



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Relações filogenéticas e padrões evolutivos
espaço-temporais de espécies Neotropicais de
Hirtodrosophila, *Zygothrica*, *Mycodrosophila* e
Paraliodrosophila (Diptera, Drosophilidae)**

Tháisa Bozzetti Gautério

Orientadora: Dr^a. Lizandra Jaqueline Robe

Co-Orientador: Dr. Marco Silva Gottschalk

Rio Grande

2016



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Relações filogenéticas e padrões evolutivos espaço-temporais de espécies Neotropicais de *Hirtodrosophila*, *Zygothrica*, *Mycodrosophila* e *Paraliodrosophila* (Diptera, Drosophilidae)

Aluno: Thaísa Bozzetti Gautério

Orientadora: Dr^a. Lizandra Jaqueline Robe

Co-orientador: Dr. Marco Silva Gottschalk

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande

2016

Dedico este trabalho aos meus pais e ao Regis, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Lizandra pela confiança, conhecimento, paciência, amizade e pela dedicação à minha formação. Obrigada por sempre estar disposta a me ouvir nos momentos difíceis.

Ao Marco e à Ingrid Lessa por dedicarem seu tempo às identificações.

À Daiana pela amizade, paciência, conselhos, troca de conhecimentos e por tornar as longas jornadas de trabalho mais leves e divertidas com nossas risadas e conversas amigas.

Aos demais amigos do laboratório: Henrique, Maiara, Crislaine, Lucas, Carol, Gisele, Fran, Stela e Pedro por tornarem nosso laboratório um lugar mais agradável e o trabalho mais divertido.

Aos professores e colegas do PPGBAC pelo conhecimento e conversas.

Aos técnicos Bruna e Diego pela ajuda de sempre.

À Letícia e à Jenifer pela ajuda nas triagens.

À minha querida amiga Fernanda Cavalheiro pela amizade e incentivo de sempre, por compreender minhas ausências e por sempre estar disposta a me ouvir e confortar com suas palavras.

Aos meus afilhadinhos Arthur e João Gabriel por serem a alegria dos meus dias e sempre me receberem com um sorriso.

Ao Regis por ser o meu amor, melhor amigo e incentivador. Por me ouvir com paciência, me aconselhar e estar sempre disposto a ajudar. Por me manter forte e não me deixar desistir quando tudo parecia estar dando errado. Te amo muito!

Aos meus pais Jorge e Zaíra e à minha irmã Katherine pelo amor e pela confiança, por me incentivarem a ser uma pessoa melhor através de seus exemplos, por me ensinarem a ser confiante e saberem me aconselhar quando preciso. Sem o apoio de vocês não teria sido possível chegar até aqui. Amo vocês!

À toda a minha família e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

RESUMO

A região Neotropical é considerada uma das mais diversas do planeta, porém por ser uma das menos estudadas, abriga espécies ameaçadas ou extintas antes mesmo de serem identificadas. Entre as espécies de insetos presentes nesta região encontram-se as pertencentes a Drosophilidae, uma família amplamente diversa e distribuída, que contém espécies utilizadas como modelo para estudo em diversas áreas de conhecimento, como é o caso de *Drosophila melanogaster*. Apesar dos numerosos estudos envolvendo espécies de Drosophilidae, o posicionamento e as relações filogenéticas entre muitos dos gêneros que a constituem permanecem incertos. A situação se agrava quando são considerados os gêneros micófagos, mais precisamente os que constituem o grupo genérico *Zygothrica*, ou seja, *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila*, *Paramycodrosophila* e *Zygothrica*. Sendo assim, o objetivo geral desta dissertação é auxiliar no esclarecimento dos padrões evolutivos associados à diversificação de espécies Neotropicais pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica*. Para isso, foram analisadas um total de 59 espécimes coletados em 21 pontos localizados nos estados do Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sequências nucleotídicas de 917 pb, 787 pb, 962 pb e 1184 pb dos genes mitocondriais *COI* e *COII*, e dos nucleares *Amd* e *Ddc*, respectivamente, foram obtidas para estes espécimes e acrescentadas a matrizes previamente construídas a partir de dados disponíveis para outras 50 espécies de Drosophilidae. Estes dados foram analisados individual e simultaneamente com o uso de diferentes métodos filogenéticos. Nossos resultados revelaram a subdivisão de *Drosophila* em quatro clados principais, que se diversificaram a partir do Eoceno: (1) o subgênero *Sophophora*; (2) a radiação *immigrans-tripunctata*; (3) a linhagem composta pelos drosofilídeos hawaianos junto aos membros da radiação *virilis-repleta*; e (4) a linhagem formada pelo gênero *Zaprionus* junto ao grupo genérico *Zygothrica*. Neste caso, as linhagens 3 e 4 aparecem como clados irmãos. Dentro da linhagem 4, foi recuperada, ainda, a monofilia do grupo genérico *Zygothrica*, pelo menos no que diz respeito aos representantes Neotropicais dos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*. Estes dois gêneros, por outro lado, revelaram-se merofiléticos, com algumas espécies de *Hirtodrosophila* apresentando uma ramificação basal dentro do grupo genérico, e outros agrupando internamente ao gênero *Zygothrica*, que foi subdividido em quatro diferentes clados. A maior parte das especiações dentro do grupo genérico *Zygothrica* foi datada para o Mioceno, e os padrões espaço-temporais de diversificação associadas a quarta linhagem de *Drosophila* aqui caracterizada assemelham-se àqueles previamente apresentados para as outras três linhagens. Assim, este estudo acrescenta novas informações acerca da evolução de espécies Neotropicais até então pouco compreendidas de Drosophilidae, contribuindo para o debate acerca das modificações taxonômicas envolvendo *Drosophila*.

Palavras-chave: grupo genérico *Zygothrica*, *Amd*, *Ddc*, *COI*, *COII*.

ABSTRACT

The Neotropical region is considered one of the most diverse regions of the planet, but is also one the least studied. Among the most conspicuous insect species present in this region are those from Drosophilidae, a diverse and widely distributed family, which includes species used as models in various areas of knowledge, such as *Drosophila melanogaster*. Despite the large number of studies involving members of Drosophilidae, the phylogenetic positioning and the relationships within and among many of its genera remain unclear. The situation worsens when mycophagous genera are considered, more precisely with those encompassing the *Zygothrica* genus group that includes *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila*, *Paramycodrosophila* and *Zygothrica*. Thus, the aim of this study is to clarifying the evolutionary patterns associated with the diversification of Neotropical species of the *Zygothrica* genus generic . For this, a total of 59 specimens collected in 21 points located in the states of Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and Santa Catarina were analyzed. Nucleotide sequences of 917 bp, 787 bp, 962 bp and 1184 bp of the mitochondrial genes *COI* and *COII*, and nuclear markers *Amd* and *Ddc*, respectively, were obtained for these specimens and added to matrices previously constructed from data available for other 50 drosophilid species. These data were analyzed individually and simultaneously using different phylogenetic methods. Our results indicate the *Drosophila* subdivision into four major clades, which diversified in the Eocene: (1) the subgenus *Sophophora*; (2) the *immigrans-tripunctata* radiation; (3) the clade comprising Hawaiian drosophilids and members of the *virilis-repleta* radiation; and (4) the lineage formed by the genus *Zaprionus* and the *Zygothrica* genus group. In this case, lineages 3 and 4 appear like sister clades. Within lineage 4, the monophyly of the *Zygothrica* genus group was recovered in respect to Neotropical *Hirtodrosophila* and *Zygothrica* representatives. Otherwise, these two genera appeared as merophyletic, because some *Hirtodrosophila* species branched as early offshoots within the genus group, while others were nested inside the *Zygothrica* genus, that subwas divided in four different clades. Most speciations within the *Zygothrica* genus group have been dated to the Miocene, and the spatio-temporal diversification patterns associated with the fourth *Drosophila* lineage characterized in this study resemble those previously recovered for the other three lineages. Thus, this study adds to the knowledge about the evolution of little-known Neotropical Drosophilid, while contributing to the debate about the taxonomic changes involving the genus *Drosophila*.

Key-words: *Zygothrica* genus group, *Amd*, *Ddc*, *COI*, *COII*.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 11 |
| Drosophilidae..... | 11 |
| Taxonomia e filogenia de Drosophilidae..... | 14 |
| A micofagia e o grupo genérico <i>Zygothrica</i> | 22 |
| <i>Zygothrica</i> | 25 |
| <i>Hirtodrosophila</i> | 26 |
| <i>Mycodrosophila</i> | 27 |
| <i>Paraliodrosophila</i> | 27 |
| OBJETIVOS | 28 |
| Referências | 29 |
| CAPÍTULO ÚNICO | 35 |
| Filogenia molecular dos gêneros <i>Hirtodrosophila</i> e <i>Zygothrica</i> (Diptera, Drosophilidae) e seu posicionamento dentro de <i>Drosophila</i> | 36 |
| Resumo | 37 |
| Introdução | 38 |
| Material e Métodos | 40 |
| Amostragem e identificação dos espécimes..... | 40 |
| Manipulação do DNA..... | 48 |
| Análises Filogenéticas..... | 49 |
| Resultados | 50 |
| Subdivisão de <i>Drosophila</i> , monofilia e posicionamento do grupo genérico <i>Zygothrica</i> | 51 |
| Monofilia e relacionamento entre e dentro dos gêneros <i>Hirtodrosophila</i> , <i>Mycodrosophila</i> e <i>Zygothrica</i> | 52 |
| Discussão | 60 |
| O grupo genérico <i>Zygothrica</i> e a problemática da nomenclatura de <i>Drosophila</i> | 60 |
| Relações filogenéticas dentro do grupo genérico <i>Zygothrica</i> | 61 |
| Cenário espaço-temporal..... | 63 |
| Conclusão | 64 |
| Referências | 65 |
| Material Suplementar | 70 |

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Relações filogenéticas de Drosophilidae propostas por Throckmorton (1975) (em parte), ilustrando os componentes da radiação *Drosophila* e da sua subradiação *immigrans-Hirtodrosophila*. Os gêneros do grupo genérico *Zygothrica* (em destaque) posicionam-se dentro da radiação *Drosophila*, tornando o gênero e o subgênero *Drosophila* agrupamentos parafiléticos.....18

Figura II. Relações filogenéticas de Drosophilidae propostas por Grimaldi (1990a), inserindo os gêneros do grupo genérico *Zygothrica* (em destaque, dentro do retângulo cinza) em uma posição basal ao gênero *Drosophila* (em destaque, dentro do retângulo branco) (retirado de Remsen e O’Grady, 2002).....19

Figura III. Relações filogenéticas propostas por Remsen & O’Grady (2002), mostrando o clado *Zygothrica* (em destaque cinza) ramificando na base da filogenia de Drosophilinae, antes mesmo de *Chymomyza* e *Scaptodrosophila* e os dois subclados do subgênero *Drosophila*.....20

Figura IV. Relações filogenéticas propostas por van der Linde et al. (2010), mostrando *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Zaprionus* e *Liodrosophila* próximos a radiação *immigrans-tripunctata*, tornando o gênero e o subgênero *Drosophila* parafilético e os dois subclados do subgênero *Drosophila*.....21

Figura V. Relações filogenéticas propostas por Yassin (2013), mostrando *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* divergindo depois do subgênero *Sophophora*, apresentando-se como grupo-irmão do subgênero *Drosophila*.....21

Figura 1. Locais de coleta das 36 espécies de drosofilídeos micófagos pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica* coletadas no Brasil. Gêneros são distinguidos por diferentes símbolos, enquanto espécies do mesmo gênero são diferenciadas pela cor, conforme legenda apresentada à esquerda da figura. Obs.: Há um ponto no estado do Pará representando a espécie *Z. vittimaculosa* que não foi representado na figura.....44

Figura 2. Árvore consenso de maioria inferida através de Análise Bayesiana a partir da supermatriz dos dados concatenados para 69 espécies de Drosophilinae, cujos eventos de divergência foram datados com o uso de um relógio molecular relaxado com o uso do pacote MultiDivTime. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, e os

valores abaixo dos ramos referem-se a idade dos nós, em milhões de anos. Os quatro clados recuperados na análise bayesiana estão indicados nos retângulos. Informações adicionais sobre o suporte aos clados podem ser buscadas na Tabela 5.....55

Figura 3. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *Amd* para 96 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela 6.....58

Figura 4. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *Ddc* para 73 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela 7.....59

Figura S1. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *COI* para 100 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela S1.....70

Figura S2. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *COI* para 98 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela S2.....71

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Espécimes de drosofilídeos pertencentes ao grupo genérico <i>Zygothrica</i> utilizados no presente estudo, com seus respectivos locais de coleta e coordenadas, e o número de acesso de suas sequências no GenBank..... | 41 |
| Tabela 2. Espécies de Drosophilinae cujas sequências foram acrescentadas a matriz de dados iniciais, com seus respectivos números de acessos no GenBank..... | 46 |
| Tabela 3. <i>Primers</i> e condições de PCR utilizados na amplificação dos quatro genes..... | 48 |
| Tabela 4. Caracterização geral da informação contida nas matrizes utilizadas na construção das árvores dos genes (<i>Amd</i> , <i>Ddc</i> , <i>COI</i> e <i>COII</i>) e da árvore das espécies (Fcc)..... | 51 |
| Tabela 5. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura 2, conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV)..... | 56 |
| Tabela S1. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura S1 (árvore de <i>COI</i>), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV)..... | 72 |
| Tabela S2. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura S2 (árvore de <i>COII</i>), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV)..... | 74 |
| Tabela S3. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura 3 (árvore de <i>Amd</i>), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV)..... | 76 |
| Tabela S4. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura 4 (árvore de <i>Ddc</i>), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV)..... | 78 |

INTRODUÇÃO GERAL

A região Neotropical é considerada uma região extremamente complexa e diversa, que apresenta um mosaico de extensas áreas de florestas separadas por áreas abertas (D’Horta, 2009). Entre os países que constituem a região Neotropical se encontra o Brasil, e este compreende cerca de 13% da biota mundial (Lewinsohn & Prado, 2005). No entanto, visto que a região Neotropical é uma das regiões menos estudadas do planeta, estes números ainda podem representar subestimativas. É, pois, de extrema importância a identificação, a descrição, e a compreensão destas espécies, principalmente as endêmicas, que vem sofrendo intensa perda de habitat ao longo dos últimos anos.

De fato, o consumo de recursos, a invasão de espécies exóticas, a poluição por nitrogênio, a superexploração e o impacto das mudanças climáticas vem causando um aumento nas taxas de extinção, o que caracteriza a atual crise de biodiversidade (Myers et al., 2000; Butchart et al. 2010). No ritmo de extinção atual, muitas espécies são extintas antes mesmo de serem identificadas, e isso é agravado pelo escassez de taxonomistas capacitados para a descrição de espécies. Este problema é ainda maior quando se trata de espécies de tamanho corporal pequeno, já que espécies de tamanho corporal grande têm maior probabilidade de serem encontradas e descritas (Gaston, 1991). Neste cenário, existem ainda muitas espécies de insetos, em especial dípteros, que permanecem desconhecidas para a ciência. O estudo da biologia destas espécies, em especial a compreensão dos seus padrões ecológicos e evolutivos encontra-se, pois, severamente ameaçado.

Drosophilidae

Drosophilidae está inserida na ordem Diptera, que se divide em quatro subordens. A subordem Schizophora apresenta duas divisões, Calyptratae e Acalyptratae (Quadro 1) (Pape & Thompson, 2016). Drosophilidae pertence à divisão Acalyptratae, representando organismos que possuem grande dificuldade de serem identificados e classificados, por serem bastante variáveis e plásticos (Wheeler, 1981).

Quadro 1. Identificação taxonômica atual da ordem Diptera baseado em Pape & Thompson (2016).

| |
|--------------|
| DIPTERA |
| NEMATOCERA |
| BRACHYCERA |
| CYCLORRHAPHA |
| SCHIZOPHORA |
| Calyptratae |
| Acalyptratae |

Segundo Grimaldi (1990a), Drosophilidae é o grupo irmão de Curtonotidae, e estes constituem o grupo irmão de Ephydroidea, que inclui Diastatidae, Campichoetidae, Camillidae e Ephydriidae. Drosophilidae abrange 78 gêneros, com mais de 4.300 espécies (Bächli, 2016). Além da grande diversidade, esta família destaca-se por sua ampla distribuição geográfica, sendo encontrada desde os trópicos até as tundras (Throckmorton, 1975). Segundo Grimaldi (1990a), Drosophilidae é monofilético por apresentar características únicas nas veias das asas, pedicelo, três pares de cerdas orbitais frontais, espiráculos abdominais VI e VII na base do tergito VI em machos, perda do esternito VI e tergito VII em machos, perda de pequenas células na asa e perda de pequenos espinhos sobre a superfície da frente do fêmur.

Taxonomicamente, Drosophilidae encontra-se subdividida em duas subfamílias, Steganinae e Drosophilinae, com 28 e 48 gêneros, respectivamente (Quadro 2) (Bächli, 2016). De acordo com Grimaldi (1990a), ambas subfamílias são monofiléticas, embora Drosophilinae seja bem mais diversa e estudada, apresentando mais de 78% das espécies da família (Bächli, 2016).

Quadro 2. Classificação de 76 dos 78 gêneros pertencentes à família Drosophilidae em suas respectivas subfamílias. O número de espécies apresentado por cada táxon encontra-se indicado entre parênteses.

| Gêneros da subfamília Steganinae | Gêneros da subfamília Drosophilinae | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1- <i>Acletoxenus</i> (4) | 29- <i>Baedrosophila</i> (5) | 58- <i>Neotanygastrella</i> (17) |
| 2- <i>Allopygaea</i> (3) | 30- <i>Balara</i> (1) | 59- <i>Palmomyia</i> (1) |
| 3- <i>Amiota</i> (133) | 31- <i>Bialba</i> (1) | 60- <i>Palmophila</i> (2) |
| 4- <i>Apenethecia</i> (15) | 32- <i>Calodrosophila</i> (1) | 61- <i>Paraliodrosophila</i> (5) |
| 5- <i>Apsiphortica</i> (6) | 33- <i>Celidosoma</i> (1) | 62- <i>Paramycodrosophila</i> (16) |
| 6- <i>Cacoxenus</i> (38) | 34- <i>Chymomyza</i> (56) | 63- <i>Phorticella</i> (11) |
| 7- <i>Crincosia</i> (3) | 35- <i>Cladochaeta</i> (124) | 64- <i>Poliocephala</i> (1) |
| 8- <i>Electrophortica</i> (1) | 36- <i>Collessia</i> (5) | 65- <i>Protochymomyza</i> (1) |
| 9- <i>Eostegana</i> (13) | 37- <i>Colocasiomyia</i> (30) | 66- <i>Samoaia</i> (8) |
| 10- <i>Erima</i> (1) | 38- <i>Dettopsomyia</i> (13) | 67- <i>Scaptodrosophila</i> (280) |
| 11- <i>Gitona</i> (15) | 39- <i>Diathoneura</i> (39) | 68- <i>Scaptomyza</i> (265) |
| 12- <i>Hyalistata</i> (6) | 40- <i>Dichaetophora</i> (62) | 69- <i>Sphaerogastrella</i> (10) |
| 13- <i>Leucophenga</i> (238) | 41- <i>Dicladochaeta</i> (1) | 70- <i>Sphyrnoceps</i> (1) |
| 14- <i>Luzonimyia</i> (8) | 42- <i>Drosophila</i> (1192) | 71- <i>Styloptera</i> (10) |
| 15- <i>Mayagueza</i> (1) | 43- <i>Hirtodrosophila</i> (160) | 72- <i>Tambourella</i> (3) |
| 16- <i>Paraleucophenga</i> (11) | 44- <i>Hypselothyrea</i> (35) | 73- <i>Zaprionus</i> (62) |
| 17- <i>Paraphortica</i> (1) | 45- <i>Idiomyia</i> (426) | 74- <i>Zapriothrica</i> (5) |
| 18- <i>Pararhinoleucophenga</i> (11) | 46- <i>Impatiophila</i> (39) | 75- <i>Zaropunis</i> (1) |
| 19- <i>Parastegana</i> (5) | 47- <i>Jeannelopsis</i> (3) | 76- <i>Zygothrica</i> (124) |
| 20- <i>Phortica</i> (129) | 48- <i>Laccodrosophila</i> (5) | |
| 21- <i>Pseudiasata</i> (6) | 49- <i>Liodrosophila</i> (64) | |
| 22- <i>Pseudocacoxenus</i> (1) | 50- <i>Lissocephala</i> (33) | |
| 23- <i>Pseudostegana</i> (39) | 51- <i>Lordiphosa</i> (62) | |
| 24- <i>Pyrgometopa</i> (1) | 52- <i>Marquesia</i> (2) | |
| 25- <i>Rhinoleucophenga</i> (29) | 53- <i>Microdrosophila</i> (77) | |
| 26- <i>Soederbomia</i> (1) | 54- <i>Miomyia</i> (1) | |
| 27- <i>Stegana</i> (219) | 55- <i>Mulgravea</i> (14) | |
| 28- <i>Trachyleucophenga</i> (1) | 56- <i>Mycodrosophila</i> (127) | |
| | 57- <i>Neorhinoleucophenga</i> (2) | |

Obs.: Os gêneros *Apacrochaeta* e *Arengomyia*, com uma e três espécies descritas, respectivamente, ainda não foram incorporados em nenhuma das subfamílias, por isso não foram adicionados à tabela.

Drosofilídeos são amplamente utilizados como organismos modelo em diversas áreas da biologia, medicina, farmacologia, toxicologia, entre outras áreas. Também vem sendo realizados estudos acerca de evolução e ecologia, envolvendo questões relacionadas à adaptação ecológica, especiação, respostas macro e microevolutivas, competição intra e

interespecífica, etc., além de serem excelentes bioindicadores de qualidade ambiental (Lapoint et al., 2013; Robe et al. 2013; Cavasini et al., 2014). Ecologicamente, os estágios imaturos de drosofilídeos alimentam-se de microorganismos fermentadores, de forma que estes apresentam grande importância em cadeias saprofíticas de diversos ecossistemas (Throckmorton, 1975). No decorrer do tempo evolutivo, entretanto, houve grande diversificação no uso de recursos, utilizados tanto para alimentação, quanto para a oviposição e/ou criação de suas larvas. Neste sentido, atualmente, membros da família são encontrados em associação aos mais variados tipos de substrato, como frutos, fungos, flores e cactos (Noor & Akashi, 2001). Hábitos alimentares peculiares também são encontrados em diversas espécies desta família, e entre estes, merecem destaque a predação de outros insetos, apresentada por espécies da subfamília Steganinae (Costa Lima, 1937; Culik & Ventura, 2009), e o parasitoidismo, apresentado pelo gênero *Cladochaeta* e por alguns indivíduos de *Drosophila* (Remsen & O'Grady, 2002).

Drosophila é considerado o gênero mais diverso e melhor estudado de Drosophilidae, por incluir *Drosophila melanogaster*, espécie com tempo de geração curto e fácil manutenção em laboratório, que é considerada o organismo modelo *premier* da biologia de eucariotos multicelulares (Markov & O'Grady, 2006). A disponibilização de sequências de seu genoma completo (Adams et al., 2000), de outras espécies proximalmente aparentadas (Singh et al., 2009) ou mesmo de indivíduos pertencentes a diferentes populações (Pool et al., 2012; Lack et al., 2015) vem incentivando ainda mais a realização de estudos com o gênero. No entanto, apesar do vasto acúmulo de dados referentes a diferentes espécies de *Drosophila*, este gênero ainda não possui grande parte de suas relações filogenéticas bem esclarecidas (Robe, 2008). Neste sentido, existe um acúmulo de evidências sugerindo que *Drosophila* seja parafilético com relação a uma série de outros gêneros de Drosophilidae (DaLage et al., 2007; Remsen & DeSalle, 1998; Robe et al., 2005, 2010b; Tatarenkov et al., 1999; Throckmorton, 1975), embora o posicionamento de muitos táxons dentro da família ainda permaneça desconhecido.

Taxonomia e filogenia de Drosophilidae

Durante o século 20, foram realizadas pesquisas com o objetivo de classificar as espécies de Drosophilidae a partir de caracteres morfológicos, porém estes estudos não levaram em consideração as relações evolutivas entre as espécies (Dobzhansky & Pavan, 1943; Hsu, 1949; Mourão et al., 1965; Kaneshiro, 1969). Throckmorton (1962, 1975) foi um

dos primeiros pesquisadores que buscou caracterizar a filogenia de Drosophilidae, utilizando, para tanto, a análise de caracteres morfológicos, principalmente caracteres reprodutivos internos. A ausência de métodos analíticos robustos e reproduzíveis levou o trabalho de Throckmorton (1975) a receber muitas críticas, embora muitos dos seus resultados venham sendo corroborados desde então (Remsen & O'Grady, 2002; Robe et al., 2005, 2010; Van der Linde et al., 2010).

Segundo Throckmorton (1975), a evolução de Drosophilidae teria ocorrido através de cinco sucessivas radiações, que teriam ocorrido com eventos múltiplos e simultâneos de especiação:

1) Radiação Steganinae: Engloba os gêneros *Amiota*, *Leucophenga*, *Stegana*, *Rhinoleucophenga*, *Gitona*, *Pararhinoleucophenga* e *Oxyphortica*, sendo que os quatro primeiros possuem distribuição nos trópicos. De acordo com Throckmorton (1975), a distribuição da maioria dos gêneros pertencentes à radiação Steganinae, mais basal dentro da família, comprova que a origem de Drosophilidae ocorreu nos trópicos.

2) Radiação *Scaptodrosophila*: Distribuída nos trópicos, que ocorre predominantemente no Velho Mundo, desde a África até a Austrália e o Pacífico. Esta radiação é representada no Novo Mundo pelo gênero *Zapriothrica*.

3) Radiação *Sophophora*: Possui representantes no Novo Mundo (linhagem *saltans-willistoni*), no Velho Mundo (linhagem *melanogaster*) e na zona Holoartica temperada (grupo *obscura*). Também estão inclusos nesta radiação os gêneros *Chymomyza* e *Neotanygastrella*, que possuem espécies africanas primitivas de onde, segundo Throckmorton (1975), a radiação pode ter emergido. Segundo o mesmo autor, as linhagens do Novo Mundo são derivadas das linhagens do Velho Mundo.

4) Radiação *Drosophila* (Figura I): Esta radiação engloba duas grandes subradiações de *Drosophila* (*virilis-repleta* e *immigrans-Hirtodrosophila*), dois gêneros (*Liodrosophila* e *Hypselothyrea*) e o grupo *funnebris*, que compartilha caracteres derivados de indivíduos das duas subradiações. Segundo Throckmorton (1975), ambas subradiações originaram-se nos trópicos do Velho Mundo, estendendo-se, posteriormente, ao Novo Mundo.

4.1) A subradiação *virilis-repleta* abrange os grupos *virilis*, *melanica* e *robusta*, que segundo o autor se originaram de indivíduos do Velho Mundo, e se espalharam pela floresta temperada, de onde conseguiram chegar ao Novo Mundo; os grupos *carsoni* e *bromeliae*, distribuídos no leste e oeste da América do Norte e México através da Colômbia até o Brasil, respectivamente; o grupo *tumiditarsus*, com distribuição oriental; o grupo *polychaeta*, que se distribuiu no Velho e Novo Mundo; o grupo *annulimana*, com indivíduos presentes na região Neotropical; o gênero *Dettopsomyia*, com distribuição mundial; o grupo *carbonaria*, com distribuição desde o sul dos Estados Unidos até o México; e os membros da radiação *repleta*, que agrange os grupos *repleta*, *castanea*, *canalinae*, *dreyfusi* e *mesophragmatica*. Esta subradiação abrange ainda o grupo Neotropical *flavopilosa*, cujo posicionamento exato foi questionado por Throckmorton (1975).

4.2) A subradiação *immigrans-Hirtodrosophila* (Figura I) ramificou-se em duas outras radiações: *tripunctata* e *Hirtodrosophila*. Na base destas duas radiações encontra-se o grupo *immigrans*, que ocorre principalmente na África, Seychelles, sul da Ásia e norte do Japão, Austrália e Ilhas do Pacífico; o grupo *quinaria*, encontrado na Europa, no Oriente e na América do Norte; o grupo *testacea*, formado por duas espécies, *D. putrida* e *D. testacea*, a primeira encontrada na América do Norte, e a segunda ocorrendo desde a América do Norte, até a Europa e Japão; o gênero *Zaprionus*, que tem distribuição essencialmente restrita à África; o gênero *Samoaia*, que é endêmico de Samoa; e o pequeno gênero *Chaetodrosophila*, distribuído no sudeste da Ásia e Ilhas do Pacífico. Também fazem parte da base da radiação *immigrans-Hirtodrosophila*, o subgênero *Siphlodora*, que é encontrado dos EUA até o Brasil; e o grupo *denticeps*, que possui quatro espécies asiáticas.

4.2.1) Na radiação *tripunctata* (Figura I), situam-se os grupos *rubrifrons* e *macroptera*, que possuem representantes na América do Norte; os grupos *calloptera* e *pallidipennis*, distribuídos do México, através da América Central, ao Peru e Brasil; e outros grupos Neotropicais como *sticta*, *guarani*, *cardini* e *tripunctata*.

4.2.2) A radiação *Hirtodrosophila* (Figura I) perfaz os grupos proximalmente relacionados com *melanderi*, que possui espécies orientais e da América do Norte e *pinicola*; o subgênero mundialmente distribuído *Dorsilopa*; o gênero *Nesiodrosophila*, encontrado no Sudeste da Ásia, nas ilhas do Pacífico e na África; o gênero *Paramycodrosophila*, distribuído no sul da Ásia, ilhas do Pacífico, e no Novo Mundo do sudeste dos Estados Unidos até as

Índias Ocidentais, América Central e Brasil; *Scaptomyza*, de distribuição mundial; os drosofilídeos havaianos endêmicos, que formam um grupo complexo de drosofilídeos e scaptomizoides; e os gêneros micófagos *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, junto ao então subgênero *Hirtodrosophila*.

Após Throckmorton (1975), Okada (1989) e Grimaldi (1990a) tentaram organizar de forma mais consistente a sistemática de Drosophilidae e, a partir de pesquisas com caracteres morfológicos, sugeriram modificações na base taxonômica da família, como a criação de tribos e subtribos. Neste sentido, Okada (1989) utilizou 14 caracteres morfológicos para classificar, a nível de gênero, espécies das duas subfamílias (Drosophilinae e Steganinae), e para subdividir a subfamília Drosophilinae em duas tribos (Colocasiomyini e Drosophilini). Grimaldi (1990a) (Figura II), por outro lado, em uma análise cladística de 217 caracteres morfológicos de adultos avaliados em mais de 120 espécies pertencentes a 50 gêneros da família, propôs uma nova classificação, diferente daquela sugerida por Okada (1989), criando duas tribos (Cladochaetini e Drosophilini), duas subtribos, duas infratribos, e seis grupos de gêneros para Drosophilinae. Além disso, este autor propôs que os subgêneros *Hirtodrosophila*, *Lordiphosa* e *Scaptodrosophila* fossem elevados a gêneros; e que os drosofilídeos havaianos, que antes faziam parte do subgênero *Drosophila*, assim como os gêneros *Ateledrosophila* e *Nudidrosophila*, fossem incluídos em um gênero monofilético chamado *Idiomya*. Segundo Grimaldi (1990a), os gêneros *Hirtodrosophila*, *Paramycodrosophila*, *Paraliiodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* são proximamente aparentados entre si, formando um clado denominado de grupo genérico *Zygothrica* que é irmão do gênero *Idiomya*, de modo a compor um clado localizado na base da filogenia de Drosophilinae, totalmente independente do gênero *Drosophila* e com divergência posterior a *Chymomyza* e *Scaptodrosophila* (Figura II). De fato, todas estas modificações taxonômicas propostas por Grimaldi (1990a) visavam diminuir o número e a diversidade de espécies até então incluídas no gênero *Drosophila*, de modo a tornar o mesmo monofilético, e não afetar a classificação de importantes espécies modelo de laboratório, como *D. melanogaster*.

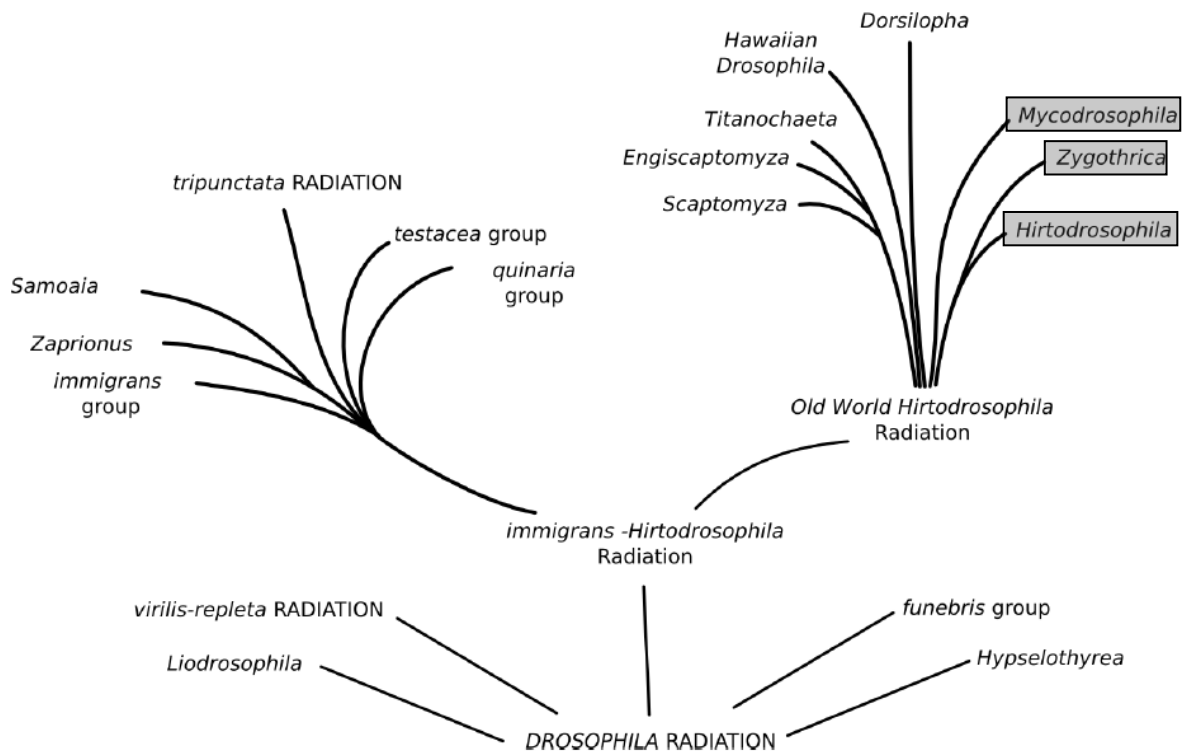


Figura I. Relações filogenéticas de Drosophilidae propostas por Throckmorton (1975) (em parte), ilustrando os componentes da radiação *Drosophila* e da sua subradiação *immigrans-Hirtodrosophila*. Os gêneros do grupo genérico *Zygothrica* (em destaque) posicionam-se dentro da radiação *Drosophila*, tornando o gênero e o subgênero *Drosophila* agrupamentos parafiléticos.

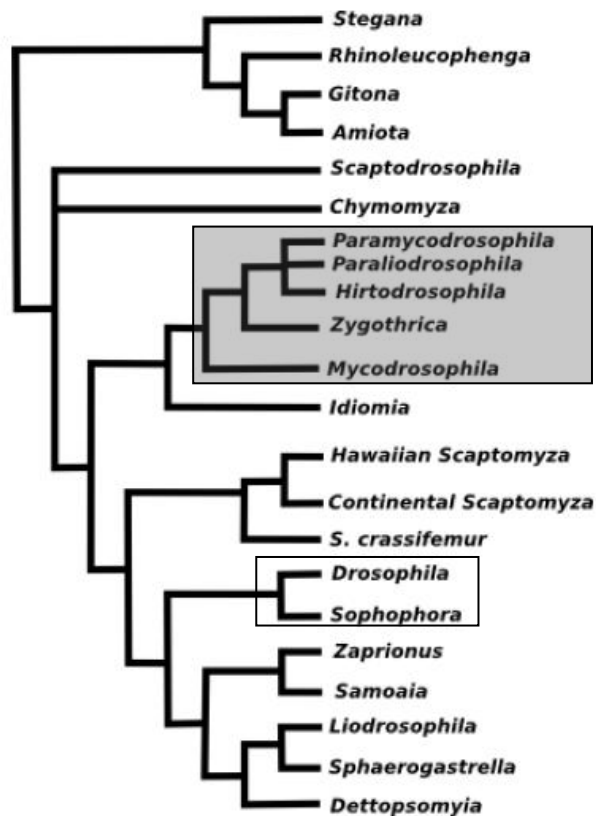


Figura II. Relações filogenéticas de Drosophilidae propostas por Grimaldi (1990a), inserindo os gêneros do grupo genérico *Zygothrica* (em destaque, dentro do retângulo cinza) em uma posição basal ao gênero *Drosophila* (em destaque, dentro do retângulo branco) (retirado de Remsen e O’Grady, 2002).

Mais recentemente, ferramentas moleculares vem auxiliando de maneira importante e algumas vezes decisiva na compreensão das relações evolutivas de Drosophilidae (Remsen & O’Grady, 2002; Van der Linde et al., 2010; Yassin, 2013). Novos marcadores moleculares e modernos sistemas computacionais e estatísticos tem facilitado o esclarecimento, ainda que não completo, destas relações (Russo et al., 1995). Entretanto, muitas questões permanecem tanto por problemas de inconsistências e controvérsias, quanto por questões de subamostragem (Robe, 2008).

Dois dos trabalhos mais completos publicados até hoje com ferramentas moleculares no que se refere a filogenia de Drosophilidae compreendem os estudos de Remsen & O’Grady (2002) e de Van der Linde et al. (2010). No primeiro caso, foi realizada uma análise combinada de 46 espécies, com o uso de seis diferentes partições de dados, incluindo tanto caracteres morfológicos quanto moleculares, enquanto no segundo caso foi realizada uma

análise de supermatriz, com o uso de 180 espécies e sequências de 13 genes. Em ambos os casos, o gênero *Drosophila* revelou-se parafilético, e o subgênero *Drosophila* subdividiu-se em dois grandes subclados bem suportados: (1) contendo o gênero *Scaptomyza* e a radiação *virilis-repleta* e (2) contendo a radiação *immigrans-tripunctata*. Entretanto, enquanto Remsen & O’Grady (2002) apresentaram *Mycodrosophila*, *Paramycodrosophila* e *Hirtodrosophila* ramificando na base de Drosophilinae (Figura III), van der Linde et al. (2010) posicionaram *Hirtodrosophila* (exceto *Hirtodrosophila duncani*), *Mycodrosophila*, *Zaprionus* e *Liodrosophila* junto a radiação *immigrans-tripunctata* (Figura IV). Um posicionamento intermediário a estes foi apresentado, mais recentemente, por Yassin (2013) , que em uma análise de supermatriz usando sete genes nucleares e oito mitocondriais, posicionou a maior parte dos representantes do grupo genérico *Zygothrica* (exceto *Hirtodrosophila actinia*) dentro do gênero *Drosophila*, mas com divergência posterior ao subgênero *Sophophora*, ainda que anterior ao subgênero *Drosophila* (Figura V).

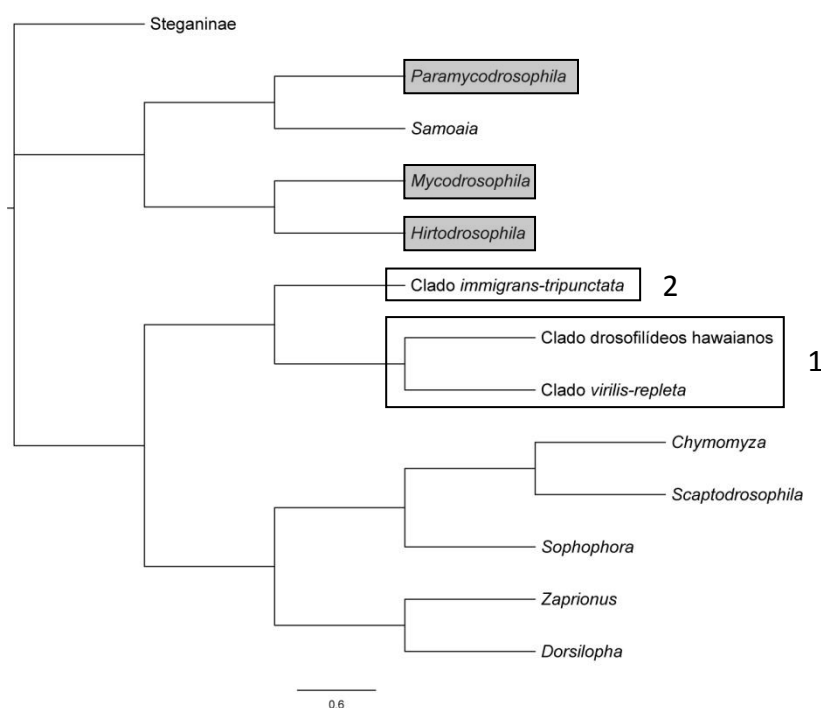


Figura III. Relações filogenéticas propostas por Remsen & O’Grady (2002), mostrando o clado *Zygothrica* (em destaque cinza) ramificando na base da filogenia de Drosophilinae, antes mesmo de *Chymomyza* e *Scaptodrosophila* e os dois subclados do subgênero *Drosophila*.

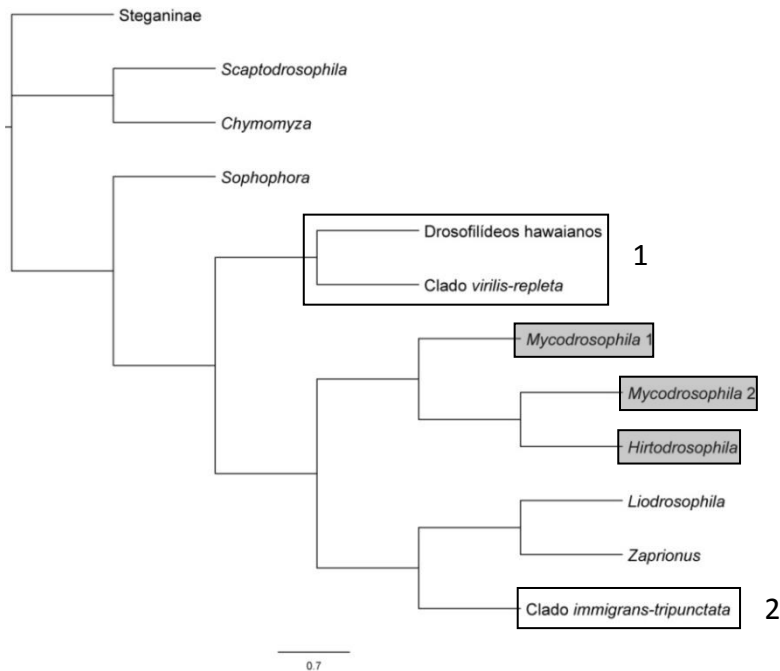


Figura IV. Relações filogenéticas propostas por van der Linde et al. (2010), mostrando *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Zaprionus* e *Liodrosophila* próximos a radiação *immigrans-tripunctata*, tornando o gênero e o subgênero *Drosophila* parafilético e os dois subclados do subgênero *Drosophila*.

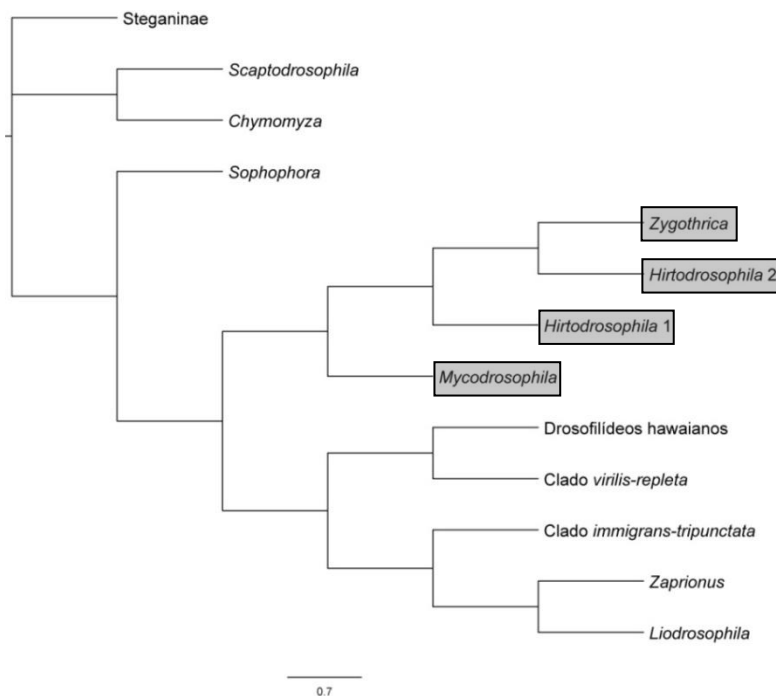


Figura V. Relações filogenéticas propostas por Yassin (2013), mostrando *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* divergindo depois do subgênero *Sophophora*, apresentando-se como grupo-irmão do subgênero *Drosophila*.

Assim, um dos pontos mais inconsistentes nas diferentes hipóteses filogenéticas propostas para Drosophilidae diz respeito ao posicionamento e mesmo a monofilia dos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila* e *Zygothrica*. Outro problema acerca dos estudos das relações filogenéticas realizados neste grupo refere-se ao fato de que, na maior parte das vezes, apenas uma amostra reduzida e enviesada de espécies destes gêneros foi utilizada. De fato, em muitos estudos, apenas *Hirtodrosophila pictiventris* foi utilizada como representante deste grupo de espécies, sendo que diferentes posicionamentos foram suportados em diferentes situações: (1) assim como Grimaldi (1990a) e Remsen & O'Grady (2002), DeSalle (1992a) apoiou *Hirtodrosophila* como uma ramificação independente de *Drosophila*, sendo que DeSalle (1992b) inferiu que *Hirtodrosophila* foi a primeira linhagem a divergir depois de *Scaptodrosophila*, de modo a apresentar um posicionamento basal com relação aos gêneros *Chymomyza*, *Zaprionus* e *Drosophila*; (2) Tatarenkov (1999, 2001) sugeriu que *Hirtodrosophila* foi o primeiro táxon a divergir depois de *Sophophora*, apoiando seu posicionamento interno ao gênero *Drosophila*, de modo semelhante ao apresentado por Katoh et al. (2000) e DaLage et al. (2007), segundo os quais *Mycodrosophila* e *Hirtodrosophila* seriam grupos irmãos, posicionados junto à base do subgênero *Drosophila*.

Todas estas inconsistências, incongruências e irresoluções contrapõem-se ao fato de que a obtenção de uma hipótese filogenética robusta para Drosophilidae apresenta uma importância fundamental (Powel & DeSalle, 1995), uma vez que propicia: 1) a análise da história evolutiva de uma grande diversidade de características já conhecidas e estudadas dentro do grupo; 2) a extrapolação ou não das eventuais conclusões obtidas a outros organismos, a partir da análise do contexto filogenético em questão; 3) a definição prévia das estratégias amostrais adequadas para qualquer tipo de projeto envolvendo espécies da família. Além disso, a inferência das relações filogenéticas dentro da família são fundamentais frente as tentativas de resolução de importantes questões taxonômicas relacionadas a este grupo de espécies (O'Grady & Markov, 2009; O'Grady, 2010).

A micofagia e o grupo genérico *Zygothrica*

Um hábito comumente encontrado em drosofilídeos é a micofagia, que pode ter sido derivada do hábito detritívoro ancestral da família (Throckmorton, 1975), e parece ter surgido várias vezes independentemente (Courtney et al., 1990). De fato, hábitos micofágicos são encontrados tanto em gêneros pertencentes à subfamília Steganinae (como *Leucophenga*),

quanto em diferentes gêneros da subfamília Drosophilinae (*Drosophila* e *Scaptomyza*, por exemplo) (Courtney et al., 1990). Entretanto, a micofagia parece representar uma sinapomorfia para os gêneros *Hirtodrosophila*, *Zygothrica* e *Mycodrosophila*, que compõem o grupo genérico *Zygothrica*, juntamente com *Paramycodrosophila* e *Paraliodrosophila* (Grimaldi, 1990a). Neste caso, *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* são considerados micófagos obrigatórios, uma vez que dependem de fungos tanto na fase larval quanto na fase adulta, enquanto *Zygothrica* pode ser encontrada tanto em fungos quanto em flores (Courtney et al., 1990). Considera-se que a maioria das espécies micófagas de Drosophilidae são generalistas (Courtney et al., 1990), o que ocorre devido à homogeneidade nutricional dos corpos de frutificação (Hanski, 1989), à imprevisibilidade espacial e temporal dos recursos (Jaenike, 1978) e a tolerância das espécies de insetos à toxinas produzidas pelos fungos (Kukor, 1987).

Entre os gêneros de drosofilídeos micófagos do grupo genérico *Zygothrica*, os mais diversos são *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, que englobam 160, 127 e 124 espécies, respectivamente (Bächli, 2016). Dentre as espécies de *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*, 28 e 54, respectivamente, estão presentes na Região Neotropical e, destas, 16 e 54 encontram-se no Brasil (Vilela & Bächli, 2005; Gottschalk et al., 2008). *Mycodrosophila*, por outro lado, apresenta apenas seis espécies com registros para o Neotrópico, três das quais ocorrem no Brasil (Wheeler & Takada, 1963). Por fim, *Paraliodrosophila* é um gênero pequeno, e das suas cinco espécies, duas estão presentes no Brasil (Vilela & Bächli, 2007). Entretanto, um trabalho de prospecção por DNA Barcode, recentemente realizado por Machado (2015), demonstrou a existência de altos níveis de diversidade críptica no grupo genérico *Zygothrica* ao longo do território brasileiro. Neste sentido, recentemente, Junges et al. (2015) descreveram duas espécies novas de *Mycodrosophila*, embora muitas outras espécies, deste e de outros gêneros do grupo, permaneçam por ser descritas.

Grande parte das coletas por moscas micófagas no Brasil ocorreu entre as décadas de 1940 e 1960, quando novas espécies de *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* foram encontradas (Burla, 1956; Cordeiro, 1952; Frota-Pessoa, 1945, 1951; Mourão et al., 1965). Neste sentido, já em 1951, Frota-Pessoa destacou que espécies micófagas em geral (mas particularmente aquelas pertencentes ao gênero *Hirtodrosophila*) devem estar sendo subamostradas na região Neotropical por causa da maneira com que são feitas as coletas. De fato, desde aqueles dias

até hoje, o principal modo de coleta de drosofilídeos utiliza-se de armadilhas contendo iscas com frutas fermentadas, que atraem preferencialmente moscas de hábitos frugívoros (Robe et al., 2014). Além disso, mesmo as amostragens direcionadas para a captura de drosofilídeos micófagos geralmente se dão de forma ocasional, não-repetitiva e com coleta de poucos indivíduos da mesma espécie. Nestas circunstâncias, somam-se ainda as dificuldades associadas ao impedimento taxonômico, já que poucos taxonomistas no mundo são capazes de determinar estas espécies com sucesso (Bolzan, 2011).

A associação com fungos em diferentes momentos do ciclo de vida, como sítios de alimentação, oviposição ou acasalamento, faz com que as espécies micófagas sejam mais facilmente encontradas em áreas úmidas (Grimaldi, 1987). Neste sentido, estudos direcionados para a coleta de drosofilídeos pousados ou sobrevoando corpos de frutificação de fungos com o uso de aspirador entomológico (Machado et al., 2014) tem apresentado resultados positivos, especialmente quando realizados em áreas florestadas, nas proximidades de cursos d'água (Machado, comunicação pessoal). De fato, estratégias deste tipo tem resultado não apenas em novos registros, como também no aumento da área de distribuição conhecida para diferentes espécies (Robe et al., 2014). Como esta associação, ainda que indireta, a ambientes aquáticos deve ter surgido como um co-produto do hábito micófono *per se*, cogita-se que a evolução das espécies micófagas esteja diretamente relacionada aos eventos geoclimáticos que afetaram esses ambientes. Isto torna estas espécies potenciais organismos modelo no estudo de diferentes questões evolutivas, ampliando seu escopo de interesse.

Nesse sentido, os resultados bem-sucedidos apresentados pelo teste e implementação da técnica de DNA Barcode na identificação e descoberta de espécies micófagas Neotropicais dos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila* e *Zygothrica* por representantes do nosso grupo de pesquisa (Machado, 2015) fornecem boas perspectivas. Esta técnica propõe a utilização de uma região do gene mitocondrial *COI* (*citocromo oxidase c subunidade I*) que, segundo Hebert et al. (2003), seria capaz de distinguir indivíduos de diferentes espécies, porque a variação genética interespecífica é maior que a variação genética intraespecífica. No estudo de Machado (2015), as espécies moleculares foram associadas com sucesso às espécies morfológicas, levando ao registro de pelo menos 24 possíveis novas espécies. Este trabalho demonstrou que a implementação da tecnologia do DNA-Barcode

pode ser bastante promissora, auxiliando não apenas na identificação da diversidade críptica de drosofilídeos micófagos, como também na superação do impedimento taxonômico relacionado a estas espécies.

Assim, embora de modo geral a falta de estudos relacionados a drosofilídeos micófagos esteja associada a grandes lacunas no conhecimento acerca da ecologia e evolução do grupo, espera-se que a implementação de métodos taxonômicos integrativos empregando a metodologia molecular como ferramenta complementar ajude superar as deficiências. O adequado posicionamento filogenético destas espécies dentro de Drosophilidae é fundamental em face às tentativas de modificação taxonômica do grupo, que atingiram seu ápice em 2007 e 2008 (van der Linde et al., 2007; O'Grady et al., 2008; Sidorenko, 2008; Yassin, 2008). Além disso, como destacado acima, o estudo da evolução dos drosofilídeos micófagos pode fornecer *insights* para o impacto de diferentes eventos geoclimáticos na diversificação deste e de outros grupos de espécies. Por fim, é importante destacar que a compreensão de seus aspectos ecológicos e evolutivos é muito importante frente à crise de biodiversidade que ora se instaura, já que muitas destas espécies podem ser especialmente vulneráveis às flutuações climáticas que devem atingir a região Neotropical nas próximas décadas e séculos (Robe et al., 2014).

Zygothrica

As moscas pertencentes a esse gênero podem ser encontradas principalmente em fungos e flores, mas poucas destas espécies utilizam fungos para a oviposição e desenvolvimento larval (Courtney et al., 1990, Grimaldi, 1987). Muitas espécies do gênero são encontradas na Costa Rica, mas também existem registros para outros países da América Central, para o México, Peru, Colômbia, Sul do Brasil, Bolívia e até mesmo para a África (Wheeler, 1981; Grimaldi, 1990b). Neste sentido, Grimaldi (1987) sugeriu *Zygothrica* como o gênero mais especioso entre os drosofilídeos Neotropicais.

Segundo Grimaldi (1990a), as características que apoiam a monofilia do grupo são: esclerotização da região posterior do cibarium, a presença de apenas um ramo ventral na arista e de uma placa hipoproctal na região medial ventral dos cercos. No entanto, as características gerais mais notáveis de *Zygothrica* referem-se ao padrão de cores: no tórax o notum pode apresentar apenas uma cor ou conter listras longitudinais discretas e suas asas muitas vezes

apresentam padrões de manchas características (Grimaldi, 1987). Além disso, machos de algumas espécies de *Zygothrica* apresentam hipercefalia, protuberância ao lado da cabeça utilizada em combates para defesa de território e corte (Grimaldi & Fenster, 1989).

Grimaldi (1987) utilizou caracteres morfológicos e comportamentais a fim de analisar as relações filogenéticas de *Zygothrica*. Neste estudo, o autor sugeriu fortemente que *Zygothrica* é um gênero monofilético, embora tenha destacado que as relações dentro do grupo, em alguns casos, poderiam ser ambíguas. Segundo este autor, relações mais derivadas dentro do grupo são difíceis de serem distinguidas, enquanto que relações entre pequenos grupos de espécies podem ser mais facilmente compreendidas. Assim, as relações filogenéticas de muitas espécies pertencentes a este gênero são, ainda, desconhecidas.

Hirtodrosophila

Hirtodrosophila é geralmente descrito na Região Neotropical, apresentando espécies nos Estados Unidos, Brasil, Chile, México, Costa Rica, El Salvador, Peru, Bolívia, Panamá, Porto Rico, Haiti e Índias Ocidentais (Wheeler, 1981). É considerado um gênero com espécies micófagas obrigatórias (Courtney et al., 1990). Segundo Valer et al. (2016), *Auricularia* parece fornecer o principal sítio de desenvolvimento larval de para o grupo *hirticornis* na região Sul do Brasil, embora outras espécies sejam também encontradas em associação a outros gêneros de fungos. Por exemplo, Roque et al. (2006) realizaram coletas de drosofilídeos adultos sobrevoando fungos e verificaram a emergência a partir de corpos de frutificação de *Pleurotus* e outros gêneros de *Agaricales* e *Boletales* no Cerrado do Brasil, o que resultou na identificação de 20 espécies pertencentes a cinco gêneros de Drosophilidae (*Drosophila*, *Hirtodrosophila*, *Leucophenga*, *Zaprionus* e *Zygothrica*), dos quais *Hirtodrosophila* foi o mais abundante.

No que se refere às relações intragenéricas, o próprio Throckmorton (1975) já sugeriu que *Hirtodrosophila* pode ser um agrupamento artificial, apresentando diferentes ramificações para cada um dos seus grupos de espécies. Estudos posteriores apresentaram *Hirtodrosophila* como um táxon polifilético (Da Lage et al., 2007; van der Linde et al., 2010). Yassin (2013) sugeriu que *Hirtodrosophila* seja parafilético com relação a *Zygothrica*, enquanto que, de acordo com Katoh et al. (2000), *Hirtodrosophila* é parafilético com relação a *Mycodrosophila*.

Mycodrosophila

Este gênero é representado por espécies micófagas obrigatórias, predominantemente distribuídas ao longo da África, Ásia e Austrália (Burla, 1954; Okada, 1956, 1965, 1968, 1986; Bock, 1980). De fato, apenas cinco espécies do gênero são encontradas no Brasil (*M. projectans*, *M. elegans*, *M. brunnescens*, *M. valentae* e *M. hofmanni*) (Wheeler e Takada, 1963; Junges et al., 2015). Espécies de *Mycodrosophila* costumam ser coletadas em associação com fungos Polyporaceae (Gottschalk et al., 2009; Wheeler & Takada, 1963), Tricholomataceae (Grimaldi, 1987), Agaricaceae (Gottschalk et al., 2009) e Pleurotaceae (Roque e Tidon, 2008).

Paraliodrosophila

Embora o hábito micófago possa não ser tão evidente em *Paraliodrosophila* como em espécies de *Mycodrosophila* e *Hirtodrosophila*, ele é bastante provável para gênero (Vilela & Bächli, 2007). Espécies do gênero foram coletadas emergindo de fungos desde o trabalho de Gottschalk et al. (2009). Espécies deste gênero vem sendo encontradas no México, América Central e Sul do Equador (Wheeler, 1981) e no Brasil (Vilela & Bächli, 2007). Segundo Vilela & Bächli (2007), exemplares do gênero são relativamente pequenas, medindo cerca de 2mm de comprimento, e podem ser comumente confundidas com espécies de outros gêneros micófagos. Porém, possuem características que as distinguem, como, por exemplo, cabeças maiores e mais brilhantes do que as apresentadas por espécies de *Hirtodrosophila*.

OBJETIVOS

Dadas as circunstâncias acima mencionadas, esta dissertação tem como objetivo geral auxiliar no esclarecimento dos padrões evolutivos associados à diversificação de espécies Neotropicais pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Zygothrica*, *Mycodrosophila* e *Paraliodrosophila*. Neste sentido, seus objetivos específicos são:

- Investigar a monofilia e o posicionamento filogenético dos quatro gêneros dentro de Drosophilidae;
- Acessar as relações filogenéticas interespecíficas dentro dos quatro gêneros mencionados;
- Inferir o cenário espaço-temporal de evolução destas espécies;
- Auxiliar na resolução da sistemática deste grupo.

Referências

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A. et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287, 2185–2195.
- Bächli, G., 2014. Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. <http://www.taxodros.uzh.ch/>. Acesso em: 04/07/2016.
- Bolzan, A. R., 2011. DNA Barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, Santa Maria, RS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 86p.
- Burla, H., 1956. Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur *Drosophila*-untergattung *Hirtodrosophila*. *Mitt. Zool. Mus. Berlin*. 2, 189-321.
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B. et al., 2010. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*. 328,1164–1168.
- Cavasini, R., Buschini, M.L.T., Machado, L.P.B., Mateus, R.P., 2014. Comparison of Drosophilidae (Diptera) assemblages from two highland Araucaria Forest fragments, with and without environmental conservation policies. *Braz. J. Biol.* 74, 761-768.
- Cordeiro, A. R., 1952. *Drosophila (Hirtodrosophila) caxienseis*, a new species of fungus-feeding fly from Brasil. *Dusenian*. 3, 303-308.
- Costa-Lima, A., 1937. Outras moscas cujas larvas são predadoras de Coccídeos. *Chácaras e Quintais*. 55, 179-182.
- Courtney, S. P., Kibota, T. T., Singleton, T. A., 1990. Ecology of mushroom feeding Drosophilidae. *Adv. Ecol. Res.* 20, 225-274.
- Culik, M. P.; Ventura, J.A., 2009. New species of *Rhinoleucophenga*, a potential predator of pineapple mealybugs. *Pesq. agropec. bras.* 44, 417-420.
- DaLage, J.L., Dergoat, G.J., Maczkowiak, F., Silvain, J.F., Cariou, M.L., Lachaise, D., 2007. A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophilamelanogaster* species group boundaries. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 45, 47-63.
- DeSalle, R., 1992a. The phylogenetic relationships of Xies in the family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1, 31–40.
- DeSalle, R., 1992b. The origin and possible time of divergence of the Hawaiian Drosophilidae: Evidence from DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 905-916.
- D'Horta, F.M., 2009. Filogenia molecular e filogeografia de espécies de passeriformes (Aves): história biogeográfica da região neotropical com ênfase na Floresta Atlântica, São Paulo, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 125p.

- Dobzhansky, T., Pavan, C., 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. Bol. Fac. Filos. Univ. São Paulo. 36, 7-72.
- Frota-Pessoa, O. 1951. *Drosophila (Hirtodrosophila) magnarcus* n. sp. (Diptera, Drosophilidae). Rev. Bras. Entomol. 11, 407-411.
- Frota-Pessoa, O., 1945. Sobre o subgênero *Hirtodrosophila*, com descrição de uma nova espécie (Diptera, Drosophilidae, *Drosophila*). Rev. Bras. Entomol. 5, 469-483.
- Gaston, K.J., 1991. The Magnitude of Global Insect Species Richness. Conserve. Biol. 5, 283-296.
- Gottschalk, M. S., Hofmann, P. R. P., Valente, V. L. S., 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. Check List. 4, 485-518.
- Gottschalk, M.S., Bizzo, L., Döge, J.S., Profes, M.S., Hofmann, P.R.P., Valente, V.L.S., 2009. Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. Iheringia. Sér. Zool. 99, 442-448.
- Grimaldi, D. A. 1990b. Revision of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae), Part II. The first African species, two New Indo-Pacific groups, and the *bilineata* and *samoensis* species groups. Am. Mus. Novit. 2964, 1-31.
- Grimaldi, D., Fenster, G., 1989. Evolution of extreme sexual dimorphisms: structural and behaviour convergence among broad-headed male Drosophilidae (Diptera). Am. Mus. Novit. 2939, 1-25.
- Grimaldi, D.A., 1987. Amber fossil Drosophilidae (Diptera), with particular reference to the Hispaniolan taxa. Am. Mus. Novitates. 2880, 1-23.
- Grimaldi, D.A., 1990a. A phylogenetic, revised classification of the genera in the Drosophilidae (Diptera). Bull. Am. Mus. Natl. Hist. 197, 1-139.
- Hanski, I. Fungivory: fungi, insects and ecology. Em: Wilding, N.; Collins, N. M.; Hammond, P. M.; Webber, J. B. 1989. Insect-fungus interaction. 14th Symposium of Royal Entomological Society London. London: Academic Press, 25-68.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. P. Roy. Soc. Lond. B. Bio. 270, 313-321.
- Hsu, T.C., 1949. The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to systematics. University of Texas Publication. 4920, 80-142.
- Jaenike, J., 1978. Resource predictability and niche breadth in the *Drosophila quinaria* species group. Evolution. 32, 676-678.

- Junges, J., Gottschalk, M.S., Loreto, E.L.S., Robe, L.J., 2015. Two new species of *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae) proposed by molecular and morphological approaches, with a key to American species. *Rev. Bras. Entomol.* 60, 30-39.
- Kaneshiro, K.Y., 1969. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. University of Texas Publication. 6918, 55-70.
- Katoh, T., Tamura, K., Aotsuka, T., 2000. Phylogenetic position of the subgenus *Lordiphosa* of the genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) inferred from AlcoholDehydrogenase (*Adh*) gene sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 51, 122-130.
- Kukor, J. J., Martin, M. M. Nutritional ecology of fungos-feeding arthropods. Em: Slansky, J.R., Rodriguez, J. G., 1987. *Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders, and Related Invertebrates.* New York: John Wiley. 791-814.
- Lack, J.B., Cardeno, C. M., Crepeau, M. W., Taylor, W., Corbett-Detig, R. B., Stevens, K.A., Langley, C.H., Pool, J.E., 2015. The *Drosophila* Genome Nexus: A Population Genomic Resource of 623 *Drosophila melanogaster* Genomes, Including 197 from a Single Ancestral Range Population. *Genetics.* 199, 1229-1241.
- Lapoint, R. T., O'Grady, P. M., Whiteman, N. K., 2013. Diversification and dispersal of the Hawaiian Drosophilidae: The evolution of *Scaptomyza*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 95–108.
- Lewinsohn, T.M., Prado, P.I., 2005. How Many Species Are There in Brazil? *Conserv. Biol.* 19, 619–624.
- Machado, S., 2015. Aspectos taxonômicos, ecológicos e evolutivos em drosofilídeos neotropicais. Santa Maria, RS. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 204p.
- Machado S., dos Santos, J.P.J., Robe, L.J., Loreto, E.L.S., 2014. An efficient and cheap entomological aspirator to collect mycophylic and anthophilic adult Drosophilidae flies. *Drosoph. Inf. Serv.* 97, 169- 171.
- Markow, T.A., O'Grady, P.M., 2006. Phylogenetic relationships of Drosophilidae. In: Markow, T.A., O'Grady, P.M. *Drosophila: A guide to species identification and use.* Academic Press, London, pp. 3-64.
- Mourão, C. A.; Gallo, A. J.; Bicudo, H. E. M. C. 1965. Sobre a sistemática de *Drosophila* no Brasil, com descrição de *D.mendeli* sp.n. e relação de espécies brasileiras de *Drosophila*. *Ciência e Cultura*, 17: 587-596.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 403, 853-858.

- Noor, M. and Akashi, H. 2001. *Drosophila* Evolutionary Genetics. eLS. Prigent, S. R.; Toda, M. J. 2006. A revision of the *Zygothrica samoensis* species group (Diptera: Drosophilidae), with division into three species subgroups and description of five new species. *Entomological Science*, 9: 191–215.
- O’Grady, P. M., Markow, T.A., 2009. Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. *Fly*. 3, 1-5.
- O’Grady, P.M., 2010. Whither *Drosophila*? *Genetics*. 185, 703-705.
- O’Grady, P.M., Ashburner, M., Castrezana, S., 2008. Comment. *Bull. Zool. Nomencl.* 65, 141–144.
- Okada, T.A., 1989. Proposal of Establishing Tribes for the Family Drosophilidae with Key to Tribes and Genera (Diptera). *Zool. Sci.* 6, 391-399.
- Pape & Thompson., 2016. *Systema Dipteroorum*, the biosystematics database of world Diptera. Disponível em: <http://www.diptera.org>. Acesso em: 04/07/2016.
- Pool, J. E., Corbett-Detig, R. B., Sugino, R. P. , Stevens, K.A. , Cardeno, C. M., Crepeau, M. W., Duchon, P., Emerson, J. J., Saelao, P., Begun, D. J., Langley, C.H., 2012. Population Genomics of Sub-Saharan *Drosophila melanogaster*: African Diversity and Non-African Admixture. *PLoS Genet.* 8, 1-24.
- Powell, J.R., DeSalle, R., 1995. *Drosophila* molecular phylogenies and their uses. Em: Hecht, M.K. (Ed.), *Evolutionary Biology*. Plenum, New York, 87–139.
- Remsen, J., Desalle, R., 1998. Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 225 – 235.
- Remsen, J., O’Grady, P. O., 2002. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae) with comments on combined analysis and character support. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24, 249–264.
- Robe, L. J., 2008. Relações filogenéticas no gênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae): Uma abordagem molecular. Porto Alegre, RS. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 303p.
- Robe, L. J., Loreto, E. L. S., Valente, V. L. S., 2010b. Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 48, 310-321.
- Robe, L. J., Machado, S., Bolzan, A. R., Santos, J. P. J., Valer, F. B., Santos, A. P., Blauth, M. L., Gottschalk, M. S., 2014. Comparative ecological niche modeling and evolutionary ecology of Neotropical mycophagous Drosophilidae (Diptera) species. *Stud. Neotrop. Fauna.* E. 49, 1-16.
- Robe, L. J., Valente, V. L. S., Budnik, M., Loreto, E. L. S., 2005. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 623 – 640.

- Robe, L. J., Valente, V. L. S., Loreto, E. L. S., 2010a. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* "radiation" (Diptera: Drosophilidae). *Genetica*. 138, 725–35.
- Robe, L.J., De Ré, F.C, Ludwig, A., Loreto, E.L.S., 2013. The *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae). An array of exciting questions. *Fly*. 7, 59-69.
- Roque, F., Figueiredo, R., Tidon, R., 2006. Nine new records of drosophilids in the Brazilian savanna. *Drosoph. Inf. Serv.* 89, 14-17.
- Roque, F., Tidon, R., 2008. Eight new records of drosophilids (Insecta: Diptera) in the Brazilian savanna. *Drosoph. Inf. Serv.* 91, 94- 98.
- Russo, C.A.M., Takezaki, N., Nei, M., 1995. Molecular phylogeny and divergence times of Drosophilid species. *Mol. Biol. Evol.* 12, 391-404.
- Sidorenko, V., 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* (Insecta, Diptera). *Bull. Zool. Nomencl.* 65, 98.
- Singh, N. D., Singh, Larracunte, A. M, Sackton, T. B., Clark, A. G., 2009. Comparative Genomics on the *Drosophila* Phylogenetic Tree. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 459–80.
- Tatarenkov, A., Kwiatowski, J., Sharecky, D., Barri'ó, E., Ayala, F. J., 1999. On the evolution of Dopa decarboxylase (Ddc) and *Drosophila* systematics. *J. Mol. Evol.* 48, 445–462.
- Tatarenkov, A., Zurovcova, M., Ayala, F. J., 2001. Ddc and Amd sequences resolve phylogenetic relationships of *Drosophila*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 321–325.
- Throckmorton, L.H., 1962. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. University of Texas Publications, 6205: 207-343.
- Throckmorton, L.H., 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King RC (ed) *Handbook of genetics*. Plenum, New York, 421–469.
- Valer, F. B., Bernardi, E., Mendes, M. F., Blauth, M. L., Gottschalk, M. S., 2016. Diversity and associations between Drosophilidae (Diptera) species and Basidiomycetes in a Neotropical forest. *An. Acad. Bras. Cienc.* 88, 705-718.
- Van der Linde, K., Bächli, G., Toda, M. J., Zhang, W. -X., Katoh, T., Hu, Y., Spicer, G. S., 2007. *Drosophila* Fallen, 1823 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage. *Bull. Zool. Nomencl.* 64, 238-342.
- Van der Linde, K., Houle, D., Spicer, G. S., Stepan, S. J., 2010. A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genet. Res., Camb.* 92, 25-38.
- Vilela, C. R., Bächli, G., 2005. Three new species of Neotropical Drosophilidae (Diptera). *Mitt. Munch. Entomol. Ges.* 78, 143-163.

Vilela, C.R., Bachli, G., 2007. Revision of the Neotropical genus *Paraliodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). Mitt. Munch. Entomol. Ges. 80, 291-317.

Wheeler, M. R., 1981. The Drosophilidae: A taxonomic overview; p. 1-85 *Em* M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N. Thompson, Jr. (ed.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. London. Academic Press.

Wheeler, M.R., Takada, H., 1963. A revision of the American species of *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 56, 392-399.

Yassin, A., 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* (Insecta, Diptera). Bull. Zool. Nomencl. 65, 96.

Yassin, A., 2013. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. Syst. Entomol. 38, 349–364.

CAPÍTULO ÚNICO

Filogenia molecular dos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* (Diptera, Drosophilidae) e seu posicionamento dentro de *Drosophila*

Manuscrito a ser submetido para a revista Molecular Phylogenetics and Evolution.

Filogenia molecular dos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* (Diptera, Drosophilidae) e seu posicionamento dentro de *Drosophila*

Gautério, T.B.¹; Machado, S.²; Loreto, E.L.S.²; Gottschalk, M.S.³; Robe, L.J.^{1,2}

1 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Av. Itália, km 08, Campus Carreiros, CEP 96203-900 - Rio Grande, RS – Brasil, Phone: +55 53 3293-5128

2 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Avenida Roraima, 1000, CEP 97105-900 - Santa Maria, RS - Brazil, Phone: +55 55 3220-8912

3 Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Campus Capão do Leão, Mail Box 354, CEP 96010-900 - Capão do Leão, RS – Brazil, Phone: +55 53 3275-7340

Resumo

Ainda que *Drosophila melanogaster* compreenda o organismo *premier* de diversas áreas da biologia, suas relações evolutivas para com muitos outros representantes da família Drosophilidae é ainda incompreendida. Isto ocorre devido a grande diversidade da família e ao viés amostral direcionado a alguns de seus representantes, e é especialmente grave devido ao caráter parafilético apresentado por *Drosophila* frente a um crescente número de espécies. O grupo genérico *Zygothrica* abrange os gêneros *Hirtodrosophila*, *Zygothrica*, *Mycodrosophila*, *Paramycodrosophila* e *Paraliiodrosophila*, para os quais a micofagia parece ser uma sinapomorfia, ainda que apresentada de diferentes maneiras. Apesar da grande diversidade apresentada pelo grupo, especialmente na região Neotropical, sua monofilia e o seu posicionamento dentro de Drosophilidae ainda são controversos, enquanto suas relações internas ainda são, em sua maior parte, desconhecidas. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi auxiliar no esclarecimento dos padrões evolutivos associados à diversificação de espécies Neotropicais pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Zygothrica*, *Mycodrosophila* e *Paraliiodrosophila*. Para isso, fragmentos de 917 pb, 787 pb, 962 pb e 1184 pb referentes aos genes *COI*, *COII*, *Amd* e *Ddc*, respectivamente, foram caracterizados para 59 espécimes de drosofilídeos micófagos distribuídos em diversos estados brasileiros. Esta matriz foi acrescida de sequências de outras 50 espécies de Drosophilidae, e os dados foram avaliados individual e simultaneamente sob diferentes métodos filogenéticos. Nossos resultados revelaram quatro principais linhagens dentro do gênero *Drosophila*, as quais parecem ter se diversificado a partir do Eoceno: a primeira formada por espécies pertencentes ao subgênero *Sophophora*; a segunda formada por representantes da radiação *immigrans-tripunctata*; a terceira composta pelos drosofilídeos hawaianos junto aos membros da radiação *virilis-repleta*; e a quarta formada pelo clado que incorpora o gênero *Zaprionus* junto ao grupo genérico *Zygothrica*. As linhagens 3^a e 4^a apareceram mais proximamente relacionadas entre si, resultado que difere dos achados anteriores. Embora a monofilia do grupo genérico *Zygothrica* com relação aos gêneros melhor amostrados *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* tenha sido recuperada, ambos os gêneros revelaram-se parafiléticos, e alguns representantes de *Hirtodrosophila* representaram as ramificações basais dentro do grupo genérico, enquanto outros apresentaram posicionamentos derivados dentro do gênero *Zygothrica*. Este último, em particular, apresentou-se subdividido em quatro clados principais, cujos eventos de especiação datam, em sua maioria, para o Mioceno. Este estudo evidencia, portanto, a parafilia adicional de *Drosophila* com relação a espécies Neotropicais pouco estudadas até o momento, atribuindo para estas uma quarta radiação dentro do gênero, cujos padrões espaço-temporais de diversificação assemelham-se bastante aqueles previamente inferidos para as outras três linhagens até então melhor caracterizadas.

Palavras-chave: grupo genérico *Zygothrica*, *Amd*, *Ddc*, *COI*, *COII*.

1. Introdução

Drosophilidae é considerada uma família extremamente especiosa, com mais de 4.300 espécies divididas em duas subfamílias e 76 gêneros (Bächli, 2016). Indivíduos desta família podem estar presentes nos mais variados tipos de ambientes, desde os trópicos até as tundras (Throckmorton, 1975). Além disso, este táxon também se destaca pela sua grande diversidade ecológica, compreendendo espécies com adaptações para o uso de diferentes recursos, desde frutos, flores, seiva, cactos, até fungos macroscópicos (Carson, 1971; Markow & O'Grady 2008). Apesar desta diversidade, a família é popularmente conhecida por compreender *Drosophila melanogaster*, considerada o organismo modelo *premier* da genética (Markow & O'Grady, 2006). De fato, esta espécie tem contribuído imensamente para pesquisas científicas na área da biologia, medicina e farmacologia, mas principalmente no âmbito da genética evolutiva.

Já há algum tempo, o caráter parafilético do gênero *Drosophila* vem sendo suportado (Throckmorton, 1975; Remsen & DeSalle, 1998; Tatarenkov et al., 2001; Remsen & O'Grady, 2002; Robe et al., 2005; DaLage et al., 2007; Robe et al., 2010; van der Linde et al., 2010; Yassin, 2013). A solução usual em casos como este, que seria a subdivisão do gênero, poderia levar a alteração no nome genérico de sua espécie mais famosa, que passaria a se chamar *Sophophora melanogaster*, já que a espécie tipo do gênero, *D. funebris*, pertence a outro grupo de espécies. Neste sentido, em 2007, van der Linde escreveu uma petição para o Comitê de Nomenclatura Zoológica solicitando a designação de *D. melanogaster* como espécie tipo de *Drosophila* (van der Linde et al., 2007). Embora a proposta tenha sido rejeitada por ampla maioria de votos, muitos membros do comitê destacaram o fato de que grande parte das relações filogenéticas dentro de *Drosophilidae* são ainda insuficientemente compreendidas, de forma que qualquer decisão seria extremamente prematura.

De fato, diversos pontos da filogenia de *Drosophilidae* permanecem controversos ou não foram estudados com a devida atenção. Nesta situação de incompreensão encontram-se os gêneros micófagos *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Zygothrica* e *Paraliodrosophila*, que compõem o grupo genérico *Zygothrica* proposto por Grimaldi (1990). Entre estes gêneros, o hábito micófago é bastante heterogêneo, e para muitas espécies, principalmente nos gêneros *Paraliodrosophila* e *Zygothrica*, o tipo exato de associação com fungos é ainda desconhecido. De fato, enquanto *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* são consideradas micófagas

obrigatórias, já que os indivíduos necessitam dos fungos em todas as etapas de seu desenvolvimento, apenas 10% das espécies de *Zygothrica* se alimentam de fungos na fase larval (Courtney et al., 1990). Entretanto, a associação com fungos em outros momentos do ciclo de vida, como sítios de acasalamento ou alimentação na fase adulta, faz com que estas espécies sejam mais facilmente encontradas em áreas úmidas (Grimaldi, 1987). De modo geral, espécies destes gêneros são pouco estudadas devido: (1) ao viés amostral proporcionado pelo uso predominante de armadilhas com iscas de frutas nas coletas, que atraem preferencialmente drosofilídeos frugívoros; (2) ao impedimento taxonômico, já que são raros os taxonomistas capacitados para a identificação destes organismos; (3) às dificuldades impostas pela impossibilidade de manter estes organismos em laboratório.

Mesmo entre os poucos estudos com enfoque filogenético conduzidos com espécies do grupo genérico *Zygothrica*, existem muitas incongruências, e estas não se limitam a questões de diferenças entre marcadores empregados. Com o uso de marcadores morfológicos, por exemplo, Throckmorton (1975) situou os gêneros *Hirtodrosophila*, *Zygothrica* e *Mycodrosophila* dentro da radiação *immigrans-Hirtodrosophila*, de modo a tornar tanto o gênero como o subgênero *Drosophila* parafiléticos, enquanto Grimaldi (1990) posicionou o grupo genérico *Zygothrica* como irmão do gênero *Idiomyia*, de modo a compor um clado basal dentro de Drosophilinae. Já com o uso de marcadores moleculares, em um enfoque de supermatrizes, van der Linde et al. (2010) posicionaram *Hirtodrosophila* (exceto *Hirtodrosophila duncani*), *Mycodrosophila*, *Zaprionus* e *Liodrosophila* junto a radiação *immigrans-tripunctata*, enquanto Yassin (2013) apresentou a maior parte dos representantes do grupo genérico *Zygothrica* (exceto *Hirtodrosophila actinia*) como membros de um clado que divergiu após *Sophophora*.

Em face a este conjunto de fatores e incongruências, o presente estudo tem o objetivo de auxiliar no esclarecimento dos padrões evolutivos associados à diversificação de espécies Neotropicais pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica*, em especial aos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*, ao tentar acessar não apenas a sua monofilia e o seu posicionamento dentro de Drosophilidae, mas também as relações intra e intergenéricas. Este estudo também busca estimar, com o uso de um relógio molecular relaxado autocorrelacionado, os intervalos de confiança para estes e outros tempos de divergência

dentro de Drosophilidae, de modo a tentar inferir o cenário espaço-temporal associado a diversificação destas espécies.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem e identificação dos espécimes

As espécies utilizadas no presente estudo foram coletadas em 21 pontos localizados nos estados brasileiros do Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Tabela 1, Figura 1). Em cada um dos pontos de coleta, indivíduos adultos encontrados sobrevoando corpos de frutificação de fungos foram coletados com auxílio de um aspirador (Machado et al., 2014) ou rede entomológica. Quando possível, os corpos de frutificação também foram coletados, para que as moscas adultas pudessem ser amostradas após a eclosão.

Tabela 1. Espécimes de drosofilídeos pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica* utilizados no presente estudo, com seus respectivos locais de coleta e coordenadas, e o número de acesso de suas sequências no GenBank.

| Espécie | Estado | Ponto de Coleta | Latitude | Longitude | Acesso GB - Amd | Acesso GB - Ddc | Acesso GB - COI | Acesso GB - COII |
|-------------------------------|--------|----------------------------|----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>H. gilva</i> | SC | Florianópolis | -29,38 | -49,83 | + | + | + | + |
| <i>H. levigata</i> 3 | RS | Pelotas | -31,82 | -52,43 | - | - | + | + |
| <i>H. levigata</i> | RS | Santa Maria | -29,68 | -53,72 | + | - | + | - |
| <i>H. levigata</i> 2 | RS | Santa Maria | -29,68 | -53,60 | + | - | + | - |
| <i>H. magnarcus</i> | RS | São Francisco de Paula | -29,42 | -50,39 | + | + | + | + |
| <i>H. magnarcus</i> 2 | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | + | + |
| <i>H. mendeli</i> | RS | Bossoroca | -28,52 | -54,98 | - | - | + | - |
| <i>H. minuscula</i> | RJ | Nova Iguaçu | -22,57 | -43,43 | + | + | + | + |
| <i>H. morgani</i> | RS | Bossoroca | -28,52 | -54,98 | - | - | + | + |
| <i>H. morgani</i> 2 | RS | Cristal | -31,82 | -52,43 | + | - | - | - |
| <i>Hirtodrosophila</i> sp.1 | RJ | Nova Iguaçu | -22,57 | -43,43 | + | - | + | - |
| <i>M. elegans</i> | PR | Foz do Iguaçu | -25,62 | -54,48 | + | - | - | - |
| <i>M. Nova</i> | RS | São Francisco de Paula | -29,42 | -50,39 | + | - | + | - |
| <i>M. projectans</i> | RS | Santa Maria | -29,72 | -53,71 | + | - | - | + |
| <i>M. projectans</i> 2 | RS | Pelotas | -31,82 | -52,43 | + | - | + | + |
| <i>M. projectans</i> aff. 1 | RS | Derrubadas | -27,14 | -53,88 | - | - | + | + |
| <i>M. projectans</i> aff. 1_2 | PR | Foz do Iguaçu | -25,62 | -54,48 | - | - | + | + |
| <i>M. projectans</i> aff. 2_3 | RS | São Luiz Gonzaga/Bossoroca | -28,52 | -54,98 | - | - | - | + |
| <i>M. projectans</i> aff. 2 | PR | Foz do Iguaçu | -25,62 | -54,48 | - | - | + | + |
| <i>M. projectans</i> aff. 2_2 | PR | Foz do Iguaçu | -25,62 | -54,48 | - | - | + | + |
| <i>P. antennata</i> | PR | Diamante do Norte | -22,61 | -52,87 | - | - | + | - |
| <i>P. antennata</i> 2 | RS | Bossoroca | -28,52 | -54,98 | - | - | + | + |
| <i>Z. apopoeyi</i> | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | + | + |
| <i>Z. apopoeyi</i> 2 | RJ | Itatiaia | -22,45 | -44,6 | + | + | + | + |
| <i>Z. atriangula</i> 2 | RJ | Nova Iguaçu | -22,57 | -43,43 | + | - | + | + |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|----|------------------------|--------|--------|---|---|---|---|
| <i>Z. atriangula</i> aff. _2 | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | - | + | + |
| <i>Z. atriangula</i> | RJ | Nova Iguaçu | -22,57 | -43,43 | + | - | + | + |
| <i>Z. atriangula</i> aff. | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | - | + | + |
| <i>Z. bilineata</i> | RS | Dom Pedro de Alcantara | -29,37 | -49,85 | + | + | + | + |
| <i>Z. bilineata</i> 2 | RS | Turvo/alojamento | -27,24 | -53,96 | - | + | + | + |
| <i>Z. candens</i> | RS | São Francisco de Paula | -29,42 | -50,39 | + | + | + | + |
| <i>Z. dispar</i> | SC | Florianópolis | -27,59 | -48,47 | + | + | + | + |
| <i>Z. festiva</i> | RJ | Itatiaia | -22,45 | -44,6 | + | - | + | + |
| <i>Z. hypandriata</i> | RJ | Itatiaia | -22,45 | -44,6 | + | + | - | + |
| <i>Z. laevifrons</i> | PR | Foz do Iguaçu | -25,62 | -54,48 | - | + | + | + |
| <i>Z. mesopoeyi</i> | RJ | Itatiaia | -22,45 | -44,6 | + | + | + | + |
| <i>Z. orbitalis</i> | RS | Pelotas | -31,82 | -52,43 | + | + | + | - |
| <i>Z. orbitalis</i> 2 | RS | Pelotas | -31,82 | -52,43 | + | - | + | + |
| <i>Z. orbitalis</i> 3 | RS | Ivoti | -29,58 | -51,12 | + | - | + | + |
| <i>Z. parapoeyi</i> | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | - | + |
| <i>Z. parapoeyi</i> 2 | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | + | + |
| <i>Z. parvipoeyi</i> | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | + | + |
| <i>Z. pleurostrigata</i> | RS | São Francisco de Paula | -29,42 | -50,39 | + | - | - | + |
| <i>Z. prodispar</i> | RS | Ivoti | -29,58 | -51,12 | - | - | + | + |
| <i>Z. ptilialis</i> 2 | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | - | - | + |
| <i>Z. ptilialis</i> 4 | SC | Florianópolis | -27,59 | -48,47 | + | - | + | + |
| <i>Z. ptilialis</i> 3 | RS | Viamão | -30,09 | -51,1 | + | - | + | + |
| <i>Z. ptilialis</i> | RS | Turvo/alojamento | -27,24 | -53,96 | + | - | + | + |
| <i>Z.vittimaculosa</i> aff. 1 | RS | Cachoeira do Sul | -30,01 | -52,92 | + | - | + | + |
| <i>Z. vittimaculosa</i> aff. 1_2 | RS | Porto Alegre | -30,03 | -51,23 | + | - | + | + |
| <i>Z. vittipunctata</i> aff. 1 | RS | São Francisco de Paula | -29,42 | -50,39 | + | + | + | + |
| <i>Z. vittipunctata</i> aff. 2 | RS | São Francisco de Paula | -29,42 | -50,39 | + | + | + | + |
| <i>Z. vittimaculosa</i> | RS | Viamão | -30,09 | -51,1 | + | - | + | + |

| | | | | | | | | |
|---------------------------|----|---------------|--------|--------|---|---|---|---|
| <i>Z. vittimaculosa</i> 2 | SC | Florianópolis | -27,59 | -48,47 | + | - | + | + |
| <i>Z. vittimaculosa</i> 3 | PA | Melgaço | -1,74 | -51,46 | + | - | + | - |
| <i>Z. vittinubila</i> | RJ | Itatiaia | -22,45 | -44,6 | + | + | + | + |
| <i>Z. vittipunctata</i> | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | + | + |
| <i>Z. zygopoeyi</i> | SC | Blumenau | -27,05 | -49,08 | + | + | + | + |

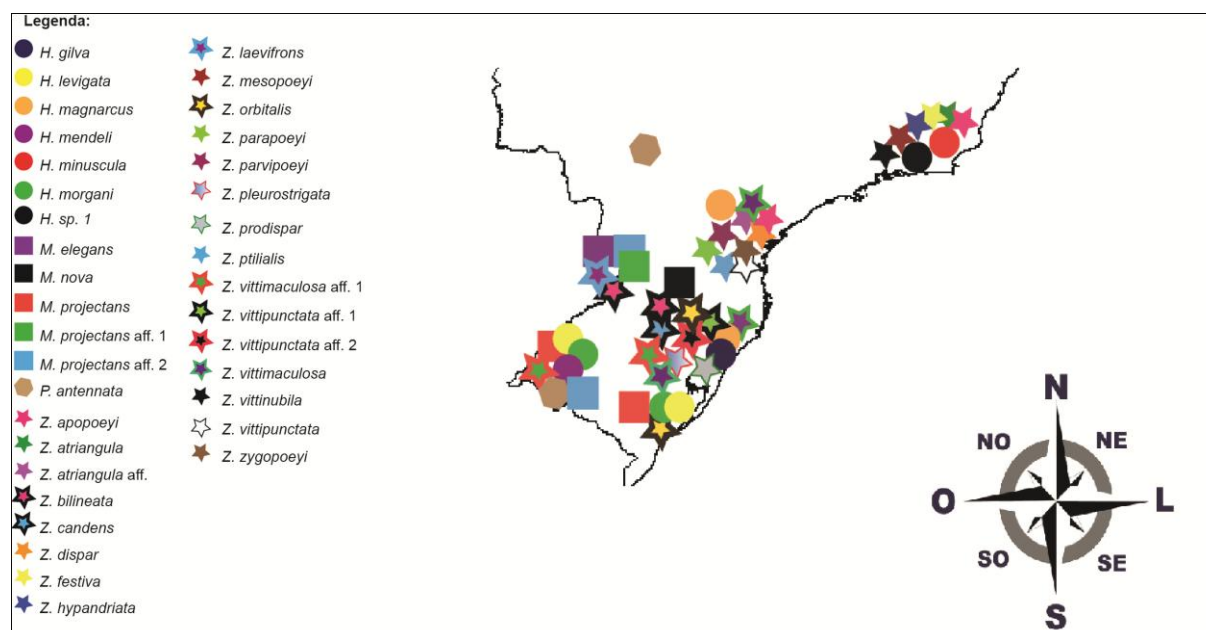


Figura 1. Locais de coleta das 36 espécies de drosofilídeos micófagos pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica* coletadas no Brasil. Os gêneros são distinguidos por diferentes símbolos, enquanto espécies do mesmo gênero são diferenciadas pela cor, conforme legenda apresentada à esquerda da figura. Obs.: Há um ponto no estado do Pará representando a espécie *Z. vittimaculosa* que não foi representado na figura.

As amostras coletadas foram conservadas em etanol 100% e posteriormente identificadas com base nos padrões de morfologia externa e na análise das genitálias dos machos. Para isso, foram realizados registros fotográficos da morfologia geral dos indivíduos, ao que se seguiu a retirada e dissecação da genitália, com preparação das lâminas segundo Wheeler & Kambyssellis (1966) e modificações descritas por Kaneshiro (1969). A identificação das espécies foi realizada através de chaves e/ou ilustrações das referências de Frota-Pessoa (1945), Burla (1956), Wheeler & Takada (1971), Grimaldi (1987, 1990 a, b) e Vilela & Bächli (2004, 2007).

Além das espécies micófagas coletadas, espécies adicionais de diferentes gêneros de Drosophilinae que apresentam sequências disponíveis para todos os marcadores estudados foram obtidas através do GenBank e acrescentadas à matriz de dados iniciais a fim de auxiliar nas questões relacionadas à monofilia e ao posicionamento filogenético dos gêneros-alvo do presente estudo. As espécies e os números de acesso das sequências para cada gene

encontram-se na Tabela 2. Além disso, sequencias de *Culex quinquefasciatus* também foram obtidas do mesmo banco de dados para uso como grupo externo.

Tabela 2. Espécies de Drosophilinae cujas sequências foram acrescentadas a matriz de dados iniciais, com seus respectivos números de acessos no GenBank.

| Família | Gênero | Subgênero | Grupo | Espécie | Ddc | Amd | COI | COII |
|----------------|-------------------|-------------------|------------------------|----------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| Culicidae | <i>Culex</i> | <i>Culex</i> | | <i>C. quinquefasciatus</i> | XM001863771 | XM001863772 | KT028689 | JQ716539 |
| Drosophilidae | <i>Drosophila</i> | <i>Drosophila</i> | <i>bromeliae</i> | <i>D. bromeliae</i> | AF324966 | AF324950 | KF632602 | AF478418 |
| | | | <i>busckii</i> | <i>D. busckii</i> | AF293733 | AF293707 | HG798345 | KF601930 |
| | | | <i>canalineae</i> | <i>D. canalinea</i> | AF324968 | AF324952 | KF632604 | JF736114 |
| | | | <i>cardini</i> | <i>D. acutilabella</i> | AY633962 | HM006861 | HM006873 | AF519317 |
| | | | | <i>D. arawakana</i> | EU446060 | EU444555 | HM006881 | HM006889 |
| | | | | <i>D. cardini</i> | EU446063 | EU444558 | HM006874 | AF519319 |
| | | | | <i>D. dunni</i> | AY126883 | HM006865 | HM006882 | HM006893 |
| | | | | <i>D. neomorpha</i> | HM006866 | HM006862 | HM006877 | HM006891 |
| | | | | <i>D. nigrodunni</i> | EU446101 | EU444582 | HM006883 | HM006894 |
| | | | | <i>D. polymorpha</i> | EU446097 | EU444592 | HM006879 | EF570040 |
| | | | <i>dreyfusi</i> | <i>D. camargoi</i> | AF324967 | AF324951 | EU493578 | EU493709 |
| | | | <i>funnebris</i> | <i>D. funnebris</i> | AF293734 | AF293709 | KF632605 | EU493710 |
| | | | <i>guarani</i> | <i>D. ornatifrons</i> | EU446090 | EU444584 | EU493582 | KF360846 |
| | | | <i>immigrans</i> | <i>D. immigrans</i> | AF293738 | AF293713 | JQ679115 | EU493716 |
| | | | <i>mesophragmatica</i> | <i>D. gaucha</i> | AF324971 | AF324955 | EU390733 | EU390745 |
| | | | | <i>D. pavani</i> | EF559370 | EF560570 | EU390732 | JF736115 |
| | | | <i>nannoptera</i> | <i>D. nannoptera</i> | AF324975 | AF324959 | DQ471531 | EU493729 |
| | | | <i>pallidipennis</i> | <i>D. pallidipennis</i> | EU446092 | EU444586 | EU493600 | AY162982 |
| | | | <i>polychaeta</i> | <i>D. polychaeta</i> | AF324976 | AF324960 | DQ471555 | EU081828 |
| | | | <i>repleta</i> | <i>D. buzzatii</i> | AF324980 | AF324947 | KF632603 | DQ202011 |
| | | | | <i>D. eohydei</i> | AF324970 | AF324954 | DQ471601 | AF145889 |
| | | | | <i>D. hydei</i> | AF293737 | AF293712 | JQ679112 | EU493736 |
| | | | | <i>D. mercatorum</i> | AF324973 | AF324957 | DQ471607 | EU493737 |
| | | | | <i>D. mulleri</i> | AF324974 | AF324958 | DQ202072 | DQ202032 |
| | | | | <i>D. repleta</i> | AF324977 | AF324961 | DQ471533 | JF736105 |
| | | | <i>robusta</i> | <i>D. robusta</i> | AF293747 | AF293724 | EU390726 | GQ244457 |
| | | | | <i>D. sordidula</i> | AF324979 | AF324963 | EU390728 | EU390759 |

| | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|----------|----------|
| | | <i>tripunctata</i> | <i>D. mediodiffusa</i> | EU446078 | EU444572 | EU493616 | EU493745 |
| | | | <i>D. mediopictoides</i> | EU446080 | EU444576 | EU493617 | EU493746 |
| | | | <i>D. mediotriata</i> | EU446084 | EU444562 | EU493618 | EU493747 |
| | | | <i>D. tripunctata</i> | AF324964 | AF293728 | EU493619 | EU493748 |
| | | | <i>D. unipunctata</i> | EU446100 | EU444595 | EU493620 | EU493749 |
| | <i>Sophophora</i> | <i>melanogaster</i> | <i>D. erecta</i> | XM001974254 | XM001974256 | JQ679121 | KM244700 |
| | | | <i>D. melanogaster</i> | AY197763 | NM165278 | GQ229519 | GQ229520 |
| | | | <i>D. simulans</i> | AY197770 | XM002079852 | M57911 | GQ222022 |
| | | | <i>D. yakuba</i> | XM002090632 | XM002090630 | KJ767248 | X00924 |
| | | <i>obscura</i> | <i>D. affinis</i> | AY754448 | AY754406 | HQ979011 | EU493758 |
| | | | <i>D. persimilis</i> | XM002023088 | XM002023085 | BK006337 | M95143 |
| | | | <i>D. pseudoobscura</i> | AF293746 | AY754405 | JQ679122 | EU493762 |
| | | <i>willistoni</i> | <i>D. nebulosa</i> | AF293742 | AF293717 | EU493640 | EU493769 |
| | | | <i>D. paulistorum</i> | AF293744 | AF293719 | EU493641 | EU532086 |
| | | | <i>D. willistoni</i> | XM002067006 | XM002067004 | JQ679116 | AY335207 |
| <i>Zaprionus</i> | <i>Zaprionus</i> | <i>vittiger</i> | <i>Z. indianus</i> | EU446103 | EU444597 | KC465965 | FJ393917 |
| | | <i>inermis</i> | <i>Z. tuberculatus</i> | AF293751 | AF293731 | JQ679110 | EU493820 |
| <i>Scaptomyza</i> | <i>Bunostoma</i> | <i>leonensis</i> | <i>S. palmae</i> | AF293743 | AF293718 | EU493680 | EU493809 |
| <i>Samoia</i> | | <i>modified mouthparts</i> | <i>S. leonensis</i> | AF293748 | AF293725 | EU493683 | EU493812 |
| <i>Idiomya</i> | | <i>picture wing</i> | <i>D. mimica</i> | AF293741 | AF293716 | EU493664 | EU493793 |
| | | | <i>D. grimshawi</i> | XM001992779 | XM001992781 | BK006341 | GU597491 |
| <i>Scaptodrosophila</i> | | <i>rufifrons</i> | <i>S. lebanonensis</i> | AF293739 | AF293714 | EU493686 | EU493815 |
| | | <i>latifasciaeformis</i> | <i>S. latifasciaeformis</i> | EU446102 | EU444596 | EU493684 | EU493813 |

2.2. Manipulação do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando um protocolo baseado em fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989), a partir de um *pool* de dois a 19 espécimes masculinos identificados como coespecíficos e coletados em um mesmo local. Este foi empregado na amplificação de quatro genes, sendo dois mitocondriais (*COI* – *citocromo oxidase c subunidade I* e *COII* – *citocromo oxidase c subunidade II*), indicados para avaliação das relações filogenéticas entre espécies mais próximas; e dois nucleares (*Amd* – *alfa metildopa* e *Ddc* – *dopa descarboxilase*), úteis na reconstrução de relações filogenéticas mais remotas. Os genes foram amplificados com o uso dos *primers* e das condições descritos na Tabela 3, usando 50-100 ng de DNA numa reação de 25 µL, contendo 1 × tampão, 0,25 ou 1µM de cada iniciador (para genes mitocondriais ou nucleares, respectivamente), 0,25 mM de cada dNTP, 1,8 a 2,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase. Todos os amplicons foram específicos.

Tabela 3. *Primers* e condições de PCR utilizados na amplificação dos quatro genes.

| Genes | <i>Primers</i> | Temperatura de Anelamento | Tempo de extensão | Tamanho do amplicon |
|-------------|--|---------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Amd</i> | <i>primer F</i> - Robe et al. (2010) <i>primer R</i> - Tatarenkov et al. (2001) | Touchdown 59°C-54°C | 1 min. e 30seg. | 962 pb |
| <i>Ddc</i> | Tatarenkov et al. (1999) | 54°C | 1min. | 1184 pb |
| <i>COI</i> | Simon et al. (1994) | Touchdown 58°C-55°C | 1 min. e 15 seg. | 917 pb |
| <i>COII</i> | Simon et al. (1994) | Touchdown 57°C-55°C | 50 seg. | 787 pb |

Após a PCR, os produtos foram observados em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium). Os amplicons obtidos foram purificados com solução de acetato de amônio 7,5 M (C₂H₇NO₂) e, então, diretamente sequenciados. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático Perkin-Elmer ABI Prism 377 (MACROGEN, Seul, Coreia do Sul), utilizando os mesmos iniciadores da PCR.

2.3. Análises Filogenéticas

Primeiramente, as sequências contidas nos eletroferogramas tiveram sua identidade confirmada pelo uso do BLASTN (NCBI, 2016). Todos os eletroferogramas obtidos foram inspecionados e montados com o uso do programa Gap 4 do pacote Staden (Staden, 1996). Os alinhamentos foram realizados com o uso do algoritmo ClustalW no programa Mega 6 (Tamura et al., 2013). O Mega 6 também foi utilizado para acessar os parâmetros descritivos das diferentes matrizes, enquanto o programa DAMBE 5 (Xia, 2013) foi empregado na avaliação da saturação dos dados.

As inferências acerca das árvores dos genes foram realizadas individualmente para as diferentes partições, enquanto a árvore das espécies foi acessada por uma abordagem de supermatriz, através dos dados concatenados. Os métodos utilizados para as análises envolveram quatro abordagens principais: Neighbor Joining (NJ), realizado no PAUP 4.0a147 (Swofford, 2002); máxima parcimônia (MP), executado no PAUP 4.0a147; máxima verossimilhança (ML), executada no programa PhyML 3.1 (Guindon & Gascuel, 2003); análise Bayesiana (AB), conduzida no programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Em cada caso, as análises de NJ e ML seguiram o modelo selecionado pelo critério de AIC (Akaike Information Criterion), conforme conduzido no programa ModelTest 3.7 (Posada & Crandall, 1998), com o auxílio do PAUP, enquanto as AB empregaram o modelo selecionado pelo mesmo teste junto ao programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). Na análise de MP, por outro lado, critérios de pesagem homogênea foram empregados, com 1000 réplicas de bootstrap sendo adotadas em uma estratégia de busca heurística, com rearranjos TBR (*Tree Bisection Reconnection*) aplicados a um conjunto de 100 árvores inicialmente construídas por adição randômica de OTUs. Bootstrap também foi empregado para medir o suporte nas análises de NJ e ML. Nas ABs, pelo menos 10.000.000 cadeias MCMC foram empregadas, com amostragem a cada 1000 geração, e descarte das 25% iniciais. Neste caso, o valor da probabilidade posterior (PP) de cada clado foi tomado como estimativa do seu suporte. Nas ABs, adotou-se um particionamento por posição de códon ou por gene e posição de codon nas inferências das árvores dos genes ou das espécies, respectivamente.

O cenário espaço-temporal associado à diversificação das espécies foi avaliado mediante utilização de um procedimento bayesiano que emprega o relógio molecular relaxado com autocorrelação de taxas, conforme implementado no programa MultiDivTime (Thorne et

al., 1998; Thorne and Kishino, 2002), com o uso dos dados concatenados e da árvore das espécies obtida por AB. Neste caso, os programas BaseML do PAML 4.9 (Yang, 1997, 2007) e EstBranches (fornecido junto com o pacote MultiDistribute) foram utilizados na estimativa dos parâmetros do modelo e da matriz de variância/covariância no tamanho dos ramos da árvore. Na calibração do relógio molecular, foram empregadas as seguintes restrições: (1) um tempo mínimo de 23 milhões de anos para a divergência entre *Drosophila* e *Scaptomyza* hawaianos, seguindo Grimaldi (1987), que encontrou fósseis de *Scaptomyza* preservados em âmbar e datados para este período na ilha de Hispaniola; (2) um *prior* de 63 milhões de anos entre a raiz e nós terminais, seguindo Tamura et al. (2004), que forneceu esta estimativa para o tempo de divergência entre *Sophophora* e *Drosophila*.

3. Resultados

Foram analisados um total de 58 espécimes, pertencentes a 36 espécies de Drosophilídeos do grupo genérico *Zygothrica* coletados em diferentes localidades do Brasil: sete espécies de *Hirtodrosophila*, cinco de *Mycodrosophila*, uma de *Paraliodrosophila* e 23 de *Zygothrica* (Tabela 1, Figura 1). Oito destas espécies não foram descritas até o momento, e estas encontram-se representadas ao longo das tabelas e figuras pela expressão “aff” seguida ao nome da espécie morfológicamente relacionada, quando esta foi identificada, ou por “sp.”, quando esta relação com espécies já descritas não foi possível. A quantidade limitada de DNA impossibilitou, em alguns casos, a obtenção de sequências para os quatro marcadores, de forma que dos 58 indivíduos, 50, 48, 45 e 22 foram caracterizados para os genes *COI*, *COII*, *Amd* e *Ddc*, respectivamente. De qualquer forma, o acréscimo das 50 espécies de Drosophilidae e uma de *Culex quinquefasciatus* como outgroup para as quais foi possível ter acesso às sequências dos quatro marcadores (Tabela 2) levou a construção de matrizes com 101, 99, 96 e 73 sequências, respectivamente (Tabela 4).

Como esperado, os dois genes mitocondriais revelaram-se mais enviesados, tanto no que se refere às frequências de bases, quanto a razão entre transições e transversões (Tabela 4). Ainda assim, os testes AIC desenvolvidos tanto no Modeltest 3.7 quanto no MrModelTest 2.3 indicaram a utilização do modelo de substituição GTR+I+G para todas as análises. A grande heterogeneidade nos parâmetros apresentados entre genes (Tabela 4), ou mesmo entre as primeiras, segundas e terceiras posições dos codons de um mesmo gene (dados não mostrados) sugere que estratégias com particionamento, como aquelas empregadas nas ABs

(veja descrição anteriormente), sejam mais adequadas para trabalhar a informação contida nos dados, de forma que estes resultados são enfatizados na descrição a seguir. Como os genes mitocondriais revelaram-se altamente saturados (Tabela 4), os mesmos não apresentaram informação suficiente para resolver a maior parte das relações interespecíficas, de modo as árvores destes genes apresentaram-se predominantemente politômicas (Material suplementar – Figuras S1 e S2).

Tabela 4. Caracterização geral da informação contida nas matrizes utilizadas na construção das árvores dos genes (*Amd*, *Ddc*, *COI* e *COII*) e da árvore das espécies (Fcc).

| | OTU's | Sítios | Sítios variáveis | Sítios | | | | Transições | Transversões | |
|-------------|-------|--------|------------------|--------------------------------|------|------|------|------------|--------------|-----|
| | | | | Parcimoniosamente informativos | A | C | T | | | G |
| Amd | 96 | 867 | 563 | 462 | 21,3 | 24,4 | 23,9 | 30,4 | 653 | 93 |
| Ddc | 73 | 940 | 468 | 400 | 19,9 | 25,9 | 23,6 | 30,7 | 761 | 81 |
| COI | 101 | 629 | 263 | 235 | 28,7 | 16,4 | 38,2 | 16,7 | 505 | 34 |
| COII | 99 | 659 | 322 | 260 | 32,8 | 14,4 | 39,3 | 13,5 | 549 | 40 |
| FCC | 67 | 3095 | 1583 | 1318 | 24,7 | 21,2 | 29,9 | 24,2 | 2490 | 254 |

3.1 Subdivisão de *Drosophila*, monofilia e posicionamento do grupo genérico *Zygothrica*

A Figura 2 mostra a árvore consenso de maioria obtida através de AB para os dados dos quatro genes concatenados em 66 espécies de drosofilídeos, tratada aqui como potencial árvore das espécies. Os valores de suporte obtidos por cada clado na AB, ou por MP, NJ e ML estão indicados na tabela 5. Merece destaque, nesta filogenia, o suporte a subdivisão do gênero *Drosophila* em quatro diferentes linhagens, que apresentam estimativas mais prováveis de divergência entre 42-37 milhões de anos atrás (Ma): (1) o subgênero *Sophophora* (PP 0,96), cuja diversificação data entre 32 e 59 Ma; (2) a linhagem *immigrans-tripunctata* (PP 0,99), que diversificou-se entre 31,2 e 56 Ma; (3) a linhagem composta pelos drosofilídeos hawaianos junto aos membros da radiação *virilis-repleta* (PP 0,99), que divergiram entre 29,5 e 52,2 Ma; (4) a linhagem formada pelo gênero *Zaprionus* junto aos representantes do grupo genérico *Zygothrica* (AB: 0,84; MV - 17), que divergiram entre 29,8 e 53,1 Ma. Embora na maior parte dos casos, as relações entre estes cladogramas não obteve suporte estatístico, a AB foi capaz de recuperar o posicionamento basal de *Sophophora* dentro de Drosophilinae e a parafilia do subgênero *Drosophila* com relação aos scaptomyzoides da linhagem 3 e aos gêneros *Zaprionus*, *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* da linhagem 4 (PP 0,88).

Interessantemente, as linhagens 3 e 4 apareceram agrupadas entre si (PP 0,89), de forma que estes dados fornecem evidências para uma maior proximidade de *Zaprionus* e do grupo genérico *Zygothrica* para com representantes da linhagem *virilis-repleta*, do que para com membros da linhagem *immigrans-tripunctata*. Além disso, dentro da linhagem 4, foi possível recuperar a monofilia do grupo genérico *Zygothrica* (PP 1,00), pelo menos no que diz respeito aos representantes dos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* aqui considerados, cuja divergência mais basal data de aproximadamente 30 Ma.

Os resultados das ABs realizadas individualmente com sequências nucleotídicas dos genes nucleares *Amd* e *Ddc* encontram-se representados pelas Figuras 3 e 4, respectivamente. Os valores de suporte para cada clado referentes às ABs, ou aqueles obtidos por MP, NJ e MV são exibidos no Material Suplementar, nas Tabelas S3 e S4, respectivamente. Neste caso, tanto *Amd* quanto *Ddc* foram capazes de recuperar a monofilia do subgênero *Sophophora* (PP = 0,52 e 0,96, respectivamente), da linhagem dos drosofilídeos hawaianos (PP 1,00 e 1,00, respectivamente) e do gênero *Zaprionus* (PP 0,97 e 1,00, respectivamente). No entanto, apenas *Amd* apresentou suporte às linhagens 2 e 3 acima descritas (PP 0,99 e 0,99, respectivamente) (Figura 3), e apenas *Ddc* recuperou a linhagem 4 (PP 0,59) (Figura 4). Por outro lado, com relação a linhagem 4, embora o agrupamento de *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* tenha sido suportado por ambos os marcadores (PP 0,59 e 1,00, respectivamente), *Amd* apresentou o gênero *Mycodrosophila* como um clado a parte (PP 1,00). Como não foi possível obter sequências de *Ddc* para os representantes deste gênero, o relacionamento entre os três gêneros do grupo genérico *Zygothrica*, e portanto, a monofilia deste ainda permanece em aberto.

Devido ao elevado nível de saturação, *COI* e *COII* não apresentaram níveis suficientes de resolução para a recuperação das relações em qualquer uma das linhagens avaliadas (Material Suplementar – Figuras S1 e S2 e Tabelas S1 e S2).

3.2 Monofilia e relacionamento entre e dentro dos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*

Pelas análises realizadas, o único gênero cuja monofilia foi consistentemente suportada foi *Mycodrosophila*, que embora não tenha sido caracterizado para *Ddc*, e, portanto, não tenha sido incluído na análise concatenada, apresentou suas espécies agrupadas em um

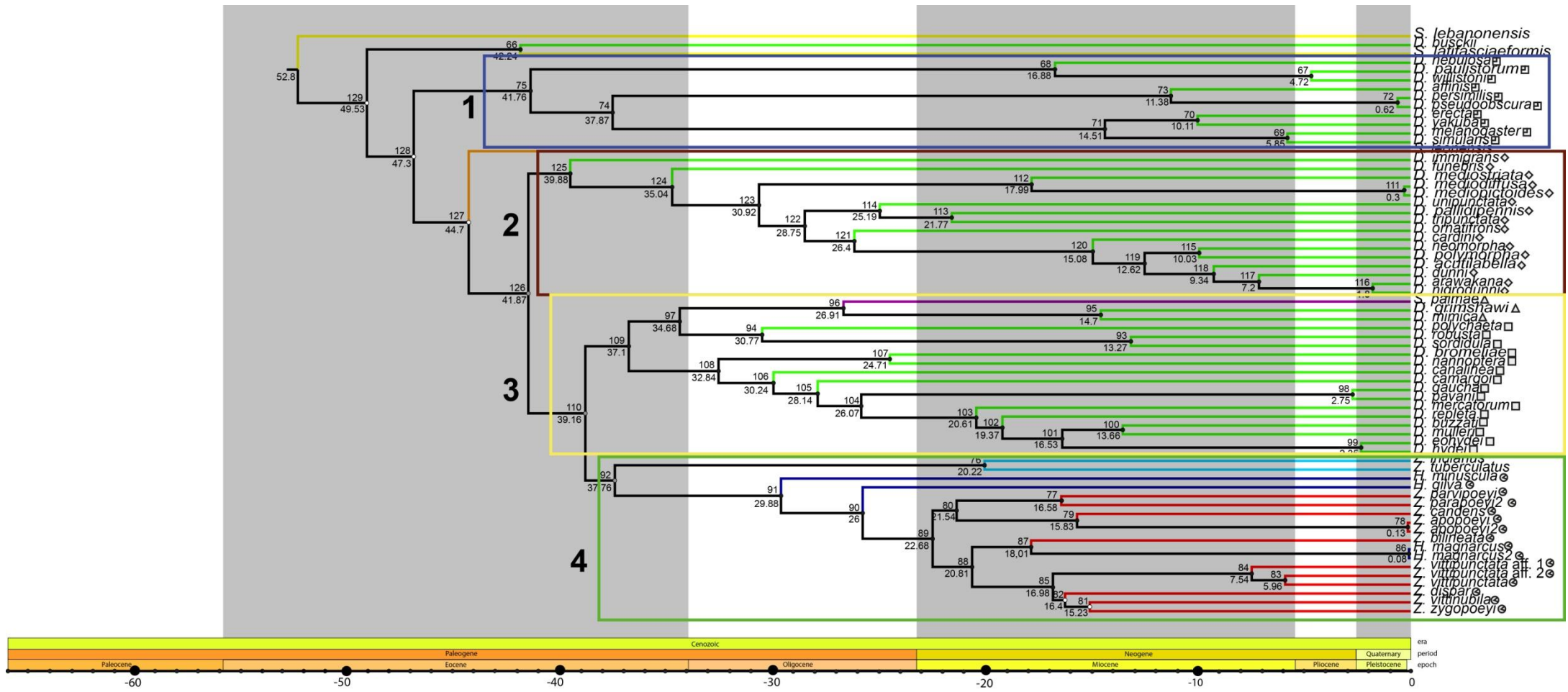
clado tanto para *Amd* (PP 1,00) (Figura 3), quanto para *COII* (PP 1,00) (Figura S2). No entanto, nenhum dos genes apresentou níveis suficientes de resolução para definir o posicionamento deste gênero com relação aos demais componentes do grupo genérico *Zygothrica*. Dentro do gênero *Mycodrosophila*, foi possível recuperar a monofilia do complexo de espécies crípticas a *M. projectans*, tanto com o uso de *COI* (PP 0,71), quanto com *COII* (PP 1,00), embora a ordem de ramificação difira entre os marcadores.

Hirtodrosophila, por outro lado revelou-se parafilético. Na análise concatenada (Figura 2), por exemplo, *H. minuscula* apresenta um posicionamento basal dentro do grupo genérico *Zygothrica* (PP 1,00), ao que se segue a ramificação de *H. gilva* (PP 1,00), que constitui a espécie-irmã de um clado majoritariamente constituído por representantes do gênero *Zygothrica*. Por outro lado, *H. magnarcus* revelou-se proximalmente aparentada de *Z. bilineata*, tanto na análise concatenada (PP 1,00) (Figura 2), quanto para *Amd* (PP 0,72) (Figura 3) e *Ddc* (PP 0,99) (Figura 4). Para *COI*, *H. magnarcus* revelou-se espécie-irmã de *H. levigata* (PP 1,00) (Figura S1), relação também suportada por *Amd* (PP 1,00), que agrupou ambas espécies junto de *Z. bilineata* (Figura 3).

Dada o agrupamento de *H. magnarcus* (e *H. levigata*) com *Z. bilineata*, o gênero *Zygothrica* também foi parafileticamente constituído tanto na análise concatenada (PP 1,00) (Figura 2), quanto nas análises com os genes *Amd* (PP 0,59) (Figura 3) e *Ddc* (PP 1,00) (Figura 4). Pelos resultados apresentados pela análise dos dados concatenados, é possível propor aqui a subdivisão de *Zygothrica* em quatro clados, cujas divergências datam de aproximadamente 18-16 milhões de anos atrás (Figura 2): (1) o primeiro constituído pelo agrupamento de *Z. parapoeyi* e *Z. parvipoeyi* (PP 1,00); (2) o segundo formado por *Z. candens* e *Z. apopoeyi* (PP 1,00); (3) o terceiro agrupando *Z. bilineata* com *H. magnarcus* (PP 1,00); (4) o quarto formado por *Z. vittipunctata*, *Z. dispar*, *Z. vittinubila* e *Z. zygopoeyi*, acrescidas a duas espécies potencialmente novas proximalmente aparentadas a *Z. vittipunctata* (PP 1,00).

Os resultados de *Amd* (Figura 3) permitem sugerir o acréscimo de *Z. festiva*, *Z. ptialialis* (irmã de *Z. candens* – PP 0,91) e *Z. hypandriata* (irmã de *Z. apopoeyi* – PP 0,96) ao clado 2 (PP 0,79); de *H. levigata* (irmã de *H. magnarcus* – PP 1,00) ao clado 3 (PP 0,72); e de *Z. vittimaculosa* e *Z. vittimaculosa* aff. 1 (irmãs de *Z. vittinubila* – PP 1,00), *Z. mesopoeyi* (irmã de *Z. vittipunctata*, *Z. vittipunctata* aff. 1 e *Z. vittipunctata* aff. 2 – PP 0,98) e *Z.*

orbitalis ao clado 4 (PP 1,00). *Ddc* (Figura 4) corrobora a inclusão de *Z. hypandriata* (irmã de *Z. apopoeyi* – PP 1,00) no clado 2; e de *Z. orbitalis* e *Z. mesopoeyi* no clado 4 (PP 1,00). *COI* e *COII* permitem sugerir a inclusão de *Z. prodispar* (irmã de *Z. dispar* – PP 0,98 e 0,99, respectivamente) ao clado 4, ao qual suportam ainda a inclusão de *Z. vittimaculosa* e *Z. vittimaculosa* aff. 1 (irmãs de *Z. vittinubila* – PP 0,99 e 0,75, respectivamente). Os posicionamentos de *Z. atriangula*, *Z. pleurostrigata* e *Z. laevifrons* não puderam ser determinados com confiança por nenhum dos marcadores empregados.



Legend:

Scale

- △ Hawaiian Drosophilidae radiation
- *virilis-repleta* radiation
- ◇ *immigrans-tripunctata* radiation
- ⊙ *Zygothrica* group
- ▣ Subgenus *Sophophora*

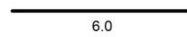


Figura 2. Árvore consenso de maioria inferida através de Análise Bayesiana a partir da supermatriz dos dados concatenados para 69 espécies de Drosophilinae, cujos eventos de divergência foram datados com o uso de um relógio molecular relaxado com o uso do pacote MultiDivTime. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, e os valores abaixo dos ramos referem-se a idade dos nós, em milhões de anos. Os quatro clados recuperados na análise bayesiana estão indicados nos retângulos. Informações adicionais sobre o suporte aos clados podem ser buscadas na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de suporte referentes aos cladogramas apresentados na Figura 2, conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV).

| Clado | AB | MP | NJ | MV |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 66 | 1,00 | 99 | 90 | 73 |
| 67 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 68 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 69 | 1,00 | 100 | 97 | 100 |
| 70 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |
| 71 | 1,00 | 100 | 95 | 100 |
| 72 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 73 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |
| 74 | 0,96 | 69 | * | * |
| 75 | 0,96 | 52 | * | * |
| 76 | 1,00 | 100 | 83 | 100 |
| 77 | 1,00 | 99 | 76 | 98 |
| 78 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 79 | 1,00 | 96 | 93 | 98 |
| 80 | 0,94 | * | * | 51 |
| 81 | 0,69 | * | 78 | 40 |
| 82 | 0,59 | * | * | 33 |
| 83 | 1,00 | 83 | 89 | 72 |
| 84 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 85 | 1,00 | * | * | 100 |
| 86 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 87 | 1,00 | 78 | 59 | 79 |
| 88 | 0,97 | * | * | 51 |
| 89 | 1,00 | 95 | * | 98 |
| 90 | 1,00 | 67 | 94 | 90 |
| 91 | 1,00 | 99 | 99 | 100 |
| 92 | 0,84 | * | * | 17 |
| 93 | 1,00 | 100 | 76 | 100 |
| 94 | 0,98 | * | * | 52 |
| 95 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 96 | 1,00 | 81 | 71 | 97 |
| 97 | 0,92 | * | * | 27 |
| 98 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 99 | 1,00 | 100 | 100 | 100 |
| 100 | 1,00 | 99 | 77 | 99 |
| 101 | 1,00 | 95 | 100 | 99 |
| 102 | 0,91 | 59 | 86 | 64 |
| 103 | 1,00 | 100 | 96 | 100 |

| | | | | |
|------------|------|-----|----|-----|
| 104 | 0,98 | * | * | 79 |
| 105 | 1,00 | * | * | 95 |
| 106 | 1,00 | 91 | 95 | 92 |
| 107 | 1,00 | 100 | 88 | 100 |
| 108 | 1,00 | 96 | 66 | 100 |
| 109 | 0,99 | * | * | 28 |
| 110 | 0,89 | * | * | 15 |
| 111 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 112 | 1,00 | 95 | 99 | 100 |
| 113 | 0,98 | 67 | 60 | 64 |
| 114 | 1,00 | * | * | 83 |
| 115 | 1,00 | 88 | * | 92 |
| 116 | 1,00 | 100 | 84 | 100 |
| 117 | 1,00 | 95 | * | 98 |
| 118 | 1,00 | 82 | * | 76 |
| 119 | 1,00 | 93 | * | 73 |
| 120 | 1,00 | 100 | * | 100 |
| 121 | 1,00 | * | * | 90 |
| 122 | 1,00 | * | * | 41 |
| 123 | 1,00 | * | 92 | 65 |
| 124 | 1,00 | * | 51 | 98 |
| 125 | 0,99 | * | * | 59 |
| 126 | 0,88 | * | * | 12 |
| 127 | 0,55 | * | * | 22 |
| 128 | 0,53 | * | * | 26 |
| 129 | 0,56 | * | * | * |

Obs.: * representam politomias.



Legend:

- △ Hawaiian Drosophilidae radiation
- *virilis-repleta* radiation
- ◇ *immigrans-tripunctata* radiation
- ⊙ *Zygothrica* group
- ⊞ Subgenus *Sophophora*

Scale:

0.2

Figura 3. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *Amd* para 96 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela S3.

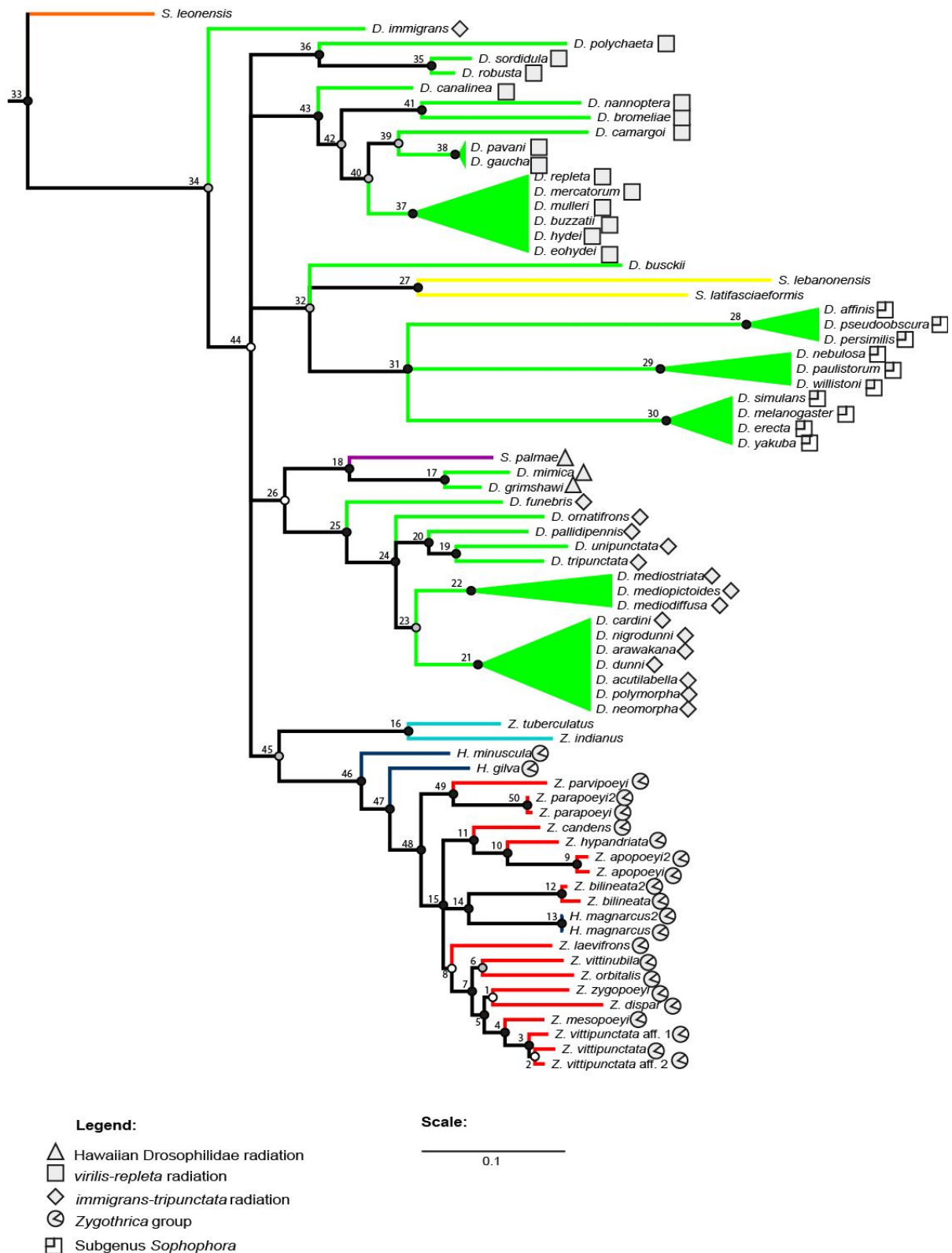


Figura 4. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *Ddc* para 73 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela S4.

4. Discussão

4.1. O grupo genérico *Zygothrica* e a problemática da nomenclatura de *Drosophila*

Apesar do gênero *Drosophila* compreender um dos sistemas modelo melhor estudados na biologia moderna, pouco é sabido acerca das relações filogenéticas, da ecologia e da história evolutiva da maior parte de suas espécies (O'Grady & Markov, 2009). Ainda assim, a maior parte das hipóteses filogenéticas geradas para este gênero suporta seu status parafilético e sua subdivisão em pelo menos três linhagens independentes (van der Linde et al., 2010; Remsen & O'Grady, 2002; Robe et al., 2010a; Tatarenkov et al., 2001). Neste trabalho, além das linhagens compostas pelo subgênero *Sophophora*, pela radiação *immigrans-tripunctata* e pelo agrupamentos das radiações *virilis-repleta* e drosofilídeos hawaianos, recuperamos uma quarta linhagem para *Drosophila*: aquela formada pelo gênero *Zaprionus* junto a um conjunto de espécies micófagas pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*, que segundo Grimaldi (1990) compõem o grupo genérico *Zygothrica*.

Interessantemente, a linhagem contendo o grupo genérico *Zygothrica* agrupou-se, neste trabalho, ao clado composto pelos drosofilídeos hawaianos junto a radiação *virilis-repleta*. Este arranjo difere dos posicionamentos prévios apresentados para o grupo genérico *Zygothrica*, que tem sido apresentado como um clado irmão ao subgênero *Drosophila* (DaLage et al., 2007; Yassin, 2013) ou a linhagem *immigrans-tripunctata* (van der Linde et al., 2010). Os constituintes Neotropicais do grupo genérico *Zygothrica*, conforme definido por Grimaldi (1990) apresentam, aqui, um caráter monofilético, pelo menos no que diz respeito aos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*. Este resultado contrasta com a constante polifilia indicada para componentes não-Neotropicais deste grupo genérico (DaLage et al., 2007; van der Linde et al., 2010; Yassin, 2013) e deve ser futuramente revisado pelo acréscimo de representantes dos demais gêneros incluídos no grupo. Este é o caso, por exemplo, dos gêneros *Mycodrosophila* e *Paraliodrosophila*, que embora tenham sido incluídos em parte de nossas análises, não foram posicionados dentro da nossa “árvore dos genes” em vista da ausência de sequências para um ou mais dos marcadores empregados. Porém estudos anteriores têm representado *Mycodrosophila* como grupo irmão de *Hirtodrosophila* (Remsen & O'Grady, 2002; DaLage et al., 2007; Van der linde et al., 2010; Katoh et al., 2010).

O caráter inédito de alguns de nossos achados, somado às inconsistências e incongruências de outros de nossos resultados vem no sentido de corroborar o caráter prematuro, já amplamente discutido (ver O'Grady, 2010), da proposta apresentada por van der Linde et al. (2007) à Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica. Nesta proposta, van der Linde et al. (2007) propõem a alteração da espécie tipo do gênero *Drosophila* tipo para *D. melanogaster*, a fim de evitar a mudança do nome de *Drosophila melanogaster*, uma das espécies mais estudadas na biologia moderna, para *Sophophora melanogaster* e todos os problemas provocados pela mudança de nomenclatura. De fato, muitos drosofilistas se manifestaram contrários a esta alteração, uma vez que a mesma proporcionaria uma grande instabilidade taxonômica, impactando a nomenclatura de diversos outros grupos dentro da família, os quais não possuem, muitas vezes, suas relações filogenéticas bem estabelecidas (Gaimari, 2008; O'Grady et al., 2008a; Yassin, 2008). Afinal, conforme enfatizado na decisão da Comissão, se a mudança ocorresse, seria necessário definir um novo tipo para uma ou mais linhagens de *Drosophila*, porém faltam apoio filogenético, revisões taxonômicas, sinapomorfias morfológicas, ou todos os três em muitos gêneros supostos em *Drosophila*, o que criaria problemas adicionais que talvez Van der Linde et al. (2007) não haviam considerado.

Embora os estudos de van der Linde et al. (2010) e de Yassin (2013) tenham proporcionado bases sólidas para sanar muitas destas deficiências, é necessário enfatizar que faltam, ainda, estudos que visem posicionar espécies pouco conhecidas de drosofilídeos dentro da filogenia da família. Conforme revelado por nossos achados, estes estudos são, pois, fundamentais para a compreensão do real alcance que as diferentes possibilidades de mudança taxonômica de *Drosophila* terão nos diferentes grupos de espécies de Drosophilidae. A crescente parafilia de *Drosophila* com relação a outros gêneros da família, conforme aqui revelado, sugere que o cenário mais plausível dentro da prática sistemática moderna seria, provavelmente, a subdivisão deste em diferentes gêneros, ainda que com a mudança na designação da espécie tipo.

4.2. *Relações filogenéticas dentro do grupo genérico Zygothrica*

Com relação a monofilia dos gêneros constituintes do grupo genérico *Zygothrica*, nossos achados sugerem que *Zygothrica* e *Hirtodrosophila* são gêneros parafiléticos, embora, em princípio, *Mycodrosophila* reflita um agrupamento monofilético. De fato, nossa árvore das

espécies apresenta alguns representantes do gênero *Hirtodrosophila* como ramificações basais dentro do grupo genérico *Zygothrica*, enquanto *H. magnarcus* (e possivelmente *H. levigata*) mostrou-se proximamente relacionada com *Z. bilineata*. Embora a merofilia do gênero *Hirtodrosophila* seja constantemente recuperada (DaLage et al., 2007; Russo et al., 2013; van der Linde et al., 2010; Yassin, 2013). De fato, Grimaldi (1987) enfatiza a presença de uma série de sinapomorfias que apoiam a monofilia de *Zygothrica*.

Segundo nossos resultados, os representantes Neotropicais do gênero *Zygothrica* podem ser divididas em pelo menos quatro clados ou grupos: (1) o primeiro constituído por *Z. parapoeyi* e *Z. parvipoeyi*; (2) o segundo formado por *Z. candens*, *Z. ptilialis*, *Z. festiva*, *Z. hypandriata* e *Z. apopoeyi*; (3) o terceiro agrupando *Z. bilineata*, *H. magnarcus* e *H. levigata*; (4) o quarto formado por *Z. vittipunctata*, *Z. mesopoeyi*, *Z. dispar*, *Z. prodispar*, *Z. vittinubila*, *Z. vittimaculosa*, *Z. zygoeoyi* e *Z. orbitalis*, acrescidas a três espécies potencialmente novas, duas proximamente aparentadas a *Z. vittipunctata* e uma a *Z. vittimaculosa*. Além disso, os posicionamentos de *Z. atriangula*, *Z. pleurostrigata* e *Z. laevifrons* permaneceram ambíguos nas diferentes reconstruções. Antes de nosso trabalho, as relações internas de *Zygothrica* foram estudadas com mais detalhe apenas por Grimaldi (1987), que realizou a análise de 98 características morfológicas e comportamentais em 106 representantes do gênero, dos quais 11 sobrepõem ao nosso estudo. Embora parte da estrutura de relações apresentadas por este autor difira do presente estudo, muitos resultados concordantes podem ser destacados.

Por exemplo, no estudo de Grimaldi (1987), *Z. bilineata* aparece no clado 2.1 inclusa no grupo de espécies “*bilineata*”, distante do restante das espécies investigadas de *Zygothrica*. Semelhantemente, em nosso trabalho, *Z. bilineata* também mostrou-se distante do restante das espécies, associando-se mais proximamente com *H. magnarcus* e *H. levigata*, e assim tornando o grupo genérico *Zygothrica* parafilético. Além disso, *Z. bilineata* e *H. levigata* se mostraram, previamente, espécies ecologicamente similares, apresentando associação a uma ampla variedade de espécies de fungos (Valer et al., 2016). Da mesma forma, o agrupamento sugerido por Grimaldi (1987) de *Z. vittimaculosa*, *Z. vittipunctata*, *Z. vittinubila*, *Z. zygoeoyi*, *Z. dispar* e *Z. prodispar*, no clado 1.2 é recuperado aqui dentro do quarto agrupamento. No entanto, Grimaldi (1987) agrupa as quatro primeiras espécies dentro do clado 1.2.2.2, no grupo de espécies “*vittimaculosa*”, dentro do complexo *vittatifrons*, enquanto *Z. dispar* e *Z. prodispar* foram associadas ao complexo *dispar*, no clado 1.2.1.2. Segundo nossos resultados,

em especial aqueles fornecidos por *Amd*, é possível que esta distinção entre os dois complexos não seja tão clara assim.

Embora as associações específicas apresentadas nos nossos clados 1 e 2 difiram daquelas suportadas por Grimaldi (1987), a maior parte dos agrupamentos é compatível, uma vez que a proximidade evolutiva destes dois clados é considerada. De fato, grande parte das espécies incluídas aqui nestes dois grupos aparece ou no clado 4 de Grimaldi (1987) ou foi apresentada como *incertae sedis* pelo autor. Por fim, embora Grimaldi (1987) tenha considerado *Z. orbitalis* como uma espécie a parte das demais, a semelhança de seus padrões de comportamento para com membros do clado 1.2 foi discutida pelo autor, de forma que é provável que sua distinção morfológica seja resultado de um acúmulo de autapomorfias. Além disso, as preferências de *Z. orbitalis* em relação aos fungos hospedeiros para oviposição também diferem do restante das espécies de *Zygothrica*. Esta espécie vem sendo encontrada utilizando frutos de *Psychotria* como sítio de oviposição, o qual pode vir a ser seu sítio preferencial para oviposição (Gottschalk, comunicação pessoal).

4.3. Cenário espaço-temporal

Segundo nossos resultados, as quatro principais linhagens de *Drosophila* diversificaram-se no Eoceno, entre 42-37 milhões de anos atrás (Ma). Estas datações sobrepõem-se aos intervalos apresentados por Robe et al. (2010b) e Russo et al. (2013). Em ambos estudos, sugere-se a ocorrência de eventos de vicariância associados a transições entre o Velho Mundo → a região Holártica → e o Novo Mundo nas divergências basais das diferentes linhagens. Para a linhagem que contém as espécies foco do presente estudo, em especial, a divergência entre *Zaprionus* e o grupo genérico *Zygothrica* foi datada aqui para cerca de 38 milhões de anos. Neste caso, mais uma vez, o ancestral comum mais recente do grupo encontrava-se, possivelmente, junto aos trópicos do Velho Mundo, já que o gênero *Zaprionus* é essencialmente africano e o grupo genérico *Zygothrica* também apresenta representantes na região, sendo estes potencialmente basais em relação aos demais.

Os componentes Neotropicais do grupo genérico *Zygothrica*, por outro lado, parecem ter diversificado a partir do Oligoceno Médio, há cerca de 30 milhões de anos atrás. Mais uma vez, os tempos de divergência basais se aproximam àqueles apresentados para os componentes Neotropicais das radiações *immigrans-tripunctata* e *virilis-repleta* por Robe et

al. (2010b). Hipotetiza-se, pois, que os ancestrais comuns das diferentes linhagens tenham atingido a região Neotropical num mesmo período, a partir de rotas potencialmente comuns, passando através da Beríngia e da região Neoártica, onde também parecem ter deixado muitos descendentes.

Após a chegada nos Neotrópicos, a maioria das especiações dentro do grupo genérico *Zygothrica* parece ter ocorrido durante o Mioceno, que pode ser considerada, pelo menos em sua primeira metade, uma época climática estável (Zachos et al., 2001). Uma explicação para as especiações ocorridas neste período talvez seja a expansão das espécies para exploração de diferentes habitats, levando a rápida especiação (Throckmorton, 1962), o que estaria relacionado a ocorrência de radiações adaptativas (Throckmorton, 1975). Além disso, o Mioceno e o Plioceno estão associados a períodos de grande diversificação de plantas na região Neotropical (Hooghiemstra & van der Hammen, 1998), o que também pode ter contribuído para a especiação das espécies pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica*.

5. Conclusão

Conforme inicialmente sugerido por Robe et al. (2010b), este estudo corrobora a presença de uma quarta linhagem dentro do gênero *Drosophila*, sendo esta composta pelo gênero *Zaprionus* junto aos representantes do grupo genérico *Zygothrica*. Assim, este estudo apresenta indícios adicionais de parafilia para *Drosophila*, que parece abranger, ainda, diversos representantes Neotropicais dos gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*. Embora até o momento nenhum destes dois gêneros tenha sido recuperado como monofilético, apenas a inclusão de outras espécies pertencentes a estes e outros gêneros do grupo pode permitir a avaliação de padrões relacionados a monofilia e ao cenário espaço-temporal associado a diversificação do grupo genérico *Zygothrica*. A inclusão e avaliação evolutiva destas espécies e, sem dúvida, um desafio, dadas as dimensões do grupo genérico, o seu alto nível de diversidade críptica (Machado, 2015) e todas as dificuldades inerentes a sua coleta e a sua determinação.

Referências

- Bächli, G., 2014. Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. <http://www.taxodros.uzh.ch/>. Acesso em: 04/07/2016.
- Burla, H., 1956. Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur *Drosophila*-untergattung *Hirtodrosophila*. Mitt. Zool. Mus. Berlin. 2, 189-321.
- Carson, H.L., 1971. The ecology of *Drosophila* breeding sites. Harold L. Lyon Arboretum Lecture Number Two. The University of Hawaii, Honolulu; p. 1–27.
- Courtney, S. P., Kibota, T. T., Singleton, T. A., 1990. Ecology of mushroom feeding Drosophilidae. Adv. Ecol. Res. 20, 225-274.
- DaLage, J.L., Dergoat, G.J., Maczkowiak, F., Silvain, J.F., Cariou, M.L., Lachaise, D., 2007. A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophilamelanogaster* species group boundaries. J. Zoolog. Syst. Evol. Res. 45, 47-63.
- Frota-Pessoa, O., 1945. Sobre o subgênero *Hirtodrosophila*, com descrição de uma nova espécie (Diptera, Drosophilidae, *Drosophila*). Rev. Bras. Entomol. 5, 469-483.
- Gaimari, S. D., 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* Fallén, 1823 (Insecta, Diptera) 5 (Case 3407). Bull. zool. nomencl. 65, 146-147.
- Grimaldi, D. A. 1990b. Revision of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae), Part II. The first African species, two New Indo-Pacific groups, and the *bilineata* and *samoensis* species groups. Am. Mus. Novit. 2964, 1–31.
- Grimaldi, D.A., 1987. Amber fossil Drosophilidae (Diptera), with particular reference to the Hispaniolan taxa. Am. Mus. Novitates. 2880, 1-23.
- Grimaldi, D.A., 1990a. A phylogenetic, revised classification of the genera in the Drosophilidae (Diptera). Bull. Am. Mus. Natl. Hist. 197, 1-139.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696-704.

Hooghiemstra, H., van der Hammen, T., 1998. Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Earth-Sci. Rev.* 44, 147-183.

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

Kaneshiro K., 1969. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on the external male genitalia. The University of Texas Publication. 6918, 55-69.

Katoh, T., Tamura, K., Aotsuka, T., 2000. Phylogenetic position of the subgenus *Lordiphosa* of the genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) inferred from AlcoholDehydrogenase (*Adh*) gene sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 51, 122-130.

Machado, S., 2015. Aspectos taxonômicos, ecológicos e evolutivos em drosofilídeos neotropicais. Santa Maria, RS. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 204p.

Machado S., dos Santos, J.P.J., Robe, L.J., Loreto, E.L.S., 2014. An efficient and cheap entomological aspirator to collect mycophylic and anthophilic adult Drosophilidae flies. *Drosoph. Inf. Serv.* 97, 169- 171.

Markow, T.A., O'Grady, P., 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Funct. Ecol.* 22, 747-759.

Markow, T.A., O'Grady, P.M., 2006. Phylogenetic relationships of Drosophilidae. In: Markow, T.A., O'Grady, P.M. *Drosophila: A guide to species identification and use.* Academic Press, London, pp. 3-64.

National Center for Biotechnology Information. 2014. The National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 23/05/2016.

Nylander, J.A., 2004. MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Center, Uppsala University.

O'Grady, P. M., Markow, T.A., 2009. Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. *Fly.* 3, 1-5.

O'Grady, P.M., 2010. Whither *Drosophila*? *Genetics.* 185, 703-705.

- O'Grady, P.M., Ashburner, M., Castrezana, S., 2008. Comment. Bull. Zool. Nomencl. 65, 141–144
- Posada, C., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics. 14, 817–818.
- Remsen, J., Desalle, R., 1998. Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. Mol. Phylogenet. Evol. 9, 225 – 235.
- Remsen, J., O'Grady, P. O., 2002. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae) with comments on combined analysis and character support. Mol. Phylogenet. Evol. 24, 249–264.
- Robe, L. J., Loreto, E. L. S., Valente, V. L. S., 2010b. Radiation of the “Drosophila” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. J. Zoolog. Syst. Evol. Res. 48, 310-321.
- Robe, L. J., Valente, V. L. S., Budnik, M., Loreto, E. L. S., 2005. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. Mol. Phylogenet. Evol. 36, 623 – 640.
- Robe, L. J., Valente, V. L. S., Loreto, E. L. S., 2010a. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* "radiation" (Diptera: Drosophilidae). Genetica. 138, 725–35.
- Russo, C. A. M., Mello, B., Frazão, A., Voloch, C. M., 2013. Phylogenetic analysis and a time tree for a large drosophilid data set (Diptera: Drosophilidae). Zool. J. Linn. Soc. 169, 765 – 775.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H.; Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87, 651-701.
- Staden, R., 1996. The Staden sequence analysis package. Mol. Biotechnol. 5, 233–241.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Tamura, K., Subramanian, S., Kumar, S., 2004. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. *Mol. Biol. Evol.* 21, 36-44.
- Tatarenkov, A., Kwiatowski, J., Sharecky, D., Barrío, E., Ayala, F. J., 1999. On the evolution of Dopa decarboxylase (Ddc) and *Drosophila* systematics. *J. Mol. Evol.* 48, 445–462.
- Tatarenkov, A., Zurovcova, M., Ayala, F. J., 2001. Ddc and Amd sequences resolve phylogenetic relationships of *Drosophila*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 321–325.
- Thorne, J.L., Kishino, H., 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Syst. Biol.* 51, 689–702.
- Thorne, J.L., Kishino, H., Painter, I.S. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1647–1657.
- Throckmorton, L.H., 1962. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. University of Texas Publications, 6205: 207-343.
- Throckmorton, L.H., 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King RC (ed) Handbook of genetics. Plenum, New York, 421–469.
- Valer, F. B., Bernardi, E., Mendes, M. F., Blauth, M. L., Gottschalk, M. S., 2016. Diversity and associations between *Drosophilidae* (Diptera) species and Basidiomycetes in a Neotropical forest. *An. Acad. Bras. Cienc.* 88, 705-718.
- Van der Linde, K., Bächli, G., Toda, M. J., Zhang, W. -X., Katoh, T., Hu, Y., Spicer, G. S., 2007. *Drosophila* Fallen, 1823 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage. *Bull. Zool. Nomencl.* 64, 238-342.
- Van der Linde, K., Houle, D., Spicer, G. S., Stepan, S. J., 2010. A supermatrix-based molecular phylogeny of the family *Drosophilidae*. *Genet. Res., Camb.* 92, 25-38.
- Vilela, C.R., Bachli, G., 2004. On the identities of nine Neotropical species of *Hirtodrosophila* (Diptera, *Drosophilidae*). *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.* 77, 161-195.

- Vilela, C.R., Bachli, G., 2007. Revision of the Neotropical genus *Paraliodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 80, 291-317.
- Wheeler, M.R., Kambysellis, M.P., 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. The University of Texas Publications. 6615, 533-565.
- Wheeler, M.R., Takada, H., 1971. Male genitalia of some representative genera of American Drosophilidae. University of Texas Publications. 7103, 225-240.
- Xia, X., 2013. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. Mol. Biol. Evol. 30, 1720-1728.
- Yang, Z., 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. Mol. Biol. Evol. 24, 1586–1591.
- Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Bacos, 13, 555-556.
- Yassin, A., 2013. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. Syst. Entomol. 38, 349–364.
- Yassin, A., 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* (Insecta, Diptera). Bull. Zool. Nomencl. 65, 96.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. Science. 292, 686–693.

Material Suplementar

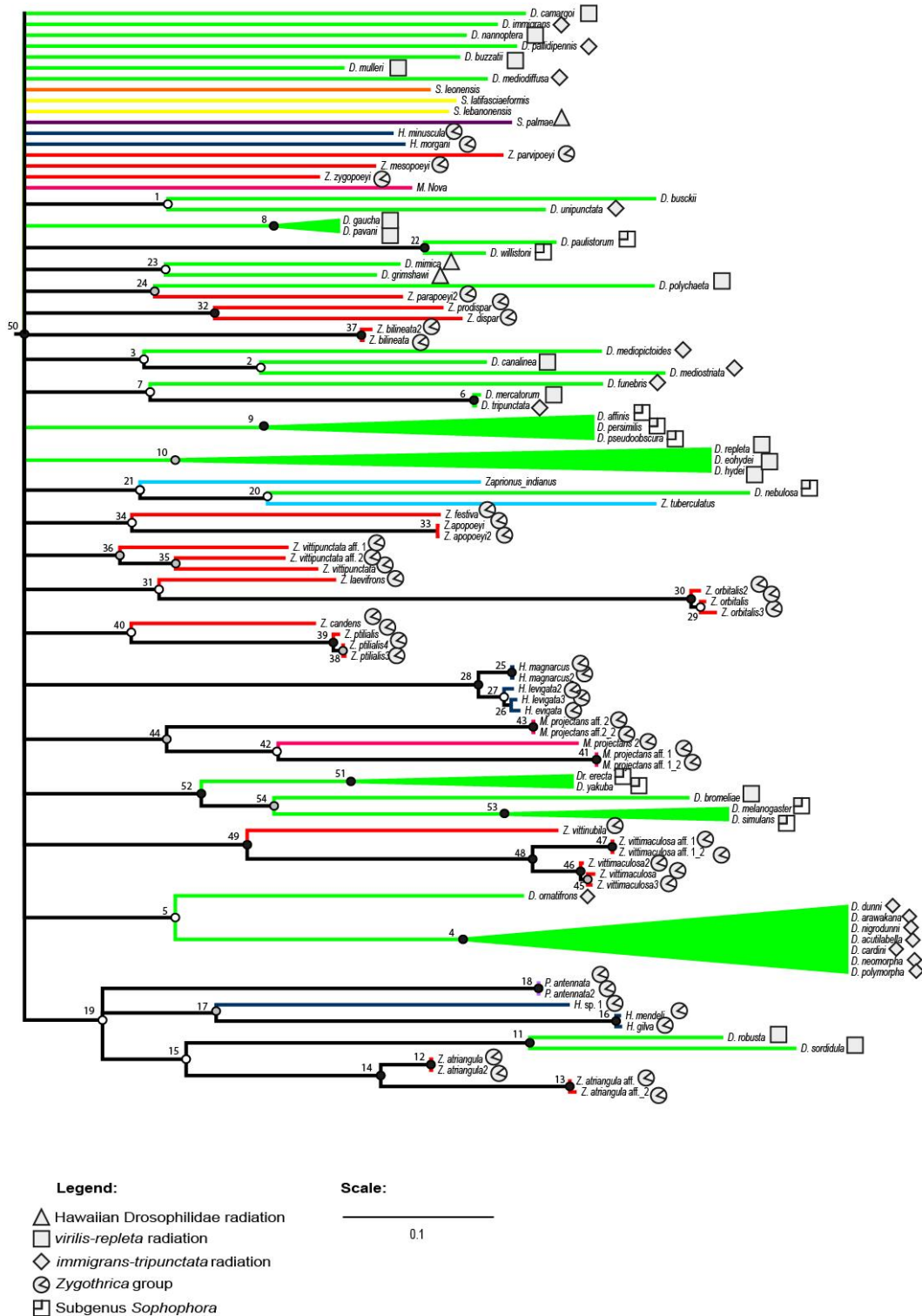


Figura S1. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de sequências nucleotídicas do gene *COI* para 100 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela S1.

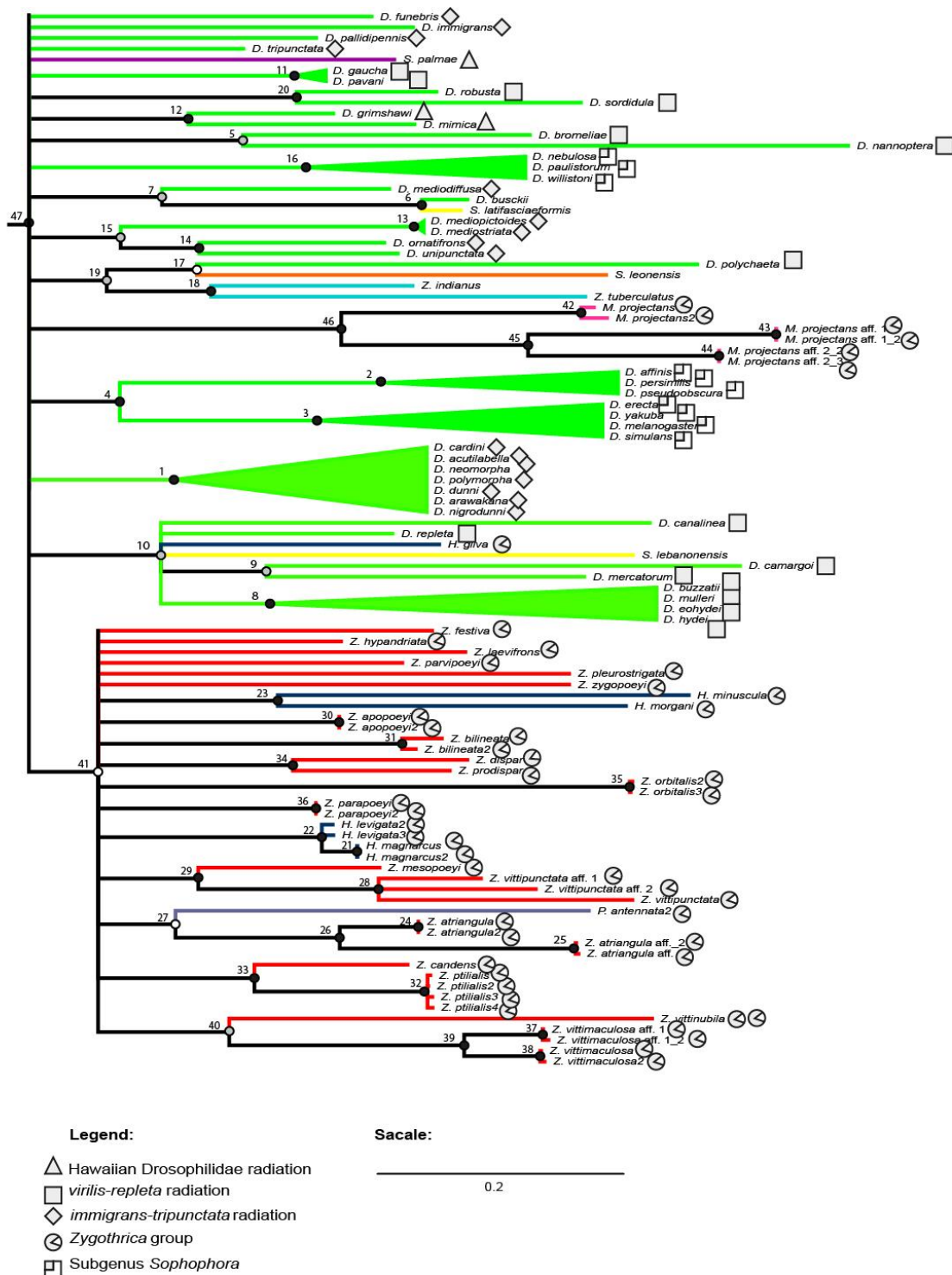


Figura S2. Árvore consenso de maioria inferida por Análise Bayesiana a partir de seqüências nucleotídicas do gene *COII* para 98 espécies de Drosophilinae. Os números acima dos ramos referem-se ao número de cada clado, cujas informações adicionais podem ser buscadas na Tabela S2.

Tabela S1. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura S1 (árvore de *COI*), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV).

| Clado | AB | MP | NJ | MV |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 0,58 | * | * | 99 |
| 2 | 0,67 | * | * | 46 |
| 3 | 0,69 | * | * | 23 |
| 4 | 1,00 | 71 | * | 73 |
| 5 | 0,54 | 51 | * | 41 |
| 6 | 1,00 | 100 | * | 100 |
| 7 | 0,69 | * | * | 16 |
| 8 | 1,00 | 100 | 80 | 98 |
| 9 | 0,99 | 56 | * | 53 |
| 10 | 0,87 | * | * | * |
| 11 | 1,00 | 81 | 51 | 92 |
| 12 | 1,00 | 100 | * | 99 |
| 13 | 1,00 | 100 | 72 | 100 |
| 14 | 1,00 | 99 | * | 93 |
| 15 | 0,60 | * | * | 12 |
| 16 | 1,00 | 100 | 90 | 100 |
| 17 | 0,79 | * | * | 18 |
| 18 | 1,00 | 100 | 96 | 100 |
| 19 | 0,52 | * | * | * |
| 20 | 0,58 | * | * | 22 |
| 21 | 0,51 | * | * | 12 |
| 22 | 1,00 | 99 | 61 | 99 |
| 23 | 0,67 | * | * | 40 |
| 24 | 0,72 | * | * | * |
| 25 | 0,95 | 97 | * | 86 |
| 26 | 0,73 | 57 | * | 70 |
| 27 | 0,69 | 89 | * | 77 |
| 28 | 1,00 | 100 | * | 100 |
| 29 | 0,59 | 71 | * | 87 |
| 30 | 1,00 | 100 | * | 100 |
| 31 | 0,54 | * | * | 12 |
| 32 | 0,98 | 74 | * | 56 |
| 33 | 1,00 | 100 | 87 | 100 |
| 34 | 0,62 | * | * | 28 |
| 35 | 0,72 | * | * | 44 |
| 36 | 0,73 | * | * | 67 |
| 37 | 1,00 | 100 | 83 | 100 |
| 38 | 0,74 | 87 | 76 | 66 |

| | | | | |
|-----------|------|-----|----|-----|
| 39 | 1,00 | 100 | 83 | 100 |
| 40 | 0,69 | 71 | * | 63 |
| 41 | 1,00 | 100 | 96 | 100 |
| 42 | 0,62 | 57 | * | 64 |
| 43 | 1,00 | 100 | 93 | 100 |
| 44 | 0,71 | * | * | 44 |
| 45 | 0,80 | * | * | * |
| 46 | 0,94 | * | * | * |
| 47 | 1,00 | 100 | 82 | 100 |
| 48 | 1,00 | 100 | * | * |
| 49 | 0,99 | 73 | * | * |
| 50 | 1,00 | * | * | * |
| 51 | 0,98 | 80 | * | 76 |
| 52 | 0,94 | * | * | * |
| 53 | 1,00 | 93 | * | 94 |
| 54 | 0,74 | * | * | * |

Obs.: * representam politomias.

Tabela S2. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura S2 (árvore de *COII*), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV).

| Clado | MB | MP | NJ | MV |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 0,93 | 51 | * | 54 |
| 2 | 1,00 | 92 | 60 | 95 |
| 3 | 1,00 | 92 | * | 91 |
| 4 | 0,97 | * | * | 24 |
| 5 | 0,77 | * | * | 37 |
| 6 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 7 | 0,70 | 76 | 60 | 47 |
| 8 | 0,96 | * | * | 34 |
| 9 | 0,71 | * | * | * |
| 10 | 0,70 | * | * | * |
| 11 | 1,00 | 100 | 96 | 99 |
| 12 | 1,00 | 89 | 76 | 75 |
| 13 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |
| 14 | 0,89 | 51 | 53 | 49 |
| 15 | 0,89 | * | * | * |
| 16 | 1,00 | 95 | 60 | 96 |
| 17 | 0,64 | * | * | 19 |
| 18 | 0,95 | * | * | 35 |
| 19 | 0,72 | * | * | 60 |
| 20 | 1,00 | 86 | * | 86 |
| 21 | 1,00 | 95 | * | 94 |
| 22 | 0,99 | * | * | * |
| 23 | 0,89 | * | * | 36 |
| 24 | 1,00 | 100 | 97 | 100 |
| 25 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |
| 26 | 0,99 | 86 | * | 89 |
| 27 | 0,59 | * | * | * |
| 28 | 0,99 | * | * | * |
| 29 | 0,90 | * | * | 30 |
| 30 | 1,00 | 100 | 97 | 100 |
| 31 | 0,99 | 100 | 94 | 99 |
| 32 | 1,00 | 51 | * | * |
| 33 | 1,00 | 80 | 50 | 84 |
| 34 | 0,99 | 93 | 52 | 80 |
| 35 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |
| 36 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 37 | 1,00 | 100 | 57 | 94 |
| 38 | 1,00 | 100 | * | 97 |

| | | | | |
|-----------|------|-----|----|-----|
| 39 | 1,00 | 100 | * | 88 |
| 40 | 0,75 | * | * | 26 |
| 41 | 0,57 | * | * | * |
| 42 | 1,00 | 100 | 72 | 99 |
| 43 | 1,00 | 100 | 77 | 100 |
| 44 | 1,00 | 100 | 90 | 100 |
| 45 | 0,98 | 99 | 91 | 97 |
| 46 | 1,00 | 89 | 69 | 94 |
| 47 | 1,00 | * | * | * |

Obs.: * representam politomias.

Tabela S3. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura 3 (árvore de *Amd*), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV).

| Clado | MB | MP | NJ | MV |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1,00 | 100 | 82 | 98 |
| 2 | 0,96 | 50 | * | 65 |
| 3 | 1,00 | 85 | * | 97 |
| 4 | 0,62 | * | * | 44 |
| 5 | 1,00 | * | * | 61 |
| 6 | 0,80 | * | * | 41 |
| 7 | 0,99 | * | * | 90 |
| 8 | 0,99 | 88 | * | 93 |
| 9 | 0,99 | 71 | * | 79 |
| 10 | 1,00 | 100 | 80 | 100 |
| 11 | 0,86 | 100 | 66 | 84 |
| 12 | 0,52 | 50 | 51 | * |
| 13 | 1,00 | 100 | 93 | 97 |
| 14 | 0,52 | * | * | * |
| 15 | 1,00 | 92 | 85 | 95 |
| 16 | 1,00 | 100 | 78 | 99 |
| 17 | 1,00 | 100 | 93 | 100 |
| 18 | 1,00 | 66 | 64 | 97 |
| 19 | 1,00 | 92 | 68 | 86 |
| 20 | 0,83 | 80 | 54 | 61 |
| 21 | 1,00 | 80 | * | 91 |
| 22 | 1,00 | 100 | 86 | 99 |
| 23 | 0,79 | * | * | 40 |
| 24 | 0,79 | * | * | 10 |
| 25 | 1,00 | 100 | 96 | 100 |
| 26 | 1,00 | * | 53 | 73 |
| 27 | 0,99 | * | * | 30 |
| 28 | 0,97 | * | * | 49 |
| 29 | 0,85 | * | * | 15 |
| 30 | 1,00 | 100 | 83 | 100 |
| 31 | 1,00 | 100 | 76 | 100 |
| 32 | 1,00 | 91 | 74 | 92 |
| 33 | 1,00 | 100 | 76 | 100 |
| 34 | 0,72 | * | * | 37 |
| 35 | 0,93 | 56 | 80 | 78 |
| 36 | 1,00 | 99 | 96 | 99 |
| 37 | 0,98 | 51 | * | 70 |
| 38 | 1,00 | 100 | * | 100 |

| | | | | |
|-----------|------|-----|----|-----|
| 39 | 0,67 | * | * | * |
| 40 | 1,00 | 98 | 86 | 98 |
| 41 | 1,00 | 100 | * | * |
| 42 | 1,00 | 97 | 76 | 94 |
| 43 | 1,00 | 100 | 91 | 100 |
| 44 | 0,90 | * | * | * |
| 45 | 1,00 | * | * | * |
| 46 | 1,00 | * | * | * |
| 47 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 48 | 0,96 | 76 | 73 | 76 |
| 49 | 0,97 | 83 | * | 76 |
| 50 | 0,99 | 97 | * | 97 |
| 51 | 0,89 | 84 | 79 | 74 |
| 52 | 0,91 | 100 | 86 | 100 |
| 53 | 0,52 | * | * | 48 |
| 54 | 0,79 | * | * | 64 |
| 55 | 1,00 | * | 61 | 81 |
| 56 | 0,65 | * | 99 | 98 |
| 57 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 58 | 0,63 | * | * | 33 |
| 59 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |
| 60 | 0,99 | * | * | 76 |
| 61 | 0,54 | * | * | 19 |
| 62 | 0,67 | * | * | 36 |
| 63 | 0,59 | * | * | 73 |
| 64 | 1,00 | 84 | 73 | 99 |
| 65 | 0,59 | 82 | * | 93 |
| 66 | 0,60 | 52 | * | 56 |
| 67 | 1,00 | 100 | 99 | 100 |
| 68 | 1,00 | 100 | * | 100 |
| 69 | 0,97 | 100 | 95 | 98 |
| 70 | 1,00 | * | * | 100 |

Obs.: * representam politomias.

Tabela S4. Valores de suporte referentes aos clados apresentados na Figura 4 (árvore de *Ddc*), conforme indicado por probabilidade posterior (PP) na análise bayesiana (AB), e bootstrap (BO) nas análises de máxima parcimônia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV).

| Claro | MB | MP | NJ | MV |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 0,61 | * | * | 35 |
| 2 | 0,58 | 77 | * | 63 |
| 3 | 1,00 | 100 | * | 99 |
| 4 | 1,00 | 91 | * | 96 |
| 5 | 0,97 | * | * | 43 |
| 6 | 0,83 | * | * | 59 |
| 7 | 1,00 | * | * | 73 |
| 8 | 0,60 | * | * | 20 |
| 9 | 1,00 | 100 | 95 | 100 |
| 10 | 1,00 | 89 | 80 | 94 |
| 11 | 0,99 | * | * | 50 |
| 12 | 1,00 | 100 | 96 | 100 |
| 13 | 1,00 | 100 | 96 | 100 |
| 14 | 0,99 | 81 | 72 | 66 |
| 15 | 0,99 | * | * | * |
| 16 | 1,00 | 99 | 71 | 98 |
| 17 | 1,00 | 100 | 91 | 100 |
| 18 | 1,00 | 69 | * | 78 |
| 19 | 0,97 | * | * | 52 |
| 20 | 1,00 | * | * | 61 |
| 21 | 1,00 | 100 | 57 | 99 |
| 22 | 1,00 | * | * | 88 |
| 23 | 0,85 | * | * | 36 |
| 24 | 0,99 | * | * | * |
| 25 | 1,00 | * | * | * |
| 26 | 0,63 | * | * | * |
| 27 | 0,94 | * | * | 43 |
| 28 | 1,00 | 100 | 69 | 100 |
| 29 | 1,00 | 100 | 89 | 99 |
| 30 | 1,00 | 100 | 57 | 100 |
| 31 | 0,96 | * | * | * |
| 32 | 0,79 | * | * | * |
| 33 | 1,00 | * | * | * |
| 34 | 0,80 | * | * | * |
| 35 | 1,00 | 100 | 79 | 100 |
| 36 | 1,00 | 54 | * | 60 |
| 37 | 1,00 | 74 | * | 79 |
| 38 | 1,00 | 100 | 79 | 100 |

| | | | | |
|-----------|------|-----|-----------|-----|
| 39 | 0,73 | * | 69 | 37 |
| 40 | 0,80 | * | * | 42 |
| 41 | 1,00 | 85 | 55 | 89 |
| 42 | 0,80 | * | * | 49 |
| 43 | 1,00 | * | * | 88 |
| 44 | 0,56 | * | * | * |
| 45 | 0,59 | * | * | * |
| 46 | 1,00 | * | * | 99 |
| 47 | 0,99 | * | * | 76 |
| 48 | 1,00 | 81 | * | 85 |
| 49 | 1,00 | 81 | 71 | 76 |
| 50 | 1,00 | 100 | 98 | 100 |

Obs.: * representam politomias.