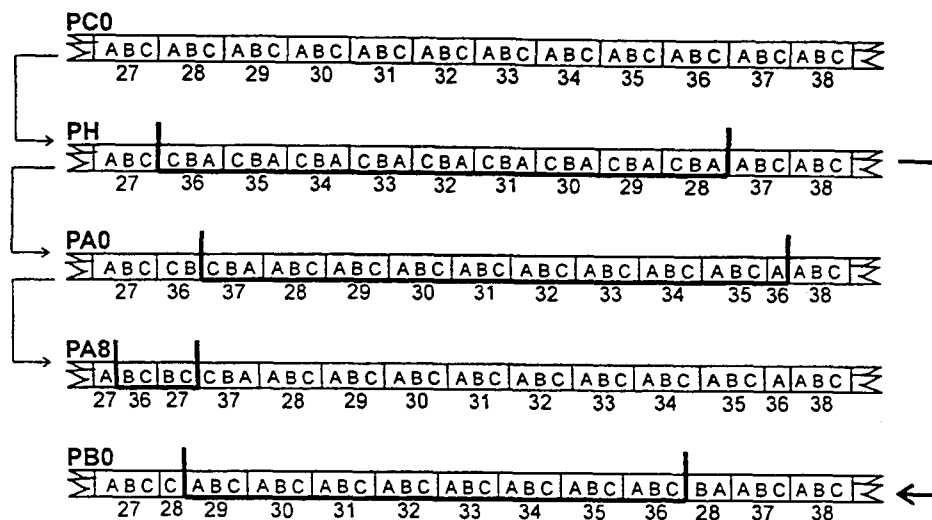


Fig. 3: diagram of the proximal inversions showing the sections and subdivisions of the standard map. PC0 is considered to be the ancestral. PH is a hypothetical rearrangement that is a parsimonious explanation to relate PA0, PB0 and PC0. PA8 is probably derived from PA0.

The distribution of breaking points through the chromosomes of *D. mediopunctata* is apparently non-random. The second chromosome is the most saturated. In this chromosome, we found a subterminal inversion [*In(2)DS*, Fig. 1], but no subbasal inversions. The majority of the breaking points are found in its distal half portion. In some cases, different inversions share cytologically the same breaking point (Fig. 1).

ACKNOWLEDGEMENTS

To Hermes F Medeiros and Horácio Montenegro for the decisive help in field collections, to Maria Aparecida Ramos Libânio for technical help, and to Edward Hogan for correcting the English version.

REFERENCES

- Anderson WW, Arnold J, Baldwin DG, Beckenbach AT, Brown CJ, Bryant SH, Coyne JA, Harshman LG, Heed WB, Jeffery DE, Klaczko LB, Moore BC, Portert 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.
- Ashburner M 1989. *Drosophila: A Laboratory Manual*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 31.
- Bitner-Mathé BC, Peixoto AA, Klaczko LB 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* 75: 54-61.
- Bridges CB 1935. Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Hered* 26: 60-64.
- Carvalho AB, Peixoto AA, Klaczko LB 1989. Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* 62: 425-428.
- Dobzhansky Th, Sturtevant AH 1938. Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 23: 28-64.
- Dobzhansky Th 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*, Columbia University Press, New York, 505 pp.
- Frota-Pessoa O 1954. *Revision of the Tripunctata Group of Drosophila with Description of Fifteen New Species (Drosophilidae, Diptera)*, João Haupt & Cia. Ltda., Curitiba, p. 254-304.
- Kastritsis CD 1966. *Cytological Studies of Some Species of the tripunctata Group of Drosophila*, Univ Texas Publs, Texas, p. 413-474.
- Klaczko LB 1995. Population genetics of *Drosophila mediopunctata*. In L Levine, *Genetics of Natural Populations. The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*, Columbia University Press, New York, p. 140-153.
- 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.
- Krimbas CB, Powell JR 1992. *Drosophila Inversion Polymorphism*, CRC Press, Boca Raton, FL, 560 pp.
- Krimbas CB, Powell JR 2000. Inversion polymorphisms in *Drosophila*. In RS Singh, CB Krimbas (eds), *Evolutionary Genetics: from Molecules to Morphology*, Vol. 1, Cambridge University Press, Cambridge, p. 284-299.
- Medeiros HF, Klaczko LB 1999. A weakly biased *Drosophila* trap. *DIS* 82: 100-102.
- Peixoto AA, Klaczko LB 1991. Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. *Genetics* 129: 773-777.
- Saavedra CC, Callegari-Jacques SM, Napp M, Valente VLS 1995. A descriptive and analytical study of neotropical drosophilid communities. *J Zool Syst Evol Research* 33: 62-74.
- Sperlich D, Pfriem P 1986. Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In M Ashburner, HL Carson, JN Thompson Jr (eds), *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 3e, Academic Press, New York, p. 257-309.
- Val FC, Vilela CR, Marques MD 1981. Drosophilidae of the Neotropical Region. In M Ashburner, HL Carson, JN Thompson Jr (eds), *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3a, Academic Press, New York, p. 123-168.
- Vilela CR 1992. On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev Bras Ent* 36: 197-221.
- Zhimulev IF 1996. Morphology and structure of polytene chromosomes. *Adv Genet* 34: 1-497.

Chromosomal Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*:

Seasonal, Altitudinal, and Latitudinal Variation

Galina Ananina¹, Alexandre A. Peixoto², Blanche C. Bitner-Mathé³, Wilma N. Souza¹,

Luciano Basso da Silva⁴, Vera L. S. Valente⁵, and Louis B. Klaczko^{1,†}

¹ Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Cx. Postal 6109, Campinas 13084-971 SP, Brazil.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, 21045-900, RJ, Brazil

³ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cx. Postal 68011, Rio De Janeiro 21944-970 RJ, Brazil

⁴ Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

⁵ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande Sul. Caixa Postal 15053, Porto Alegre, 91501-970 RS, Brazil

† corresponding author: LBK@unicamp.br

running title: Chromosome Inversions in *D. mediopunctata*

Keywords: cline, microgeographic variation, temperature, *tripunctata* group, Brazil

Abstract

The most polymorphic chromosome for inversions in *Drosophila mediopunctata* is the chromosome II, where 17 inversions have been found, eight of which occur in the distal region and nine in the proximal region. We present an analysis of the chromosome II inversion polymorphism with respect to seasonal, altitudinal and latitudinal variation. In *D. mediopunctata* from the Parque Nacional do Itatiaia (southeastern Brazil), the frequencies of three of the distal inversions (namely *DA*, *DS*, and *DP*) vary seasonally. These inversions also show altitudinal

clines in their frequencies. This microgeographic pattern was not observed on a macrogeographic scale. *D. mediopunctata* from Porto Alegre are less polymorphic for inversions, than are other populations, with the most notable reduction occurring in the proximal region of chromosome II. There is a considerable difference between *D. mediopunctata* from Campinas and specimens from Serra do Japi, which are separated by only 50 km. In contrast, *D. mediopunctata* from Serra do Japi are much more similar to specimens from the Parque Nacional do Itatiaia, which is 200 km far from the former location.

Introduction

Chromosomal inversion polymorphism in species of *Drosophila* is one of the best studied systems in population genetics. Inversions have been used to study phylogenies, geographical clines, temporal cycles, meiotic drive, and natural selection (for reviews see Sperlich and Pfriem, 1986; Krimbas and Powell, 1992). Since in a number of species this polymorphism is under selection, it is common to assume *a priori* that this is true of any species and to conclude that this polymorphism is maintained by balancing selection (Dobzhansky, 1970). However, Krimbas and Loukas (1980), in their review of chromosomal inversion polymorphism in *D. subobscura*, insisted that one should try to demonstrate which type of selection, if any, is actually occurring in each case. Thus, the question as to how chromosomal inversion polymorphisms are maintained remains unanswered, especially in very polymorphic species.

Drosophila mediopunctata, a species of the *tripunctata* group, is very common in many localities in South America, especially during the winter (Saavedra *et al.*, 1995). This species ranges from El Salvador to southern Brazil (Frota-Pessoa, 1954; Val *et al.*, 1981). Various aspects of its biology make *D. mediopunctata* an interesting model for studying the genetics of natural populations (for review and discussion, see Klaczko, 1995).

D. mediopunctata has $2n = 12$ chromosomes, consisting of five pairs of rods and a pair of dots (Kastritsis, 1966), and is very polymorphic for inversions. Chromosomes X, II and IV show inversion polymorphisms. We found, in addition to the *Standard* arrangement, three inversions for chromosome X and one for chromosome IV (Carvalho *et al.*, 1989; Klaczko *et al.*, 1990; Peixoto and Klaczko, 1991). Chromosome II is the most polymorphic, with 17 inversions described. Understanding this complexity can be simplified by assigning the inversions to distal and proximal groups, based on the chromosome region in which they occur. The distal group

includes eight inversions (*DA*, *DI*, *DS*, *DP*, *DV*, *DR*, *DL*, and *DJ*), while the proximal region contains nine (*PC0*, *PC1*, *PC2*, *PC3*, *PC4*, *PC5*, *PB0*, *PA0*, and *PA8*) (Peixoto and Klaczko, 1991; Ananina *et al.*, 2002).

In almost all combinations between proximal and distal inversions, there is no overlap between the two regions, although in principle recombination between them can occur. There is intense linkage disequilibrium between distal and proximal inversions, for example, *DA* is associated with *PA0*, as shown by the standardized coefficient of linkage disequilibrium (D') which presents a value of 0.98. Similarly *DP* is associated with *PC0* ($D' = 0.97$), and *DS* with *PC0* ($D' = 0.95$) (Peixoto and Klaczko, 1991; Zapata, 2000).

In this paper, we examined the seasonal, altitudinal, and latitudinal variations in inversion frequencies in *D. mediopunctata* in order to understand how these polymorphisms are maintained.

Materials and Methods

Fly samples

Microgeographic variation in inversion frequencies was studied in the Parque Nacional do Itatiaia, on the slopes of Mantiqueira mountains, in the states of Rio de Janeiro and Minas Gerais, Brazil (22° 25' S, 44° 50' W). The fauna of this region was described by Barth (1957) and the flora by Brade (1956), who characterized it as a subtropical hygrosopic forest. *D. mediopunctata* were collected at various points at altitudes from 700 m to 1600 m. The greatest distance between collection sites was 6 km. Approximately a dozen fermented banana baits spaced 5 to 15 meters apart were used per site.

Nine field trips were made to Itatiaia, but in only two areas (at 1020 m and 970 m) were specimens collected on all occasions. The collection dates were: fall 1986 (25—26 May), winter 1986 (29—30 September), summer 1987 (25—26 February), fall 1987 (30—31 May, 1—2 June), winter 1987 (28—30 August), spring 1987 (27—29 November), summer 1988 (11—13 March), fall 1988 (28—29 May) and spring 1988 (26—28 November).

Three other localities were chosen for macrogeographic analysis: Mata Santa Genebra (22° 53' S, 47° 04' W, Campinas, São Paulo), Serra do Japi (23° 17' S, 47° 00' W, Jundiá, São Paulo), and Morro Sant'Ana (30° 02' S, 51° 13' W, Porto Alegre, Rio Grande do Sul). Ten field

collections were made during the period 1991—2000, four of these in Campinas, three in Serra do Japi, and three in Porto Alegre.

Laboratory procedures

The inversion frequencies in the *D. mediopunctata* samples were estimated using the adult male sample and egg sample methods (Arnold, 1981; Klaczko, 1995). The adult sample method consisted of crossing each male collected with two or three virgin females from a homokaryotypic strain. We used strain *ITC-229ET*, which is homokaryotypic for the haplotype *DI-PB0* in the second chromosome, and is routinely maintained in the UNICAMP and UFRJ laboratories. From each cross, the salivary gland chromosomes of up to eight F1 third instar larvae were analyzed cytologically to determine the male's genotype. The probability of a misidentification for a heterozygous male was negligible (less than 1%). In the egg sample method, we analyzed one F1 larva from each collected female.

Weather data used in the correlation analysis

The climatic variables analyzed included the maximum, minimum, and mean monthly temperatures and precipitation. The hydrometric data was supplied by IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). The hydrometric bulletin contained data for the period from September 1986 to December 1988. The average precipitation per day was calculated for each month of the period.

Unfortunately, no reliable records were available for temperatures within the park during the collecting period. Brade (1956) gives average data covering more than 15 years when the meteorological station in the park was working. A comparison of these data with recent temperature data for the town of Itatiaia (<http://br.weather.com/weather/climatology/BRXX0578>) shows that they are very similar. However, only the data from Brade (1956) were used in the correlation analysis since they were considered to be more reliable.

Statistical analysis

The gene arrangements in the distal region are easily recognized in routine preparations. In contrast, proximal inversions are rather difficult to recognize in different homozygotes (Klaczko *et al.*, 1990). Since the linkage disequilibrium between the distal and proximal inversions is very strong in *D. mediopunctata* (see Peixoto and Klaczko, 1991), we used the distal

inversions *DA*, *DI*, *DS*, *DP*, and *DV* as genetic markers for the haplotypes *DA-PA0*, *DI-PB0*, *DS-PC0*, *DP-PC0*, and *DV-PC0*, which together represent more than 85% of the total number of haplotypes. This procedure allowed us to pool the egg and male samples, since they were not significantly different, and substantially increased the sample size. We must emphasize that in no case (among all the samples analyzed) did we find a significant difference between the frequencies estimated using the adult male method and the egg sample method.

The correlation between the inversion frequencies and altitude, precipitation and temperature was examined after angular transformation of the chromosomal data.

Results

Altitudinal and seasonal changes in the inversion frequencies in the Parque Nacional do Itatiaia (microgeographic variation)

The frequencies of distal inversions in the second chromosome, the number of chromosomes analyzed in each period and area of collection, and the weighted average frequencies between collections are reported in Table 1. There was a significant, positive correlation between the frequencies of *DA* (after angular transformation) and the altitude of the collection site ($r = 0.87$, $p < 0.01$) (Figure 1, Table 2). The opposite occurred in the case of *DS* ($r = -0.86$, $p < 0.01$) and *DP* ($r = -0.77$, $p < 0.05$) (not shown in the graph). When *DS* and *DP* were pooled, the negative correlation coefficient with altitude was greater ($r = -0.91$, $p < 0.01$) than for *DS* (Figure 1, Table 2). Such a grouping makes some biological sense since the *DS* and *DP* inversions are almost completely associated with the proximal inversion *PC0* to form the haplotypes *DS-PC0* and *DP-PC0*. The inversion *DI* did not show a significant correlation with altitude ($r = 0.29$, $p > 0.05$) (Figure 1, Table 2). The correlation coefficients were calculated using the weighted average frequencies between collections, as shown at the bottom of Table 1.

The differences in the inversion frequencies between collections were highly significant ($\chi^2 = 74.2$, d.f.=32, $p < 0.001$). The frequency of *DA* varied periodically (Figure 2), as it increased in cool months (end of fall and winter) and decreased in hot months (end of spring and summer), but we were unable to fit this to a sinusoidal curve. Nonetheless we could find a quadratic function with very good fit ($y = -0.0351 x^2 + 0.1781 x + 0.6037$; $r^2 = 0.89$; $p < 0.01$). There was a significant negative correlation with temperature ($r = -0.90$, $p < 0.001$, for the average

temperature) and precipitation ($r = -0.75$, $p < 0.05$) (Table 2). The inversion *DS* showed an opposite pattern since its frequencies increased in the hot months and fell in cool months. The inversions *DI* (Figure 3) and *DP* did not vary cyclically, although when *DP* was pooled with *DS* a very clear pattern was observed (Figure 4), and a quadratic function could be successfully adjusted ($y = 0.0348 x^2 - 0.1643 x + 0.6184$; $r^2 = 0.62$; $p < 0.01$). The correlation coefficients for the inversion frequencies versus altitude and climatic variables are shown in Table 2. Figure 5 shows the distribution of *DA*, *DI* and *DS+DP* inversion frequencies in relation to the average temperature.

Macrogeographic variation

D. mediopunctata from Campinas, Serra do Japi, and Porto Alegre were also analyzed. The frequencies of distal inversions in chromosome II are shown in Table 3. In no case were the differences between collections from the same locality significant, even when the collections were separated by over 10 years in Campinas and over nine years in Serra do Japi. The microgeographic pattern seen in the Parque Nacional do Itatiaia was not seen macrogeographically (Table 3). The frequencies of *DS*, *DP*, and *DV* were greater in Porto Alegre than at the other localities, whereas the frequency of *DA* was very low (Figure 6). *D. mediopunctata* from Campinas showed intermediate frequencies for all of these inversions. Thus, the frequencies of *DA* and *DI* decreased with latitude while those of *DS* and *DP* increased (Figure 6).

The level of polymorphism decreased from the Parque Nacional do Itatiaia to Porto Alegre. Table 4 shows the expected frequencies of heterozygotes calculated for the distal and proximal regions of chromosome II separately. The calculation was based on the data from males, for which we were sure of the identification of proximal region inversions. Heterozygosity decreased drastically in the proximal region of chromosome II in the Porto Alegre population, as well as the overall inversion number, which is smaller there than in the other populations studied. The overall inversion number in this population was also less than in the other population studied. In contrast, the expected heterozygosity in the distal region remained almost unaltered.

Discussion

Our results provide strong evidence that the frequencies of the second chromosome inversions *DA* and *DS* vary seasonally in *D. mediopunctata* from Itatiaia. Moreover, these two

inversions and *DP* showed altitudinal clines in their frequencies. The pattern of clinal variation agreed with the seasonal variation, i. e. the increase in frequency of inversion *DA* with altitude was similar to that in cool months and the decrease in frequency of inversion *DS* with altitude was similar to that in hot months. This pattern suggests that temperature or a related variable is the main factor responsible for this variation. The almost complete association of *DS* and *DP* with the proximal inversion *PC0* may explain the pattern shown in Figure 5, and why they vary similarly in relation to altitude (Figure 1).

Seasonal variations are *prima facie* evidence of natural selection (Levitan, 1973). This type of variation is not uncommon in chromosomal inversion polymorphisms in species of *Drosophila*, e. g. *D. pseudoobscura* (see Dobzhansky, 1948), *D. melanica* (see Tonzetich and Ward, 1973), *D. subobscura* (see Fontdevila *et al.*, 1983), but does not occur in all species, e. g. *D. pavani* (see Brncic, 1973). Microgeographic variation in inversion frequencies on mountain slopes is also not uncommon in species of *Drosophila* (Etges, 1984; Burla *et al.*, 1986) and is good evidence of selection.

Seasonal variation has at least two important consequences for chromosomal inversion polymorphism. First, it provides a mechanism that, under certain conditions, permits the maintenance of greater genetic variability in the population. Second, by its effect on chromosomal variability, such variation allows the coexistence of different inversions in the populations for a longer time.

The microgeographic pattern was not observed macrogeographically. The frequency of *DA* was unexpectedly low in the Porto Alegre population, whereas the frequencies of *DS* and *DP* were very high (Figure 6, Table 3). *D. mediopunctata* from Campinas showed intermediate frequencies. However, the limited number of populations examined makes it difficult to conclude that there is a latitudinal cline in the gene arrangement frequencies.

There is extensive data on clinal variations in *Drosophila* species, including chromosome inversions, allozyme loci, quantitative morphological traits, and physiological and behavioral traits. Latitudinal clines are generally considered to be a consequence of an adaptive response to different climates. This conclusion is reinforced by the parallelism observed between continents harboring populations with different histories. It seems natural to expect that altitudinal clines should show some parallelism with latitudinal clines, since the same climatic variables have

shaped both cline types. However, not all data fit these general tendencies. For example, the cosmopolitan inversion *In(2L)t* of *D. melanogaster* shows worldwide latitudinal and seasonal fluctuations in frequencies which are positively correlated with environmental temperature (Van Delden and Kamping, 1991; Kamping and Van Delden, 1999; Van't Land *et al.*, 2000). Laboratory experiments have shown a higher survival of karyotypes possessing *In(2L)t* in relation to high temperature (Kamping and Van Delden, 1999). In contrast, in African populations of *D. melanogaster*, no latitudinal or altitudinal trends have been found for this inversion. Significant longitudinal clines have been detected for inversion frequencies, including *In(2L)t*, but these are difficult to correlate with a climatic or other ecological factor, and there is nothing to suggest any adaptive interpretation (Aulard *et al.*, 2002).

Another curious example is that of *D. subobscura*. This species is characterized by extensive rich inversion polymorphism that involves all five acrocentric chromosomes. Until 1980, the evidence that inversion polymorphism in *D. subobscura* was subject to selection was equivocal (Krimbas and Loukas, 1980). Later studies showed north-south geographical clines in gene arrangement frequencies in Europe (Menozzi and Krimbas, 1992). The analysis of the principal components of variance showed that the correlation coefficient between the values of the first principal component for inversions and those of climatic variables (temperature and humidity) was very high ($p < 0.0001$). Soon after the invasion of South America (Chile) and North America (western USA and Canada) by *D. subobscura* in the late 1970s, clines of gene arrangements were formed as the species spread to the North and to the South (Prevosti *et al.*, 1988). The gradient of the clines increased with time and showed the same pattern as that found in Europe (but reversed in South America to account for the inversion of climatic conditions in the southern hemisphere) (Prevosti *et al.*, 1990). Seasonal changes also exist but were overlooked in previous studies (Rodriguez-Trelles *et al.*, 1996; Sole *et al.*, 2002). All of these variations indicate the occurrence of natural selection for gene arrangements in natural populations of this species (Krimbas and Powell, 2000).

The existence of altitudinal variation in the gene arrangement frequencies in *D. subobscura* is controversial. Altitudinal cline was not found in Chilean populations of *D. subobscura* (Brncic and Budnik, 1987). In Switzerland *Standard* gene arrangements of chromosomes *A*, *I*, *O*, and *U* showed a trend that was the opposite of what would be expected

were the altitudinal gradients parallel to the north-south one (Burla *et al.*, 1986). This finding resembles our results for *D. mediopunctata*.

In *D. pseudoobscura*, Dobzhansky (1943) observed that the altitudinal changes were almost opposite in pattern on a southern Californian mountain (San Jacinto) and the Sierras; gene arrangements more frequent at lower elevations in one mountain range were less frequent in the other. This was later explained assuming the population-specific coadapted nature of the inversions (Krimbas and Powell, 1992).

As shown here the level of polymorphism decreased from Itatiaia to Porto Alegre. Total number of inversions was lowest in the Porto Alegre population, where only four haplotypes (*DS-PC0*, *DP-PC0*, *DV-PC0*, and *DA-PA0*) were found. The first three of these accounted for more than 98% of the total. Thus, the proximal region is almost monomorphic, and is represented by *PC0*, which is considered ancestral for the region (Peixoto and Klaczko, 1991). Since chromosome II can be divided into two regions according to the inversion groups, it is possible to calculate the expected Hardy-Weinberg heterozygosity for the proximal and distal regions separately. Table 4 shows the expected frequencies of heterozygotes for the proximal and distal regions of chromosome II. Despite the low total number of inversions in the Porto Alegre population, the expected frequency of heterozygotes for the distal region remained almost unaltered whereas a drastic reduction in polymorphism occurred in the proximal region. The expected frequency of heterozygotes was 0.024 for the proximal region in this population (Table 4). As shown in Table 4, there was a tendency for heterozygosity to decrease from the Parque Nacional do Itatiaia to Porto Alegre, but this was limited to the proximal region. The Porto Alegre population is apparently distinct from the other populations studied, showing peripheral traits. The significance of this remains to be confirmed.

A decrease in inversion heterozygosity towards the periphery of the species distribution is rather common in species of *Drosophila*. Soulé (1973) cited more than 10 species of *Drosophila* which showed this pattern. For example, African populations of *D. melanogaster* considered to be ancestral are qualitatively more polymorphic than in the rest of the world (Aulard *et al.*, 2002). There is some disagreement about the explanation for the greater inversion polymorphism seen in central populations. Da Cunha and Dobzhansky (1954) believed that inversions were differentially adapted to various conditions, so that central populations living in a more diverse

environment would contain many inversions held in stable equilibrium by natural selection, whereas in marginal environments one arrangement would be most fit because the range of environments was narrow. Carson (1958) stated that peripheral populations were generally very small and suffered for inbreeding, and that natural selection favored "homoselection". Recombination is necessary to promote the formation of new allelic combinations. Whichever explanation is correct, there is little doubt as to the ubiquity of the pattern and that some form of selection must be the causal agent.

The difference between the populations of Serra do Japi and Campinas is interesting, primarily because these areas are separated by only 50 km. Indeed, the population of Serra do Japi was much more similar to that of the Parque Nacional do Itatiaia, 200 km away (Figure 6). Salis *et al.* (1995) studied 26 forests in the State of São Paulo and showed that those can be divided into two floristic groups, with the Serra do Japi at one group and the Mata Santa Genebra (Campinas) at the other. Thus, the differences in the inversion frequencies may reflect adaptations to floristic variations. This hypothesis can be tested by collecting from other localities in the State of São Paulo.

Acknowledgments

The authors thank Hermes F. Medeiros for help in the field collections and for valuable discussion of manuscript, Aparecida Ramos Libânio, Clea Knauer da Silva, Glória Maria dos Santos, Laércio Santana, for technical support, and Stephen Hyslop for correcting the English. They also want to thank an anonymous referee for a thorough review of the manuscript. The work was supported by grants from 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).

References

- Ananina G, Peixoto AA, Souza WN, and Klaczko LB (2002) Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 691-694.

- Arnold J (1981) Statistics of natural-populations. 1. Estimating an allele probability in cryptic fathers with a fixed number of offspring. *Biometrics* 37: 495-504.
- Aulard S, David JR, Lemeunier F (2002) Chromosomal inversion polymorphism in Afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 79: 49-63.
- Barth R (1957) A fauna do Parque Nacional do Itatiaia. Boletim Parque Nacional do Itatiaia, no. 6, Serviço Florestal, Ministério da Agricultura, Resende, Rio de Janeiro. 150 pp.
- Brade AC (1956) A flora do Parque Nacional do Itatiaia. Boletim Parque Nacional do Itatiaia, no. 5, Serviço Florestal, Ministério da Agricultura, Resende, Rio de Janeiro, 96 pp.
- Brncic D (1973) Further study of chromosomal-polymorphism in *Drosophila pavani*. *J Hered* 64: 175-180.
- Brncic D, Budnik M (1987) Chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura* at different elevations in Central Chile. *Genetica* 75: 161-166.
- Burla H, Jungen H, Bächli G (1986) Population structure of *Drosophila subobscura*—nonrandom microdispersion of inversion polymorphism on a mountain slope. *Genetica* 70: 9-15.
- Carson HL (1958) The population genetics of *Drosophila robusta*. *Adv Genet* 9:1-40.
- Carvalho AB, Peixoto AA, Klaczko LB (1989) Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* 62:425-428.
- Da Cunha AB, Dobzhansky Th (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in relation to environment. *Evolution* 8: 119-134.
- Dobzhansky Th (1943) Genetics of natural populations. IX. Temporal changes in the composition of populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 28: 162-186.
- Dobzhansky Th (1948) Genetics of natural populations. XVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Genetics* 33: 158-176.

- Dobzhansky Th (1970) Genetics of the Evolutionary Process. Columbia University Press, New York, 505 pp.
- Etges WJ (1984) Genetic-structure and change in natural-populations of *Drosophila robusta* — systematic inversion and inversion association frequency shifts in the great smoky mountains. *Evolution* 38: 675-688.
- Fontdevila A, Zapata C, Alvarez G, Sanchez L, Mendez J, and Enriquez I (1983) Genetic coadaptation in the chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Seasonal-changes of gametic disequilibrium in a natural-population. *Genetics* 105: 935-955.
- Frota-Pessoa O (1954) Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (*Drosophilidae*, *Diptera*). *Arquivos do Museu Paranaense* 10: 253-304 + 13 Plates.
- Kamping A, Van Delden W (1999) The role of fertility restoration in the maintenance of the inversion *In(2L)t* polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 83: 460-468.
- Kastritsis CD (1966) Cytological studies on some species of the *tripunctata* group of *Drosophila*. *Univ Texas Publs Stud Genet* 6615: 413-474.
- Klaczko LB (1995) Populations genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: Levine L (ed) Genetics of natural Populations. The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky. Columbia University Press, New York, pp 140-153.
- 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.
- Krimbas CB, Loukas K (1980) The inversion polymorphism in *Drosophila subobscura*. *Evol Biol* 12: 163-234.
- Krimbas CB, Powell JR (1992) *Drosophila* Inversion Polymorphism. CRC Press, Boca Raton, FL, 560 pp.

- Krimbas CB, Powell JR (2000) Inversion Polymorphism in *Drosophila*. In: Singh RS and Krimbas CB (eds) Evolutionary Genetics: From Molecules to Morphology. Vol. 1. Cambridge University Press 2000, pp 284-299.
- Levitan M (1973) Studies of linkage in populations. 6. Periodic selection for X-chromosome gene arrangement combinations. *Evolution* 27: 215-225.
- Menozzi P, Krimbas CB (1992) The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* revisited: synthetic maps of gene arrangement frequencies and their interpretation. *J Evol Biol* 5:625-641.
- Peixoto AA, Klaczko LB (1991) Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila*. *Genetics* 129: 773-777.
- Prevosti A, Ribo G, Serra L, Aguade M, Balana J, Monclus M, Mestres F (1988) Colonization of America by *Drosophila subobscura*: experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5597-5600.
- Prevosti A, Serra L, Segarra C, Aguade M, Ribo G, and Monclus M (1990) Clines of chromosomal arrangements of *Drosophila subobscura* in South America evolve closer to Old World patterns. *Evolution* 44: 218-221.
- Rodriguez-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.
- Saavedra CC, Callegari-Jacques SM, Napp M, and Valente VLS (1995) A descriptive and analytical study of Neotropical drosophilid communities. *J Zool Syst Evol Res* 33: 62-74.
- Salis SM, Shepherd 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.
- Sole E, Balany J, Sperlich D, and Serra L (2002) Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Mediterranean populations from southwestern Europe. *Evolution* 56: 830-835.

- Soulé ME (1973) The epistatic cycle: a theory of marginal populations. *Annu Rev Ecol Syst* 4: 165-187.
- Sperlich D, Pfriem P (1986) Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In Ashburner M, Carson HL, and Thompson Jr, JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila* Vol. 3a. Academic Press, New York, pp 123-168.
- Tonzetich J, Ward CL (1973) Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila melanica*. *Evolution* 27: 486-494.
- Val FC, Vilela CR, Marques MD (1981) Drosophilidae of the Neotropical Region. In: Ashburner M, Carson HL, and Thompson Jr, JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3a. Academic Press, New York, pp 123-168.
- Van Delden W, Kamping A (1991) Changes in relative fitness with temperature among second chromosome arrangements in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127: 507-514.
- Van't Land J, Van Putten WF, Villarroel H, Kamping A, and Van Delden W (2000) Latitudinal variation for two enzyme loci and an inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster* from Central and South America. *Evolution* 54: 201-209.
- Zapata C (2000) The D' measure of overall gametic disequilibrium between pairs of multiallelic loci. *Evolution* 54: 1809-1812.

Table 1. Second chromosome inversion frequencies in *D. mediopunctata* from different collections and areas in the Parque Nacional do Itatiaia.

(A)

	Altitude (m)								
	1600	1300	1200	1020	970	870	850	700	
Inversions	Frequency								Average
FALL 1986 May (25—26)									
DA	-	0.500	-	0.541	0.533	-	-	-	0.528
DI	-	0.308	-	0.257	0.221	-	-	-	0.250
DS	-	0.058	-	0.095	0.107	-	-	-	0.093
DP	-	0.096	-	0.027	0.098	-	-	-	0.076
OT	-	0.038	-	0.081	0.041	-	-	-	0.052
N	-	52	-	74	122	-	-	-	248
WINTER 1986 September (29—30)									
DA	-	0.750	-	0.477	0.580	-	-	-	0.535
DI	-	0.125	-	0.252	0.236	-	-	-	0.242
DS	-	0.125	-	0.113	0.088	-	-	-	0.100
DP	-	0	-	0.072	0.052	-	-	-	0.060
OT	-	0	-	0.086	0.044	-	-	-	0.063
N	-	8	-	222	250	-	-	-	480
SUMMER 1987 February (25—26)									
DA	0.750	0.571	0.500	0.425	0.398	-	-	-	0.438
DI	0.250	0.143	0.364	0.349	0.306	-	-	-	0.318
DS	0	0.143	0.091	0.132	0.176	-	-	-	0.143
DP	0	0.071	0.000	0.066	0.046	-	-	-	0.050
OT	0	0.071	0.045	0.028	0.074	-	-	-	0.050
N	8	14	22	106	108	-	-	-	258
FALL 1987 May (30—31), June (1—2)									
DA	-	0	-	0.541	0.592	0.438	-	0.456	0.537
DI	-	0.500	-	0.239	0.206	0.281	-	0.272	0.236
DS	-	0	-	0.077	0.101	0.063	-	0.140	0.096
DP	-	0	-	0.055	0.048	0.094	-	0.088	0.060
OT	-	0.500	-	0.088	0.053	0.125	-	0.044	0.071
N	-	2	-	272	228	32	-	114	648

Table 1. (cont.)

	Altitude (m)								
	1600	1300	1200	1020	970	870	850	700	
Inversions	Frequency								Average
WINTER 1987 August (28—30)									
DA	-	0.611	-	0.559	0.598	-	0.525	0.455	0.530
DI	-	0.250	-	0.225	0.196	-	0.229	0.237	0.224
DS	-	0.028	-	0.118	0.103	-	0.142	0.143	0.125
DP	-	0.028	-	0.069	0.054	-	0.038	0.094	0.061
OT	-	0.083	-	0.029	0.049	-	0.067	0.071	0.060
N	-	36	-	102	184	-	240	224	786
SPRING 1987 November (27—29)									
DA	-	-	-	0.424	0.549	-	0.410	0.471	0.461
DI	-	-	-	0.194	0.156	-	0.224	0.147	0.188
DS	-	-	-	0.171	0.153	-	0.216	0.265	0.185
DP	-	-	-	0.129	0.076	-	0.052	0.118	0.091
OT	-	-	-	0.082	0.063	-	0.097	0	0.075
N	-	-	-	170	144	-	134	34	482
SUMMER 1988 March (11—13)									
DA	-	-	-	0.490	0.521	-	0.471	0.167	0.482
DI	-	-	-	0.186	0.188	-	0.186	0.333	0.190
DS	-	-	-	0.127	0.167	-	0.157	0.167	0.146
DP	-	-	-	0.108	0.083	-	0.100	0	0.097
OT	-	-	-	0.088	0.042	-	0.086	0.333	0.084
N	-	-	-	102	48	-	70	6	226
FALL 1988 May (28—29)									
DA	-	-	-	0.548	0.568	-	0.534	-	0.544
DI	-	-	-	0.197	0.205	-	0.172	-	0.188
DS	-	-	-	0.144	0.114	-	0.149	-	0.143
DP	-	-	-	0.067	0.045	-	0.075	-	0.068
OT	-	-	-	0.043	0.068	-	0.069	-	0.056
N	-	-	-	208	44	-	174	-	426
SPRING 1988 November (26—28)									
DA	-	-	-	0.482	0.433	-	0.513	-	0.480
DI	-	-	-	0.232	0.183	-	0.179	-	0.209
DS	-	-	-	0.083	0.167	-	0.154	-	0.118
DP	-	-	-	0.095	0.133	-	0.103	-	0.104
OT	-	-	-	0.107	0.083	-	0.051	-	0.088
N	-	-	-	168	60	-	78	-	306

Table 1. (cont.)

(B) Weighted average frequencies among collections.

	Altitude (m)								
	1600	1300	1200	1020	970	870	850	700	
Inversions	Frequency								Average
<i>TOTAL</i>									
<i>DA</i>	0.750	0.553	0.500	0.500	0.550	0.438	0.498	0.452	0.512
<i>DI</i>	0.250	0.259	0.364	0.233	0.213	0.281	0.204	0.241	0.224
<i>DS</i>	0	0.063	0.091	0.116	0.119	0.063	0.161	0.153	0.126
<i>DP</i>	0	0.062	0	0.077	0.064	0.094	0.063	0.093	0.071
<i>OT</i>	0	0.062	0.045	0.074	0.054	0.125	0.073	0.061	0.066
<i>N</i>	8	112	22	1424	1188	32	696	378	3860

N—number of chromosomes analyzed*OT*—other arrangements

Table 2. Pearson correlation coefficients (r) between inversion frequencies (after angular transformation) and altitude and other climatic data (Parque Nacional do Itatiaia).

Inversion	Altitude	Precipitation	Temperature (°C)		
			Aver. max	Aver. min	Aver.
DA	0.8658**	-0.7494*	-0.8462**	-0.9522**	-0.9006***
DI	0.2907	0.2490	0.2978	0.1109	0.0424
DS	-0.8598**	0.3561	0.4884	0.5897	0.5929
DP	-0.7684*	0.2298	0.1480	0.4105	0.4481
DS+DP	-0.9133**	0.3900	0.4480	0.6503	0.6690*

*(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001).

Table 3. Frequencies of distal inversions in the second chromosome in various localities and different dates.

Populations and date	<i>DA</i>	<i>DI</i>	<i>DS</i>	<i>DP</i>	<i>DV</i>	<i>OT</i>	<i>N</i>
Campinas, Mata Santa Genebra							
Jun/1991	0.217	0.044	0.359	0.348	0.032	0	92
Set/1996	0.228	0.080	0.377	0.204	0.098	0.012	162
Ago/2000	0.227	0.060	0.360	0.213	0.114	0.027	150
Set/2000	0.213	0.017	0.374	0.257	0.113	0.026	230
TOTAL	0.221	0.047	0.369	0.246	0.098	0.019	634
Serra do Japi							
Jun/1994	0.505	0.122	0.170	0.090	0.069	0.043	188
Apr/2002	0.649	0.079	0.088	0.105	0.079	0	114
May/2002	0.576	0.030	0.182	0.091	0.091	0.030	66
TOTAL	0.562	0.092	0.147	0.095	0.076	0.027	368
P.Alegre, Morro Santa'Ana							
Apr/1999	0.083	0	0.417	0.292	0.208	0	24
Oct/1999	0.013	0	0.474	0.395	0.118	0	76
May/2000	0	0	0.425	0.433	0.142	0	120
TOTAL	0.014	0	0.441	0.405	0.141	0	220

N—number of chromosomes analyzed

OT—other arrangements

Table 4. Heterozygosity expected from the Hardy-Weinberg equilibrium.

Populations	Heterozygosity	
	Distal region	Proximal region
Parque Nacional do Itatiaia	0.666	0.657
Serra do Japi	0.646	0.579
Campinas	0.732	0.414
Porto Alegre	0.615	0.024

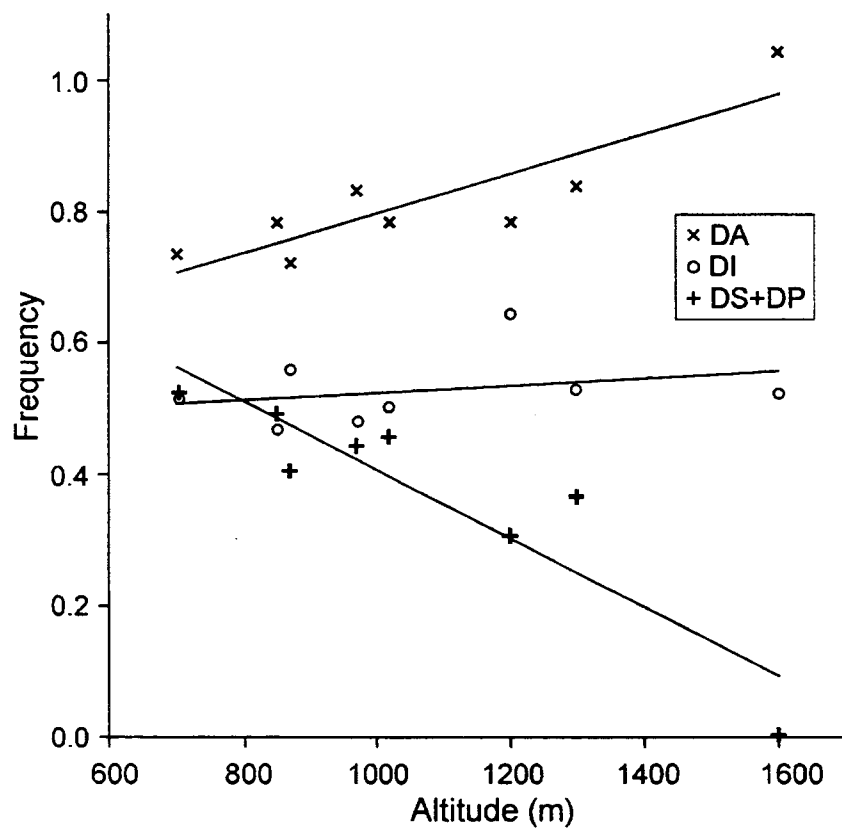


Figure 1. Distribution of *DA*, *DI* and *DS+DP* inversion frequencies in relation to altitude (Parque Nacional do Itatiaia).

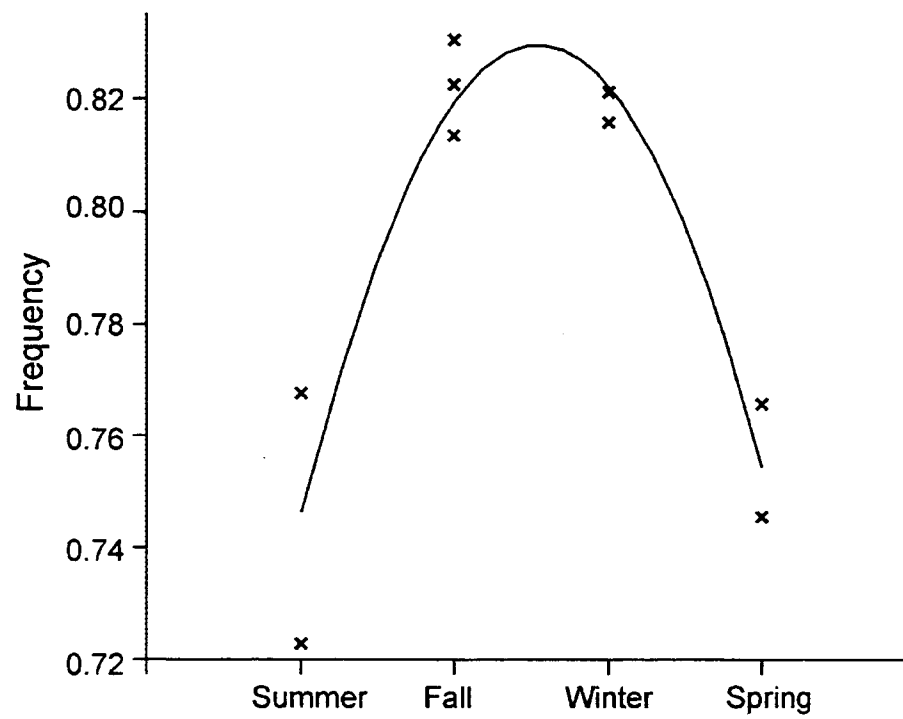


Figure 2. Seasonal variation in the *DA* inversion frequency (Parque Nacional do Itatiaia).

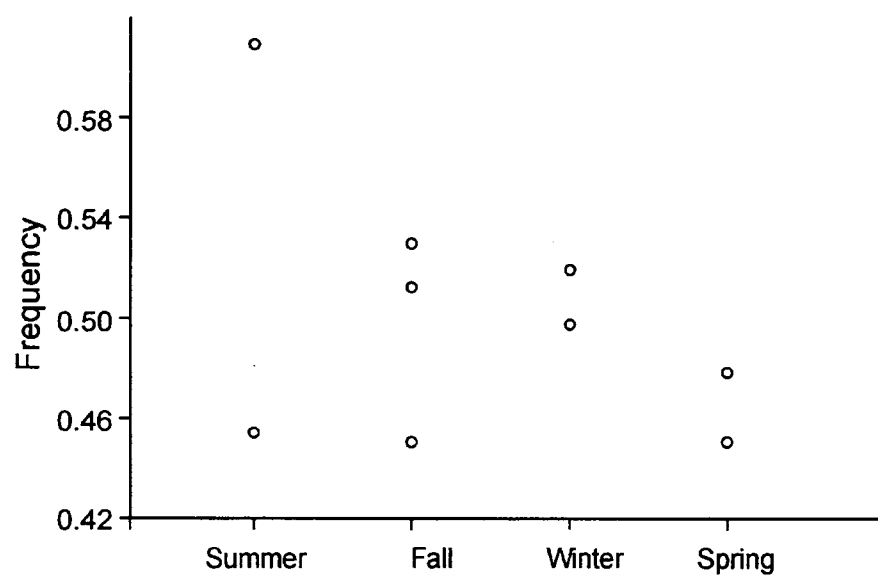


Figure 3. *DI* inversion frequencies in the various collections according to the seasons (Parque Nacional do Itatiaia).

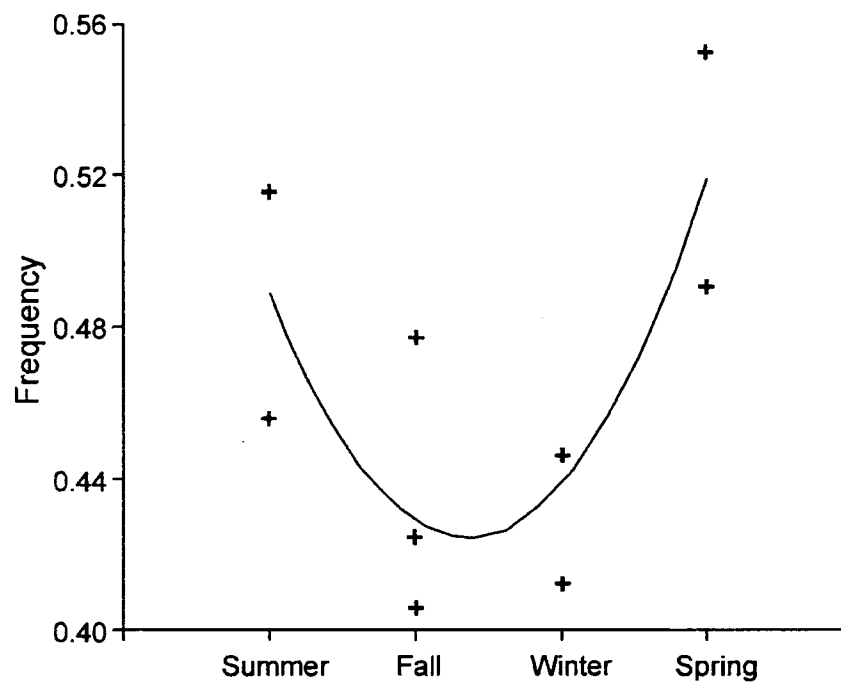


Figure 4. Seasonal variation in the *DS* and *DP* (grouped) inversion frequency (Parque Nacional do Itatiaia).

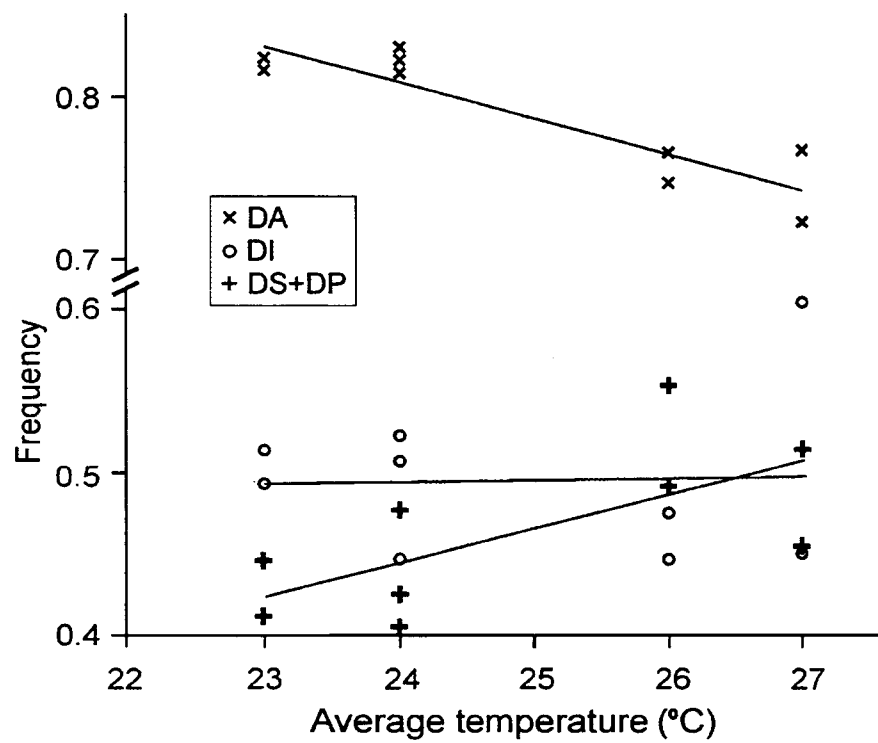


Figure 5. Distribution of *DA*, *DI* and *DS+DP* inversion frequencies in relation to average temperature (Parque Nacional do Itatiaia).

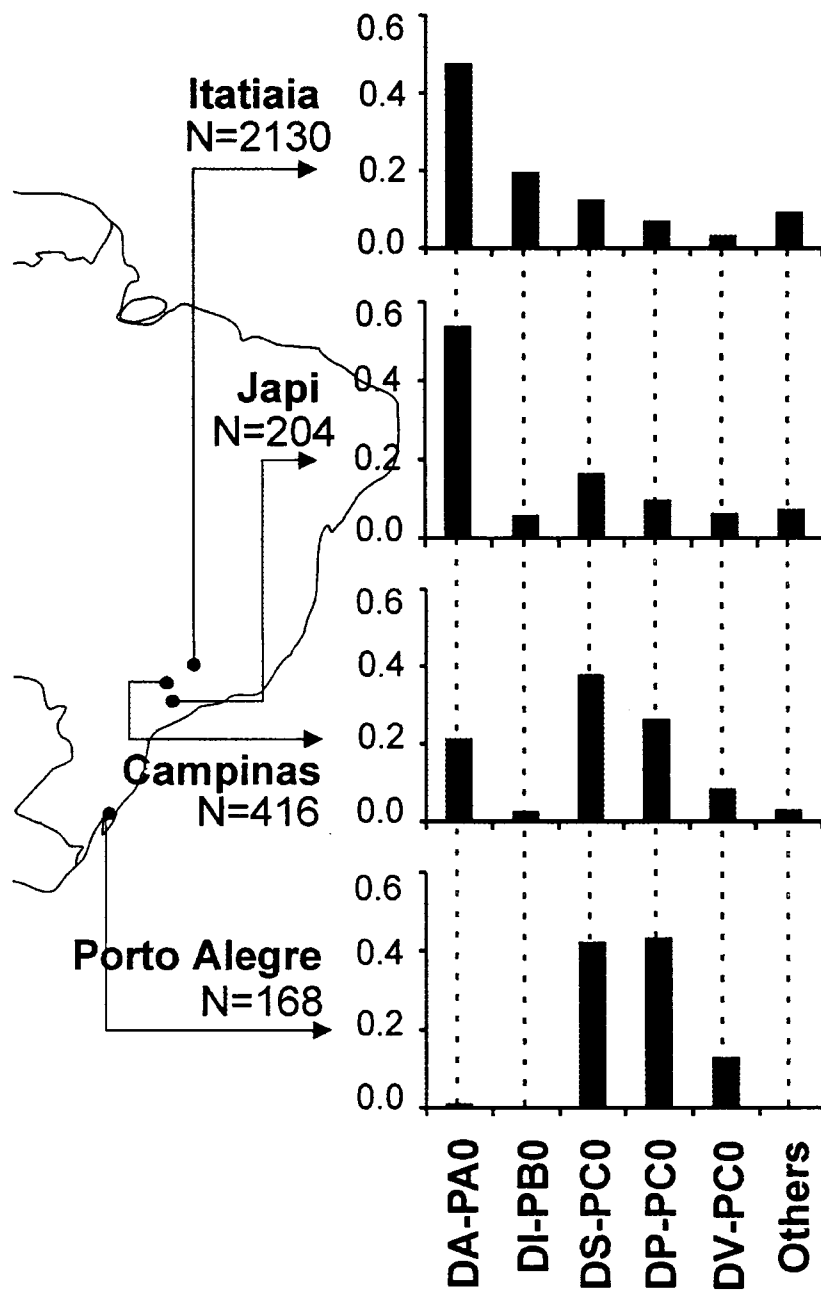


Figure 6. Distribution of haplotype frequencies in *D. mediopunctata* from the Parque Nacional do Itatiaia, Serra do Japi, Campinas, and Porto Alegre. N—number of chromosomes analyzed.

III. Conclusões Gerais

1. - Mapa dos cromossomos politênicos

O mapa dos cinco cromossomos politênicos de *D. mediopunctata* foi construído. Nele, encontram-se 372 bandas no cromossomo X, 422 bandas no cromossomo II, 446 bandas no cromossomo III, 440 bandas no cromossomo IV e 431 no cromossomo V; com o número total de bandas 2111, o que corresponde a um esticamento médio dos cromossomos.

2. - Mapeamento dos rearranjos

Um total de 23 rearranjos cromossômicos foram mapeados, 21 desses são inversões paracêntricas encontradas na natureza e dois são translocações obtidas artificialmente no laboratório.

3. - Frequências de inversões no Parque Nacional do Itatiaia

3.1 - Variação sazonal

A frequência da inversão *DA* varia sazonalmente, isto é, aumenta nos meses frios e diminui durante os meses quentes, há uma correlação negativa e significativa com a temperatura média do mês de coleta ($r = 0,90$, $p < 0,001$). A frequência das inversões *DS* e *DP* também varia sazonalmente, mas mostra um padrão oposto, com correlação positiva significativa ($r = 0,67$, $p < 0,05$). A frequência da inversão *DI* não varia com a mudança de estações.

3.2. - Variação altitudinal

As frequências das inversões *DA*, *DS* e *DP* formam um cline altitudinal. *DA* mostra correlação positiva com a altitude ($r = 0,87$, $p < 0,01$), enquanto *DS* e *DP* agrupados mostram correlação negativa ($r = -0,91$, $p < 0,01$). A inversão *DI* não mostra correlação significativa com a altitude ($r = 0,29$, $p > 0,05$). A variação altitudinal é consistente com a variação sazonal. A inversão *DA*, que aumenta de frequência nos meses frios, é mais abundante nos lugares mais altos. O mesmo ocorre com as inversões *DS* e *DP*, cuja frequência diminui nos meses frios e com

a altitude. Os nossos dados indicam a temperatura como um fator ambiental que pode influenciar esses padrões (sazonal e altitudinal).

4. - Padrão macrogeográfico

4.1. - Porto Alegre

As frequências das inversões *DS* e *DP* são inesperadamente altas em Porto Alegre, enquanto a frequência de *DA* é extremamente baixa. Além disso, *D. mediopunctata* de Porto Alegre se mostra menos polimórfica em relação às inversões, comparando com outras localidades estudadas. A redução mais notável de polimorfismo ocorre na região proximal do cromossomo II. A redução do nível de polimorfismo em Porto Alegre é condizente, ainda que parcialmente, com a idéia de que aí as condições ecológicas seriam marginais para *D. mediopunctata*.

4.2. - Serra do Japi

Considerando as frequências de inversões como característica, podemos constatar que as populações de *D. mediopunctata* da Serra do Japi se mostram semelhantes com as populações do Parque Nacional do Itatiaia e diferentes das amostras de Campinas. Aparentemente, a distribuição das frequências das inversões está acompanhando a variação florística.

4.3. - Campinas

As frequências de inversões na população de *D. mediopunctata* de Campinas são intermediárias entre aquelas do Parque Nacional do Itatiaia e as de Porto Alegre.

4.4. - Visão geral

O padrão microgeográfico da distribuição das frequências de inversões no Parque Nacional do Itatiaia não foi encontrado em escala macrogeográfica, e a investigação das causas dessa inconsistência é uma perspectiva que se abre para trabalhos futuros.

Delta3

Delta3 (DI3): esta mutação apresenta como fenótipo dominante as asas com veias dilatadas nas extremidades, formando uma figura em forma de delta, e é letal em homozigose. Seu fenótipo é semelhante ao da mutação *Delta* em *D. melanogaster*. Esta mutação está ligada à translocação *T(2;3)Delta3* (=T(2;3) 23A;42B), obtida através do tratamento do haplótipo *DI-PB0* com raios X (22,00 to 66,30 Gy) (Marques *et al.*, 1991).

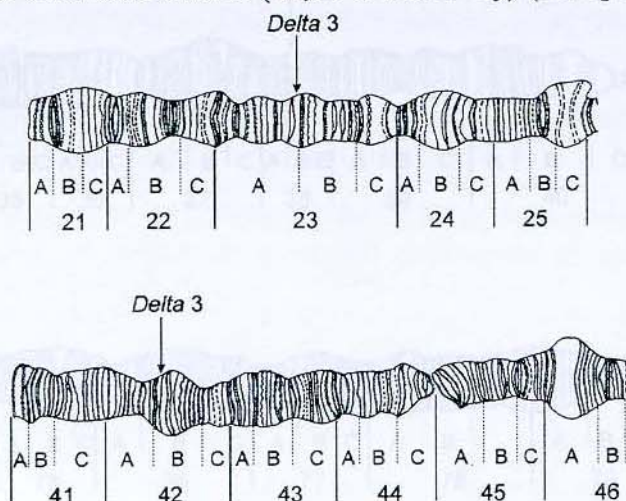


Figura 1. Apresentação esquemática dos pontos de quebra da translocação *Delta3*.



Figura 2. Tanslocação *Delta3*. Barra = 10 μ .

Antennapedia

Antennapedia (Antp): mutação em que o fenótipo dominante é a transformação das antenas em tarsos com comprimento variável, é letal em homozigose. A mutação está ligada à translocação $T(2;4)Antp$ (= $T(2;4) 38B;72C-73A$), obtida através do tratamento do haplótipo *DV-PC0* com raios X (22.00 to 66.30 Gy) (Marques *et al.*, 1991).

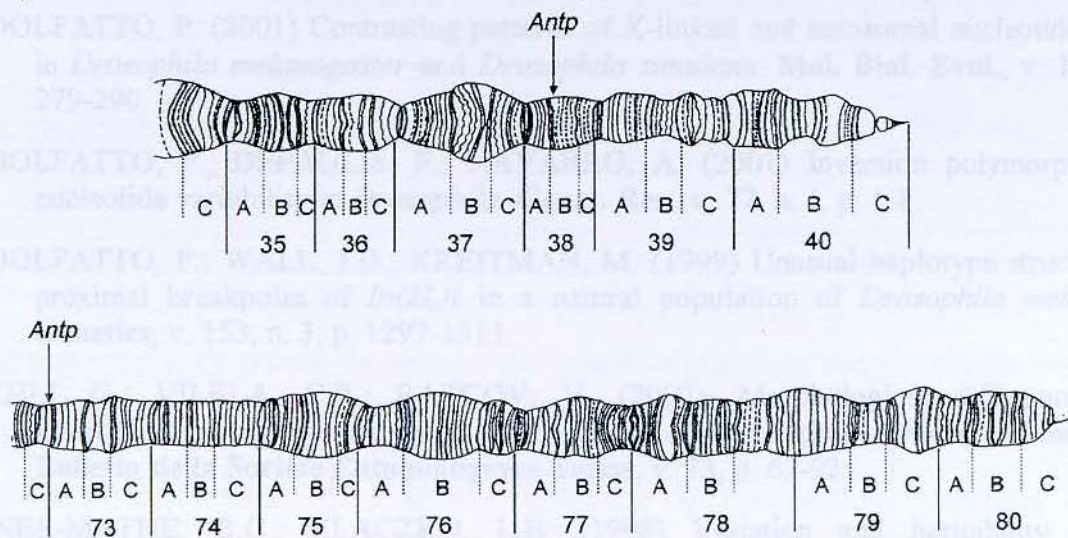


Figura 3. Apresentação esquemática dos pontos de quebra da translocação *Antennapedia*.

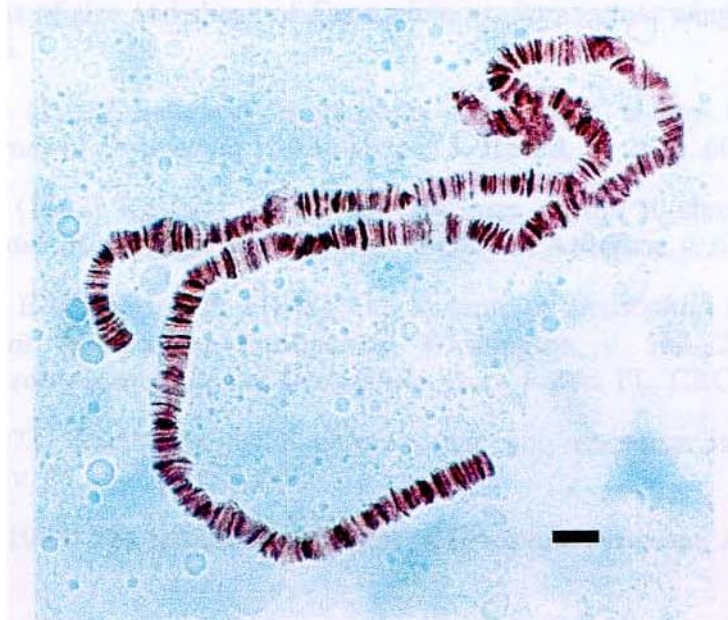


Figura 4. Translocação *Antennapedia*. Barra = 10 μ.

V. Bibliografia Geral

- ANANINA, G.; PEIXOTO, A.A.; SOUZA, W.N.; KLACZKO, L.B. (2002) Polytene chromosome map and inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 691-694.
- ANDOLFATTO, P. (2001) Contrasting patterns of X-linked and autosomal nucleotide variation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, n. 3, p. 279-290.
- ANDOLFATTO, P.; DEPAULIS, F.; NAVARRO, A. (2001) Inversion polymorphisms and nucleotide variability in *Drosophila*. **Genet. Res.**, v. 77, n. 1, p. 1-8.
- ANDOLFATTO, P.; WALL, J.D.; KREITMAN, M. (1999) Unusual haplotype structure at the proximal breakpoint of *In(2L)t* in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 153, n. 3, p. 1297-1311.
- BÄCHLI, G.; VILELA, C.R.; RATCOV, V. (2000). Morphological differences among *Drosophila paraguayensis* Duda 1927 and its close relatives (Diptera, Drosophilidae). **Bulletin de la Société Entomologique Suisse**, v. 73, p. 67-92.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L.B. (1998) Variation and heritability of arisal morphology in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. **Hereditas**, v. 128, n. 1, p. 67-71.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L.B. (1999). Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. **Heredity**, v. 83, n. 6, p. 688-696.
- BRIDGES, C.B. (1935) Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **J. Hered.**, v. 26, p. 60-64.
- BRIDGES, C.B. (1937) Revision of the salivary map of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Records of the Genetics Society of America**, v. 6.
- BRIDGES, C.B.; BREHME, K.S. (1944) The mutants of *Drosophila melanogaster*. **Carnegie Institute of Washington Publication**, Washington, v. 552, 257p. *apud* SORSA, V. (1988) **Chromosome maps of Drosophila**. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 1, 200 p.
- BRNCIC, D. (1973). Further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila pavani*. **J. Heredity**, v. 64, n. 4, p. 175-180.
- CARSON, H.L. (1958) The population genetics of *Drosophila robusta*, **Advances in genetics**, v. 9, p. 1-40.
- CARVALHO, A.B.; KLACZKO, L.B. (1993) Autosomal supressors of sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 71, n. 5, p.546-551.
- CARVALHO, A.B.; KLACZKO, L.B. (1994) Y-linked suppressors of the sex-ratio trait in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 73, n. 6, p. 573-579.

- CARVALHO, A.B.; PEIXOTO, A.A.; KLACZKO, L.B. (1989) Sex-ratio in *Drosophila mediopunctata*. **Heredity**, v. 62, n. 3, p.425-428.
- CARVALHO, A.B.; VAZ, S.C.; KLACZKO, L.B. (1997) Polymorphism for Y-linked suppressors of sex-ratio in two natural populations of *Drosophila mediopunctata*. **Genetics**, v. 146, n. 3, p. 891-902.
- DA CUNHA, A.B.; DOBZHANSKY T. (1954) A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. **Evolution**, n. 8, n. 2, p. 119-134.
- DOBZHANSKY, T. (1970) **Genetics of the Evolutionary Process**. New York: Columbia University Press, 505 p.
- ETGES, W.J. (1984) Genetic structure and change in natural populations of *Drosophila robusta*: systematic inversion and inversion association frequency shifts in the Great Smoky Mountains. **Evolution**, v. 38, n. 3, p. 675-688.
- FROTA-PESSOA, O. (1954) Revision of the *tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). **Arquivos do Museu Paranaense**, Curitiba, n.10, p 253-304.
- HATADANI, L.M. (2002) Polimorfismo de coloração em *Drosophila mediopunctata*. Campinas, 2002, 67f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas.
- INNAN, H.; TAJIMA, F. (1997) The amounts of nucleotide variation within and between allelic classes and the reconstruction of the common ancestral sequence in a population. **Genetics**, v. 147, n. 3, p. 1431-1444.
- KASTRITSIS, C.D. (1966) Cytological studies of some species of the *tripunctata* group of *Drosophila*. **University of Texas Publications**, Texas, p. 413-474.
- KLACZKO, L.B. (1995) Population genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: LEVINE L.(Ed.) **Genetics of Natural Populations: the Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky**. New York: Columbia University Press, p. 140-153.
- KLACZKO, L.B.; BITNER-MATHÉ, B.C. (1990) On the edge of a wing. **Nature**, v. 346, n. 6282, p. 321.
- KLACZKO, L.B.; OTTO P.A.; PEIXOTO A.A. (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**, v. 64, n. 2, p. 263-270.
- KNIBB, W.R. (1982) Chromosome inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. II. Geographic clines and climatic associations in Australasia, North America and Asia. **Genetica**, v. 58, n. 3, p. 213-221.
- KRIMBAS, C.; POWELL, J. (2000) Inversion polymorphism in *Drosophila*. In: SINGH, R.S.; KRIMBAS, C.B. (Eds.) **Evolutionary Genetics: from Molecules to Morphology**. Cambridge: Cambridge University Press, vol. 1, p. 284-299.

- KRIMBAS, C.B., POWELL, J.R. (1992) *Drosophila Inversion Polymorphism*. Boca Raton, FL: CRC Press, 560 p.
- LAAYOUNI, H.; HASSON, E.; SANTOS, M.; FONTDEVILA, A. (2003) The Evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. XXXV. Inversion Polymorphism and Nucleotide Variability in Different Regions of the Second Chromosome. *Mol. Biol. Evol.*, v. 20, n. 6, p.931-944.
- LEFEVRE, G. (1976) A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands. In: ASHBURNER, M.; NOVITSKI, E. (Eds.) *The Genetics and Biology of Drosophila*, London: Academic Press, v. 1a, p. 31-66.
- LEMEUNIER, F.; AULARD, S. (1992) Inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster*. In: KRIMBAS, C.B.; POWELL, J.R. (Eds.) *Drosophila Inversion polymorphism*, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 339-405.
- LEWONTIN, R.C. (1974). *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia University Press, 346 p.
- LINDSLEY, D.L.; GRELL, E.H. (1968) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Institute of Washington Publication*, Washington, v. 627, 469 p.
- LORETO, E.L.D.; DA SILVA, L.B.; ZAHA, A.; VALENTE, V.L.S. (1998) Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. *Genetica*, v. 101, n. 3, p. 153-165.
- LORETO, E.L.D.; VALENTE, V.L.S.; ZAHA, A.; SILVA, J.C.; KIDWELL, M.G. (2001) *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. *J. Hered.*, v. 92, n. 5, p. 375 - 381.
- MARQUES, H.V.S.; CARVALHO A.B.; ELIAS C.A.; KLACZKO L.B. (1991) New Mutants. *D. I. S.*, 70, p. 280.
- MAYR, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 797 p.
- MCKIM, K.S.; JANG, J.K.; MANHEIM, E.A. (2002) Meiotic recombination and chromosome segregation in *Drosophila* females. *Annu. Rev. Genet.*, v. 36, p. 205-232.
- MENOZZI, P.; KRIMBAS, C.B. (1992) The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* revisited: synthetic maps of gene arrangement frequencies and their interpretation. *J. Evol. Biol.*, v. 5, n. 4, p. 625-641.
- NAVARRO, A.; BARBADILLA, A., RUIZ, A. (2000) Effect of inversion polymorphism on the neutral nucleotide variability of linked chromosomal regions in *Drosophila*. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 685-698.
- ¹NAVARRO, A.; BARTON, N.H (2003) Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution*, v. 57, n. 3, p. 447-459.

- ²NAVARRO, A.; BARTON, N.H. (2003) Chromosomal speciation and molecular divergence — accelerated evolution in rearranged chromosomes. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 321-324.
- NAVARRO, A.; BETRAN, E.; BARBADILLA, A.; RUIZ, A. (1997) Recombination and gene flux caused by gene conversion and crossing over in inversion heterokaryotypes. **Genetics**, v. 146, n. 2, p. 695-709.
- PAINTER, T.S. (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. **Science**, v. 78, p. 585-586 *apud* SORSA, V. (1988) **Chromosome maps of *Drosophila***. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 1, 200 p.
- PEIXOTO, A.A.; KLACZKO, L.B. (1991) Linkage disequilibrium analysis of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. **Genetics**, v. 129, n. 3, p. 773-777.
- POWELL, J.R. (1997) **Progress and Prospects in Evolutionary Biology. The *Drosophila* Model**. New York: Oxford University Press, 562 p.
- PREVOSTI, A.; RIBO, G.; SERRA, L.; AGUADE, M.; BALANA, J.; MONCLUS, M.; MESTRES, F. (1988) Colonization of America by *Drosophila subobscura*: experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 15, p. 5597-5600.
- PREVOSTI, A.; SERRA, L.; SEGARRA, C.; AGUADE, M.; RIBO, G.; MONCLUS, M. (1990) Clines of chromosomal arrangements of *Drosophila subobscura* in South America evolve closer to Old World patterns. **Evolution**, v. 44, n. 1, p. 218-221.
- RIESEBERG L.H., LIVINGSTONE K. (2003) Evolution. Chromosomal speciation in primates. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 267-268.
- RODRIGUEZ-TRELLES, F.; ALVAREZ, G.; ZAPATA, C. (1996) Time-series analysis of seasonal changes of the *O* inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. **Genetics**, v. 142, n. 1, p. 179-187.
- SAAVEDRA, C.C.R.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; NAPP, M.; VALENTE, V.L.S. (1995) A descriptive and analytical study of four Neotropical drosophilid communities. **J. Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 33, n. 2, p. 62-74.
- SINGH, B.N. (2001) Patterns of inversion polymorphism in three species of the *Drosophila melanogaster* species group. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 39, n. 7, p. 611-622.
- SORSA, V. (1988) **Chromosome maps of *Drosophila***. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 1, 200 p.
- SOULÉ, M.E. (1973) The epistatic cycle: a theory of marginal populations. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 4, p. 165-187.
- STURTEVANT, A.H. (1926) A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to inversion of a section of the third chromosome. **Biologisches Zentralblatt**, v. 46, p. 697-702.
- STURTEVANT, A.H.; BEADLE, G.W. (1936) The relations of inversions in the X chromosome of *Drosophila melanogaster* to crossing-over and disjunction. **Genetics**, v. 21, p. 554-605,

- apud* POWELL, J. R. (1997) **Progress and Prospects in Evolutionary Biology. The *Drosophila* Model**. New York: Oxford University Press, 562 p.
- VAL, F.C., VILELA, C.R., MARQUES, M.D. (1981) Drosophilidae of the Neotropical Region. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H.L.; THOMPSON JR., J.N. (Eds) **The Genetics and Biology of *Drosophila***. New York; Academic Press, v. 3a, p. 123-168.
- VILELA, C.R. (1992) On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Ent.**, v. 36, p. 197-221.
- WRIGHT, S.; DOBZHANSKY, T. (1946) Genetics of natural populations. XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 31, n. 2, p. 125-156.
- ZAPATA, C. (2000) The D' measure of overall gametic disequilibrium between pairs of multiallelic loci. *Evolution*, v. 54, n. 5, p. 1809-1812.
- ZHIMULEV, I.F. (1996) Morphology and structure of polytene chromosomes. **Adv. Genet.**, v. 34, p. 1-490.