

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

**PADRÕES EVOLUTIVOS DE *Zygothrica vittimaculosa* Burla, 1956 (Diptera: Drosophilidae)
NO BRASIL, COM IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO
DE UMA ESPÉCIE-IRMÃ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pedro Mesquita Fonseca

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**PADRÕES EVOLUTIVOS DE *Zygothrica vittimaculosa*
Burla, 1956 (Diptera: Drosophilidae) NO BRASIL, COM
IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DE UMA ESPÉCIE-IRMÃ**

Pedro Mesquita Fonseca

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fonseca, Pedro Mesquita
Padrões evolutivos de *Zygothrica vittimaculosa* Burla, 1956 (Diptera: Drosophilidae) no Brasil, com identificação e descrição de uma espécie-irmã. / Pedro Mesquita Fonseca.-2015.
129 p.; 30cm

Orientadora: Lizandra Jaqueline Robe
Coorientador: Elgion Lucio da Silva Loreto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2015

1. Pleistoceno 2. Região neotropical 3. COI 4. COII
5. Filogeografia I. Robe, Lizandra Jaqueline II.
Loreto, Elgion Lucio da Silva III. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Pedro Mesquita Fonseca. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: pedro.graal@gmail.com

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

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

**PADRÕES EVOLUTIVOS DE *Zygothrica vittimaculosa* Burla, 1956
(Diptera: Drosophilidae) NO BRASIL, COM IDENTIFICAÇÃO E
DESCRIÇÃO DE UMA ESPÉCIE-IRMÃ**

elaborada por
Pedro Mesquita Fonseca

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas, Biodiversidade Animal.

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

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

Hermes José Schmitz, Dr. (UNILA)

Maríndia Deprá, Dr^a (UFRGS)

Santa Maria, 27 de Maio de 2015.

Dedico este trabalho à minha irmã Mariana Mesquita Fonseca, pelo companheirismo, pela amizade e pela inspiração. Desde criança sempre tive a incumbência de ser exemplo para ela, por ser o irmão mais velho. Sempre me esforcei ao máximo para este fim e me orgulho cada vez que percebo obtive êxito nesse quesito. Contudo, percebo que hoje, muitas são as vezes em que é ela me serve de exemplo; de superação, de dedicação e de ser humano. Muito obrigado Mari, te amo!

AGRADECIMENTOS

Por este trabalho sou muito grato, primeiramente, às todas as mulheres de minha vida que, certamente, sem elas, nada teria acontecido. Duas delas que estiveram presentes desde meu nascimento, e às considero duas de minhas várias mães: Nana e vó Dulce, muito obrigado pelo amor incondicional imprescindível para minha vida. Também à minha namorada, companheira, que me proporcionou os melhores momentos dos últimos anos e com quem quero ter meus melhores momentos do resto de minha vida, especialmente agora que mais uma alegria em forma de criança está prestes a fazer parte de nossas vidas: Larissa, te amo infinitamente. Ainda às minhas outras duas mães, que mesmo distante geograficamente nunca se fizeram ausente e sempre me apoiaram no que fora preciso: dinda Branca e Vó Joanna, esse trabalho também é para vocês!

Agradeço também, aos meus amigos e companheiros de LabDros, os quais sempre me apoiaram e ajudaram em diversas etapas da dissertação, desde às coletas até as análises. Fran, Si, Val, Marcos, Stela, Tai e Cami. Aos novos membros Tiago, Raquel e Nader, que embora tenhamos convivido pouco, foram importantes em algum momento para este trabalho. Ao Ronaldo pela ajuda no meu início no laboratório, por todos os sequenciamentos e pela amizade Também aos membros egressos desse lab, que não estão mais aqui, mas foram muito importantes para minha formação como pesquisador e para este trabalho em si: Pa, Junges, Geo, Gabinho, Dani e Mauro.

Aos meus colegas do lab de Rio Grande, pela ajuda e parceria nos tempos em que estive lá: Bruna, Diego, Thaísa, Henrique e Daiana.

Aos professores, Élgion e Lenira, agradeço pela oportunidade de fazer parte desse laboratório, pela inspiração como excelentes pesquisadores, pela imensa contribuição em todos os meus trabalhos e pela confiança e parceria. Orgulho-me de fazer parte desse grupo de pesquisa.

Aos meus amigos, que considero família, pois se pudesse escolher, estariam sempre comigo, agradeço pelo apoio nos momentos difíceis e pela paciência nos mesmo, além dos ótimos momentos alegres, que felizmente foram e hão de sempre

ser imensa maioria: Fernando, Thiago Lima, Filipe, Francisco, Vinícius, Almeida, Camila Becon, Rodrigo (vulgo Moita), Gabi, José, Jerônimo, Leonardo e Bibiana.

É importante lembrar, também, das agências financiadoras de projetos cujos este trabalho fez parte. Sou grato ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo aporte financeiro.

Agradeço por último, mas provavelmente meu maior agradecimento à minha orientadora Lizandra. Minha principal fonte de conhecimento e inspiração, minha guia, minha amiga. Liz, te devo muito por este trabalho. Ele só está pronto por sua ajuda, paciência e compreensão para comigo. Serei eternamente grato e levarei seus ensinamentos para o resto da vida.

"Happiness is only real when shared."

Christopher McCandless

RESUMO

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

PADRÕES EVOLUTIVOS DE *Zygothrica vittimaculosa* Burla, 1956 (Diptera: Drosophilidae) NO BRASIL, COM IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DE UMA ESPÉCIE-IRMÃ

AUTOR: PEDRO MESQUITA FONSECA
ORIENTADORA: LIZANDRA JAQUELINE ROBE
CO-ORIENTADOR: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de maio de 2015.

A época do Pleistoceno foi marcada por grandes alterações na vegetação e principalmente no clima. No Hemisfério Sul, as glaciações foram menos intensas, onde houve também a formação de refúgios, proporcionando uma condição favorável à especiações. O gênero *Zygothrica*, pertencente à família Drosophilidae, é característico por sua interação com fungos. *Zygothrica vittimaculosa* é uma espécie considerado um tanto generalista, por explorar recursos diversos: inflorescências do gênero *Cestrum*, corpos de frutificação de fungos e frutas em decomposição. Neste trabalho, identificamos uma nova espécie, críptica com *Z. vittimaculosa* e simpátrica em boa parte de sua distribuição. Porém essa espécie nova é raramente amostrada em outros recursos além de inflorescências de *Cestrum*, diferentemente de *Z. vittimaculosa*. De morfologia externa idêntica à de *Z. vittimaculosa*, apenas após análises moleculares percebeu-se indícios de se tratar de uma espécie nova, confirmada, posteriormente, pela morfologia interna da genitália dos machos. Também nesse trabalho fez-se a descrição taxonômica da nova espécie. Uma análise comparativa com *Z. vittimaculosa* foi feita e documentada através de fotos de hábitos da morfologia externa e das genitálias, consideradas diagnósticas tanto para machos quanto para fêmeas, além de uma tabela com as medias taxonômicas. Por fim, foi também performedo um estudo filogeográfico com base em dois marcadores moleculares: COI (Citocromo c subunidade I) e COII (Citocromo c subunidade II). Nesse estudo, com base em dados de coletas e dados de variáveis climáticas estimou-se a distribuição atual de ambas as espécies e também a estimativa da distribuição no último máximo glacial (há cerca de 20.000 anos), sugerindo que a distribuição potencial de ambas restringe-se à área de estudo já amostrada, além de apontar uma alta adequabilidade para a espécie nova norte do Peru e no oeste do Chile, que não foram recuperadas para *Z. vittimaculosa*. Quanto aos padrões filogeográficos, sugere-se que, através de testes de neutralidade e índices de diversidade, a espécie nova teve uma expansão muito recente e potencialmente ainda está se expandindo e diversificando, enquanto *Z. vittimaculosa*, apesar de apresentar indicativos de expansão populacional também, esse são menos intensos que a de sua espécie irmã. Para esse explicar esse fato, pode-se supor que por *Z. vittimaculosa* ser mais generalista que a outra espécie, sofreu mais pressões de seleção, diversificando-se e aumentando o número de haplótipos.

Palavras-chave: Pleistoceno. Região neotropical. COI. COII. Filogeografia.

ABSTRACT

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

EVOLUTION PATTERNS OF *Zygothrica vittimaculosa* Burla, 1956 (Diptera: Drosophilidae) ON BRAZIL, WITH IDENTIFICATION AND DESCRIPTION OF A SISTER-SPECIES

AUTHOR: PEDRO MESQUITA FONSECA
ADVISER: LIZANDRA JAQUELINE ROBE
CO-ADVISER: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO
Santa Maria, May 28th, 2015.

The epoch of Pleistocene was marked by great climate and flora alterations. On the southern hemisphere, where the glaciations had less intensity, there was the formation of refuges, providing a favorable condition to speciation. The genus *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae) is characterized by their interaction with fungi. *Zygothrica vittimaculosa* is considered a generalist species, because it explores even fungi, flowers (genus *Cestrum*, Solanaceae) and rotting fruits. In this work we identified a new species that is cryptic with *Z. vittimaculosa* and they are sympatric in almost all distribution area. However, this new species is rarely collected in resources but *Cestrum* inflorescences, differently of *Z. vittimaculosa*. Only after molecular analyses we realize it was a new species (posteriorly confirmed by male internal genitalia analyses), due to the external morphology of both species is identical. Also in this work we did the taxonomic description of this new species. A comparative analysis was performed by photographs, with the documentation of the external patterns (morphology and color) and the internal genitalia morphology (considered diagnostic) for both females and males, in addition to a measures table. Finally, was also performed a phylogeographic study based on two mitochondrial markers: COI (Cytochrome c Subunit I) and COII (Cytochrome c Subunit II). In this case, through collections and climate variables data, we estimate the present distribution of both species as well as an estimated of the Last Glacial Maximum distribution (about 20,000 years), suggesting that the potential distribution of both species seems to be restricted to the already sampled area, besides pointed a high suitability in northern Peru and western Chile for the new species, data not inferred to *Z. vittimaculosa*. About phylogeographic patterns, we suggest that, through Neutrality tests and Diversity indexes, the newest species had a really recent expansion, and potentially is also in diversification and expansion, while *Z. vittimaculosa*, despite also presents population expansion signals, these are less intense than their sister-species. To explain this inference, we can assume that because *Z. vittimaculosa* be more generalist than the other species, it had suffered more selection pressure, diversifying and increasing the number of haplotypes.

Key words: Pleistocene. Neotropical region. COI. COII. Phylogeography.

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1: Interações entre drosofilídeos e corpos de frutificação de fungos27
- Figura 2: Inflorescências do gênero *Cestrum*. **a:** *Cestrum strigilatum*; **b:** *Cestrum euanthes*; **c:** *Cestrum intermedium*; **d:** *Cestrum parquii*30

CAPÍTULO II

- Figure 1: *Z. vittimaculosa* characteristic wing, with the 10 elected landmarks used for morphometric analysis65
- Figure 2: Microscope photography showing the aedeagus of both *Zygothrica* species (20x magnification). A: *Z. sp1*; B: *Z. vittimaculosa*65
- Figure 3: Map depicting the sampling points, discriminated by collected species and resource. Species sampling legend: **Black** = only *Z. vittimaculosa*; **Gray** = only *Z. sp1*; **Striped** = both species; **White** = none species. Resources legend: **Squares** = sampling performed only in *Cestrum* flowers; **Circles** = sampling in fungi only; **Triangles** = sampling in banana-baited traps only; **X** = sampling in both, *Cestrum* flowers and fungi; **Stars** = sampling in both, *Cestrum* flowers and banana-baited traps; **Crosses** = sampling in both, fungi and banana-baited traps; **Diamonds** = sampling in all resources66
- Figure 4: Neighbor-Joining Tree of *Z. vittimaculosa* (names started with 1) and *Z. sp1* specimens (names started with 2) based on **(a)** Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) and **(b)** Cytochrome C Oxidase subunit II (COII) sequences. Branch lengths are proportional to the scale, given in substitutions per site67
- Figure 5: Majority rule Bayesian consensus tree depicting the positioning of *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1* within Drosophilidae according to sequences of the nuclear gene alpha methyl dopa (Amd). Clades were collapsed according to the taxonomic hierarchies presented to the left. Bootstrap values presented by each clade in the Maximum Likelihood analysis are shown above the respective internal branch (values below 70 were omitted). Branch lengths are proportional to the scale, given in substitutions per nucleotide68
- Figure 6: Graph depicting the relationship between centroid x discriminant scores for wings of *Z. vittimaculosa* (crosses) and *Z. sp1* (squares)69
- Figure S1: Graph of Rotteling T^2 test, evaluating the discriminant power of wing shape variation between *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1*, with scores of 98.67% correct classifications71

CAPÍTULO III

Figura 1:	Hábito lateral do Holótipo de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. Barra = 1mm.....	90
Figura 2:	Hábito lateral do parátipo fêmea 266E de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. Barra = 1mm.....	91
Figura 3:	Vista dorsal da morfologia externa do Holótipo de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. com foco no tórax. Barra = 1mm.....	91
Figura 4:	Vista dorsal da morfologia externa do (a) holótipo e (b) do parátipo fêmea 266D de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. com foco no abdômen. Barra = 0,5mm.....	92
Figura 5:	Vista frontal da cabeça do holótipo de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. Barra = 0,5mm.....	92
Figura 6:	Vista frontal da cabeça do parátipo macho 266A de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. com destaque para as antenas e arista. Barra = 0,2mm.....	93
Figura 7:	Asa direita do holótipo de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. Barra = 1mm.....	94
Figura 8:	Prancha comparativa dos edeagus de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. (a, b) e <i>Z. vittimaculosa</i> (c, d) em vista ventral (a, c) e lateral (b, d). Barra = 0,1mm.....	95
Figura 9:	Prancha comparativa entre epândrios de (a) <i>Z. loretoi</i> sp. nov. (parátipo 267D) e (b) <i>Z. vittimaculosa</i> (indivíduo 261F). Barra = 0,1mm	96
Figura 10:	Prancha comparativa entre epândrios de (a) <i>Z. loretoi</i> sp. nov. (parátipo 267D) e (b) <i>Z. vittimaculosa</i> (indivíduo 261F). Barra = 0,1mm	96
Figura 11:	Ovipositor do parátipo 266E de <i>Z. loretoi</i> sp. nov. Barra = 0,1mm.....	97

CAPÍTULO IV

Figura 1:	Modelagens de distribuição populacional atual (B e D) e simulação da distribuição no UMG para (A e C) para <i>Z. loretoi</i> (A e B) e <i>Z. vittimaculosa</i> (C e D).....	120
Figura 2:	Gráfico do teste de identidade de sobreposição de nicho abiótico de <i>Z. loretoi</i> e <i>Z. vittimaculosa</i>	121
Figura 3:	Gráficos de <i>Mismatch Distribution</i> para dos genes COI (A e C) e COII (B e D) para <i>Z. loretoi</i> (A e B) e <i>Z. vittimaculosa</i> (C e D)	121
Figura 4:	<i>Median-Joining NetWork</i> dos haplótipos de <i>Z. vittimaculosa</i> e <i>Z. loretoi</i> para (A) gene COI, (B) gene COII e (C) ambos os genes concatenados. Nos NetWorks A e B, as cores representam os locais amostrados (vide legenda na figura). No NetWork C, as cores indicam o número de espécimes sequenciados com cada haplótipos Os números nos parênteses representam a quantidade de mutações entre os haplogrupos. Em A e B, Haplogrupo superior = <i>Z. vittimaculosa</i> . Em C, Haplogrupo superior = <i>Z. loretoi</i>	122

Figura 5: Árvores Filogenéticas por *Neighbor-Joining* para indivíduos de *Z. loretoi* (ID iniciando com 2) e *Z. vittimaculosa* (ID iniciando com 1) para os genes (A) COI, (B) COII e para ambos os genes concatenados (C) 123

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1: Sampling sites (city and Brazilian state) of <i>Z. vittimaculosa</i> or <i>Z. sp1</i> in relation to the number of specimens collected and resource type utilized. <i>Legend</i> : †: <i>Z. vittimaculosa</i> males; ‡: <i>Z. sp1</i> males; #: females. Zero indicates neither <i>Z. vittimaculosa</i> nor <i>Z. sp1</i> specimen were found, although collections with the resource were conducted in the sampling point. Blank indicates absence of collection with the specific resource in the referred locality70	70
Table 2: K2P intra and interspecific distances presented by <i>Z. vittimaculosa</i> and <i>Z. sp1</i> for the mitochondrial markers cytochrome oxidase c subunit I (COI) and cytochrome oxidase c subunit II (COII)71	71
Table S1: All specimens of <i>Z. vittimaculosa</i> and <i>Z. sp1</i> used on molecular analyses, their respective number of identification (ID), the locals, resource, date of collection and access code on GenBank72	72
Table S2: Taxas used on Amd's molecular analyses with their location and GenBank access numbers73	73
Table S3: Specimens used on morphometric analyses with their ID, resource, locality and date of collection.....75	75

CAPÍTULO IV

Tabela 1: Testes de neutralidade e índices de diversidade..... 124	124
Tabela 2: Fst de <i>Z. loretoi</i> para os genes COI (acima da diagonal) e COII (abaixo da diagonal)..... 124	124
Tabela 3: Fst de <i>Z. vittimaculosa</i> para o gene COI. 124	124
Tabela 4: Fst de <i>Z. vittimaculosa</i> para o gene COII. 125	125
Tabela 5: Análise da Variância Molecular (AMOVA) de <i>Z. loretoi</i> para os genes COI e COII em relação aos biomas Mata Atlântica e Pampa. 125	125
Tabela 6: Análise da Variância Molecular (AMOVA) de <i>Z. loretoi</i> para os genes COI e COII em relação aos biomas Mata Atlântica e Pampa. 125	125

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	24
1 INTRODUÇÃO GERAL	24
1.1 A família Drosophilidae	25
1.2 O Gênero <i>Zygothrica</i> Wiedemann 1830	25
1.3 A espécie <i>Zygothrica vittimaculosa</i> Burla 1956	28
1.4 O Gênero <i>Cestrum</i> L.	29
1.5 Análises dos padrões evolutivos	30
1.5.1 Análises Filogeográficas	30
1.5.2 Morfometria Geométrica	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objeyivo geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO II	43
Molecular markers helping morphology to identify putative cryptic species: the case of a new Neotropical <i>Zygothrica</i> Wiedemann (DIPTERA, Drosophilidae) Species	43
1 Abstract	45
2 Introduction	46
3 Material and Methods	48
3.1 Collections	48
3.2 Identification	48
3.3 DNA manipulation	48
3.4 Molecular analyses	50
3.5 Morphometrics	51
4 Results	52
4.1 Identification and Sampling Data	52
4.2 Molecular Analyses	53
4.3 Morphometric Analyses	54
5 Discussion	54
6 Acknowledgements	56
7 References	57
8 Figures and Tables	66
9 Supplementary Figures and Tables	72
CAPÍTULO III	77
Descrição de uma nova espécie de <i>Zygothrica</i> Wiedemann 1830 (Diptera: Drosophilidae) associada a flores de <i>Cestrum</i> (Solanaceae)	77
Resumo	79
1 Introdução	80
2 Material e Métodos	82
3 <i>Zygothrica loretoi</i> sp. n.	83
3.1 Descrição	84
4 <i>Zygothrica vittimaculosa</i> Burla 1956: 227, 228, 280, 319	86
5 Distinção entre <i>Z. vittimaculosa</i> e <i>Z. loretoi</i> sp. n	86
6 Conclusão	87
7 Agradecimentos	88

8 Referências	88
9 Lista de Figuras	90
CAPÍTULO IV	99
Filogeografia Comparativa de Duas Espécies Neotropicais de <i>Zygothrica</i> Wiedemann, 1830 (Diptera: Drosophilidae)	99
Resumo.....	101
1 Introdução	102
2 Material e Métodos.....	104
2.1 Coletas.....	104
2.2 Triagem.....	104
2.3 Modelagem de nicho e testes de identidade	105
2.4 Extração e Manipulação do DNA.....	106
2.5 Análises moleculares	107
3 Resultados	108
3.1 Coletas e Modelagens	108
3.2 Análises Moleculares	108
3.3 Parâmetros populacionais	109
3.4 Relações entre haplótipos	110
3.5 Estruturação entre populações	112
4 Discussão.....	112
5 Agradecimentos.....	114
6 Referências Bibliográficas.....	114
7 Figuras e Tabelas.....	120
CAPÍTULO V	127
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	127

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A família Drosophilidae

Drosophilidae é uma das mais diversas e amplamente distribuídas famílias da ordem Diptera, apresentando aproximadamente 4.280 espécies distribuídas em 76 gêneros (BÄCHLI, 2015). Esses gêneros estão divididos em duas subfamílias: Drosophilinae e Steganinae (BÄCHLI, 2015, TODA, 2007). Segundo Grimaldi (1988), evidências fósseis e biogeográficas sugerem que essas duas subfamílias divergiram há pelo menos 70 milhões de anos.

Também através de dados biogeográficos e evidências fósseis, Throckmorton (1975) concluiu que a família Drosophilidae teria sua origem remetente às regiões tropicais do Velho Mundo. Este autor considera que a evolução da família se deu, principalmente, a partir de ancestrais que tinham como principal fonte alimentar fungos crescidos em serapilheira. Segundo ele, a diversificação de substratos, em muitos grupos, seria o resultado de radiações adaptativas, com ênfase na utilização de frutos. De fato, a diversificação dos substratos explorados, associada à evolução de nicho, parece fornecer uma ótima explicação para o sucesso evolutivo da família (ROBE *et al*, 2010).

1.2 O Gênero *Zygothrica* Wiedemann 1830

O gênero *Zygothrica*, um dos mais diversos da família Drosophilidae, abrange atualmente um total de 124 espécies descritas (BÄCHLI, 2015), a maior parte das quais essencialmente micófagas (MALOGOLOWKIN, 1952; GRIMALDI, 1987) e/ou antófilas (GRIMALDI, 1987). A maior parte das espécies apresenta algum grau de associação com corpos de frutificação de fungos, que podem ser utilizados como sítios de alimentação, cortejo e/ou oviposição (COURTNEY *et al.*, 1990), de forma que convenciou-se tratar o mesmo como um gênero micofílico. Apesar de ser considerado um gênero exclusivamente Neotropical até a década de 80, novas espécies de *Zygothrica* vêm sendo descritas para regiões da África e Samoa (GRIMALDI, 1990; PRINGENT & TODA, 2006). No Brasil foram identificadas, até o momento, 54 espécies pertencentes a este gênero (GOTTSCHALK *et al.*, 2008).

Entretanto, estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa sugerem que este número seja uma subestimativa (BOLZAN, 2011, MACHADO et al., no prelo).

A deficiência no conhecimento deste gênero decorre, provavelmente, do fato de que a maior parte dos estudos focados em drosofilídeos usam iscas de bananas para atrair moscas nas coletas, estratégia muito eficiente se considerarmos o número de espécies de *Drosophila* capturadas, mas bastante tendenciosa se considerarmos a variedade de recursos utilizados por diferentes espécies de Drosophilidae (VAL et al., 1981). Provavelmente, esta é a razão pela qual espécies de *Zygothrica* não são comumente amostradas, e quando o são, suas abundâncias são muito baixas. Neste último caso, é ainda bastante frequente que as moscas não cheguem a ser identificadas até o nível de espécie, o que decorre da escassez de taxônomos especializados no grupo. Por fim, a impossibilidade de manter estoques destas espécies em laboratório também limita a sua atratividade nos estudos. Tudo isto faz com que a diversidade, a ecologia, a biogeografia e a evolução deste gênero ainda sejam pouco conhecidas.

Filogeneticamente, *Zygothrica* vem sendo apresentada como um gênero irmão a *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila* e *Paramycodrosophila*, de modo a compor o grupo genérico *Zygothrica* (GRIMALDI, 1990), caracteristicamente micofílico. O posicionamento do grupo genérico *Zygothrica* é, entretanto, questionado e, embora alguns autores apresentem o mesmo na base da filogenia de Drosophilinae (GRIMALDI, 1990), outros o situam como um clado derivado do próprio gênero *Drosophila* (THROCKMORTON, 1975; Yassin, 2013). Internamente, *Zygothrica* encontra-se dividido em 16 grupos, embora 21 espécies ainda não tenham sido atribuídas a nenhum grupo (BÄCHLI, 2015). Dentre estes, o grupo *vittimaculosa* destaca-se como um dos menores, apresentando apenas seis espécies (*Z. sectipoeyi* Burla 1956, *Z. vitticlara* Burla 1956, *Z. vittinubila* Burla 1956, *Z. vittipunctata* Burla 1956 e *Z. zygopoey* Burla 1956, além de *Z. vittimaculosa*, uma das espécies alvo deste trabalho). As relações evolutivas entre as espécies e grupos de *Zygothrica* têm, no geral, sido difíceis de elucidar (GRIMALDI, 1987).

Estudos recentes vêm mostrando a importância deste gênero para evidenciar padrões de diferenciação entre biomas (HOCHMÜLLER et al., 2010), entre áreas urbanas e áreas de mata (HOCHMÜLLER et al., 2010; GOTTSCHALK et al., 2007) e para definir prioridades de locais para a preservação (POPPE et al., 2013). Além disso, como *Zygothrica* é apontado como um dos gêneros neotropicais mais

especiosos de Drosophilidae (GRIMADI, 1987), o estudo de sua evolução torna-se especialmente promissor. Por fim, a compreensão adequada de seu posicionamento filogenético é tem ainda uma importância fundamental para a própria motivação de revisão taxonômica do gênero *Drosophila* (VAN DER LINDE et al., 2007, O'GRADY et al., 2008, SIDORENKO, 2008, YASSIN, 2008). E como pelo menos algumas destas espécies parecem ser especialmente suscetíveis às flutuações climáticas que devem atingir a região Neotropical nas próximas décadas ou séculos (ROBE et al., 2014), a compreensão de seus aspectos ecológicos e evolutivos torna-se também importante do ponto de vista da conservação.



Figura 1: Interações entre drosofilídeos e corpos de frutificação de fungos.

Fotos: Pedro Fonseca e Stela Machado.

1.3 A espécie *Zygothrica vittimaculosa* Burla 1956

Zygothrica vittimaculosa foi descrita por Burla em 1956. Suas características são parecidas com as de espécies próximas como *Z. vittinibula* Burla 1956 e *Z. vitticlara* Burla 1956 (BURLA, 1956). A principal característica distintiva desta espécie é a mancha escura na parte distal da asa. De acordo com Burla (1956), *Z. vittimaculosa* difere das espécies próximas citadas acima por apresentar desenhos diferentes nos tergitos e ter somente a base da vibrissa escurecida na face, ao contrário das demais, além de maior índice costal. A série tipo fora coletada em Itatiaia, no estado do Rio de Janeiro.

Zygothrica vittimaculosa parece ser uma espécie de distribuição restrita ao Brasil, apresentando registros de ocorrência para o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (GOTTSCHALK et al., 2008), além da coleta da série tipo de sua descrição, feita no Rio de Janeiro, sendo amostrada, então, nos biomas Mata Atlântica e Pampa. Desta forma, *Z. vittimaculosa* apresenta um gap considerável em sua distribuição, possivelmente devido ao déficit amostral em alguns estados brasileiros. Esta espécie vem sendo coletada em corpos de frutificação de fungos (BURLA, 1956, BOLZAN, 2011) (Figura 1) e em flores de espécies do gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) (Figura 2) (VILELA, 1984; GRIMALDI, 1987; VILELA e PEREIRA, 1992; SEPEL et al., 2000; SANTOS e VILELA, 2005), além de registros ocasionais em armadilhas com iscas de banana (GOTTSCHALK et al., 2008; HOCHMÜLLER et al., 2010; POPPE et al., 2013), apresentando padrões ecológicos bastante generalistas (GRIMALDI, 1987; DOGE et al., 2007). Além disso, estudos anteriores também registraram a ocorrência de uma espécie críptica a *Z. vittimaculosa* em coletas realizadas nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo a partir de iscas de banana fermentada e corpos de frutificação de fungos, respectivamente (HOCHMÜLLER et al., 2010; BOLZAN, 2011).

A associação com flores de *Cestrum* [*C. amictum*, *C. corymbosum*, *C. schlechtendalii*, *C. sendtnerianum*, *C. strigilatum* (SANTOS & VILELA, 2005) e *C. intermedium* (VILELA, 1984; GRIMALDI, 1987; SANTOS & VILELA, 2005) – além de registros de *Z. vittimaculosa* feitos por nosso grupo de pesquisas em inflorescências de *C. euanthes*] é bastante interessante em virtude da co-exploração e possível competição de *Z. vittimaculosa* com espécies do grupo *flavopilosa* de *Drosophila*

(ROBE et al, 2013). Entretanto, a existência de uma segregação temporal pode ser sugerida: indivíduos de *Zygothrica* são registrados em emergência tardias às de *Drosophila* (VILELA, 1984).

1.4 O Gênero *Cestrum* L.

O gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) é um gênero tipicamente americano, pertencente à tribo Cestreae, subfamília Cestroideae (SOARES et al., 2007). Este gênero tem na região andina de Bolívia, Perú e norte da Argentina seu pico de diversidade específica, com mais de 100 espécies descritas. No Brasil, esse número se aproxima de 50 espécies, sendo o Cerrado e a Mata Atlântica os biomas com maior número de espécies (HUNZIKER, 2001; NEE, 2001).

Drosofilídeos vêm sendo coletados em plantas do gênero *Cestrum* desde a metade do século passado, em trabalhos como os de Wheeler et al. (1962), Brncic (1978), Vilela (1984), Grimaldi (1987), Sepel (2000), Döge et al. (2008), etc. No Brasil, além de *Z. vittimaculosa*, outras seis espécies do gênero *Drosophila* já foram amostradas de flores do gênero *Cestrum*, todas pertencentes ao grupo *flavopilosa*, sendo elas: *D. cestri*, *D. cordeiroi*, *D. flavopilosa*, *D. hollisae*, *D. incompta* e *D. mariaehelenae* (SANTOS & VILELA, 2005).



Figura 2: Inflorescências do gênero *Cestrum*. **a:** *Cestrum strigilatum*; **b:** *Cestrum euanthes*; **c:** *Cestrum intermedium*; **d:** *Cestrum parquii*.

Fotos: Pedro Fonseca.

1.5 Análises dos padrões evolutivos

1.5.1 Análises Filogeográficas

A Área de estudo que infere sobre a distribuição geográfica de linhagens genealógicas e populações e os fatores que moldaram essa configuração genética atual é conhecida com Filogeografia (ROCHA et al., 2007). Estudos filogeográficos são capazes de elucidar dados de biodiversidade subestimados, áreas de populações endêmicas, além de permitir inferências sobre novas espécies crípticas (AVISE, 2000). Através da amostragem adequada dos indivíduos e de seus genes

torna-se possível testar hipóteses biogeográficas e inferir os processos de origem, distribuição e manutenção da biodiversidade, bem como descrever a evolução do isolamento reprodutivo de unidades populacionais (BEHEREGARAY, 2008).

O DNA mitocondrial é o marcador genético mais utilizado para realizar reconstruções filogeográficas, pois possui herança materna, ausência de recombinação e taxa de mutação maior que o DNA nuclear, além de possuir um quarto do tamanho efetivo e um tempo de coalescência quatro vezes mais recente em relação a regiões nucleares (AVISE, 2001; CHARLESWORTH, 2009). Devido ao seu menor tamanho efetivo, o DNA mitocondrial é mais sensível a eventos demográficos como eventos de gargalo de garrafa (ALLENDORF & LUICKART, 2007). A alta taxa de mutação é, entretanto, o aspecto mais importante, pois a alta variação nas sequências nucleotídicas permite a existência de muitos haplótipos distintos em uma população, o que é um pré-requisito para que um marcador genético seja utilizado em filogeografia (AVISE, 2001, 2009).

Um importante problema que pode surgir pelo uso de marcadores mitocondriais diz respeito à co-amplificação ou amplificação preferencial de cópias nucleares do DNA mitocondrial (numts) (SONG et al., 2008, Linares et al., 2009). O acréscimo de marcadores nucleares, além de superar este problema, apresenta maior potencial de recuperação de eventos mais antigos, além de possibilitar a comparação dos padrões obtidos entre os sexos (FREELAND et al., 2011; TEMPLETON, 2006). Assim, na maior parte das vezes, o mais apropriado é usar marcadores moleculares múltiplos, que apresentam modos de herança contrastantes.

Análises filogeográficas de *Drosophila* constituem praticamente a totalidade deste tipo de estudo na família Drosophilidae. No Brasil, análises filogeográficas têm sido conduzidas com *Drosophila* principalmente com o intuito de proporcionar o conhecimento dos padrões e processos associados à variabilidade genética de diferentes populações, em espécies mais ou menos especialistas (CENZI DE RÉ et al., 2014; FRANCO et al., 2010a, b.; FRANCO & MANFRIN, 2013; MORAES et al., 2009). Assim, os padrões filogeográficos apresentados por espécies de outros gêneros, com características mais generalistas, mas mesmo assim de distribuição restrita, pode revelar a ocorrência de importantes processos evolutivos, especialmente em um gênero amplamente especioso como *Zygothrica*. Neste caso, a comparação dos padrões apresentados por espécies próximas e simpátricas, com

diferentes níveis de especialização, pode ser especialmente promissora. Além disso, como trabalhos de filogeografia frequentemente são relevantes para definições de parâmetros para a conservação de espécies e/ou biomas (MORITZ & FAITH, 1998; EIZIRIK et al., 2001; ROCHA et al., 2007; FOUQUET et al., 2012), este estudo pode também ser importante para contribuir com informações ecológicas e conservacionais para os biomas onde as espécies ocorrem.

1.5.2 Morfometria Geométrica

Cada vez mais pesquisadores, tais como: Hickerson et al., (2006); Smith et al., (2005); Creer et al., (2010); Yassin et al., (2010); Krishnamurthy & Francis, (2012), concordam que análises morfológicas e morfométricas ainda são necessárias para uma maior confiabilidade dos dados e mais ampla e precisa investigação de características diagnósticas e diferenciais entre espécies, suprimindo as possíveis deficiências das análises moleculares. A morfometria geométrica, tal como a conhecemos hoje, surgiu a partir do conceito de morfometria tradicional, em que análises estatísticas multivariadas eram aplicadas a um conjunto de dados como medidas, razões e ângulos, obtidos a partir de um conjunto de marcos anatômicos (ROHLF & MARCUS, 1993). Contudo a abordagem da morfometria tradicional apresentava alguns problemas, como por exemplo, a obtenção de medidas de forma sem o efeito do tamanho, a obtenção de medidas a partir de estruturas homólogas, e a dificuldade gráfica de apresentar as variações de forma (ROHLF & MARCUS, 1993; ROHLF, 2002; ADAMS, 2004). Neste contexto, os avanços apresentados pela morfometria geométrica com relação à abordagem tradicional foram: o desenvolvimento das análises estatísticas envolvendo a forma das estruturas mensuradas; e as novas técnicas para a representação gráfica dos resultados, para que pudessem ser estudadas as propriedades do espaço multidimensional, onde as distâncias entre amostras estão inseridas (ROHLF, 2002). Desta maneira, através da definição dos marcos anatômicos, os efeitos de tamanho, orientação e localização puderam ser retirados, de maneira que apenas a forma fosse comparada (KENDALL, 1977; ROHLF, 2002).

Em estudos com *Drosophilidae*, esta metodologia tem sido aplicada a trabalhos relacionados, principalmente: (1) à interação entre o genótipo e o ambiente e as possíveis alterações no formato das asas (HATADANI & KLACZKO, 2008), (2) à tentativa de recuperação de sinal filogenético utilizando marcos anatômicos homólogos em asas (KLINGENBERG & GIDASZEWSKI, 2010), (3) à determinação e identificação de características diagnósticas na estrutura da genitália masculina para separar espécies crípticas (FRANCO et al., 2006). Neste último aspecto, em particular, análises morfométricas aplicadas à análise da forma da genitália masculina ou mesmo das asas podem se revelar ferramentas úteis também no suporte à descoberta de espécies novas e/ou na sua descrição.

2 OBJETIVOS

Dadas as circunstâncias acima mencionadas, os objetivos gerais desta dissertação foram:

2.1 Objetivo geral

Investigar a os padrões de distribuição geográfica da variabilidade genética encontrada para o morfotipo de *Z. vittimaculosa* na sua região de ocorrência.

2.2 Objetivos específicos

- a. Acessar a possibilidade de existência de diversidade críptica dentro do morfotipo de *Z. vittimaculosa*;
- b. Investigar as relações evolutivas apresentadas pelo potencial par de espécies crípticas;
- c. Analisar os padrões de sobreposição geográfica e de sobreposição de nicho apresentados pelas duas espécies;
- d. Descrever a espécie nova;
- e. Avaliar os padrões de diversidade intraespecífica de diferentes populações de *Z. vittimaculosa* e da espécie nova;
- f. Comparar os eventos histórico-demográficos inferidos para cada espécie, buscando associá-los aos padrões ecológicos e geográficos que as caracterizam.

3 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. C.; SLICE, D.E.; ROHLF, F. J. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the ‚revolution‘. **Italian Journal of Zoology**, 71: 5-16. 2004.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. Oxford, UK: **Blackwell Publishing**. 2007.

AVISE, J. C. **Phylogeography – The History and Formation of Species**. *Harvard University Press*, London, England. 2000.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. 3. ed. *Harvard University Press*, Cambridge, Massachusetts. 2001.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**. 36: 3-15. 2009.

BÄCHLI, G. **TaxoDros, the Database on Taxonomy of Drosophilidae**, 2015. Version 1.04. Available at: <http://www.taxodros.uzh.ch/>

BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**. 17: 3754-3774. 2008.

BOLZAN, A. R. **DNA barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica***. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2011.

BRNCIC, D. A note on the flavopilosa group of species of *Drosophila* in Rio Grande do Sul, Brazil, with the description of two new species (Diptera, Drosophilidae). **Rev Bras Biol**. 38: 647-51. 1978.

BURLA, H. **Die Drosophiliden-Gattung *Zygothrica* und ihre Beziehung zur *Drosophila*-Untergattung *Hirtodrosophila***. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin* 32: 190-321. 1956.

CENZI De RÉ, F. et al. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera, Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. **Biol J Linn Soc**. 112: 55-66, 2014.

CHARLESWORTH, B. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Genetics**. 10: 195-205. 2009.

COURTNEY, S. P.; KIBOTA, T. T.; SINGLETON, T. A. Ecology of mushroom-feeding *Drosophilidae*. **Advances in Ecological Research**. 20: 225-274. 1990.

CREER, D.J.; ROMBERG, C.; SAKSIDA, L. M.; VAN PRAAG, H.; BUSSEY, T. J. Running enhances spatial pattern separation in mice. **Proc Natl Acad Sci**. 107: 2367-2372, 2010.

DOGE, J. S.; GOTTSCHALK, M. S.; BIZZO, L. E. M.; OLIVEIRA, S. C. F.; SCHMITZ, H. J.; VALENTE, V. L. S.; HOFMANN, P. R. P. The genus *Zygothrica* Wiedemann 1830 (Diptera, *Drosophilidae*) in Santa Catarina state, southern Brazil: distribution and ecological notes. **Biota Neotropica** 7: 33-36. 2007.

EIZIRIK, E. KIM, J. H.; RAYMOND, M. M.; CRAWSHAW Jr., P. G.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**. 10: 65-79. 2001.

FOUQUET, A. et al. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 65: 547-561. 2012.

FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. **J Biogeogr**. 40: 142-154, 2012.

FRANCO F. F.; PRADO, R. F.; SENE, F. M.; COSTA, L. F.; MANFRIN, M. H. Aedeagus Morphology a discriminant marker in two closely related Cactophilic Species of *Drosophila* (Diptera; *Drosophilidae*) in South America. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 78: 203-212. 2006.

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

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

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. J. Wiley & Sons. 401 p. 2005.

GOTTSCHALK, M. S.; DE TONI, D. C.; VALENTE, V. L. S.; HOFMANN, P. R. P. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotrop Entomol.** 36: 848-862, 2007.

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

GRIMALDI, D. A. Phylogenetics and Taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History.** 186: 103-268. 1987.

GRIMALDI, D. A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History** 197: 1-139. 1990a.

HATADANI, L. M.; KLACZKO, L. B. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. **Genetica**, 133: 335-342. 2008.

HICKERSON, M. J.; DOLMAN, G.; MORITZ, C. Comparative phylogeographic summary statistics for testing simultaneous vicariance. **Mol. Ecol.** 15: 209-223. 2006.

HOCHMÜLLER, C. J. et al. The Drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. **Papéis Avulsos de Zoologia.** 50: 285-295. 2010.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum.** The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system, Ruggel: ARG Gantner Verlag. 500p. 2001.

KENDALL, D. The diffusion of shape. **Advances in Applied Probability.** 9: 428-430. 1977.

KLINGENBERG, C. P.; GIDASZEWSKI, N. A. Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data. **Systematic Biology.** 59: 245-261, 2010.

KRISHNAMURTHY, P. K. & FRANCIS, R. A. A Critical Review on the Utility of DNA Barcoding in Biodiversity Conservation. **Biodiversity and Conservation.** 20: 1901-1919. 2012.

LINARES, M. C. et al. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: a test of the DNA Barcode approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 50: 485-495. 2009.

MALOGOLOWKIN, C. Notas sobre "*Zygothrica dispar*" (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Biologia**. 12: 455-457. 1952.

MORTIZ, C. & FAITH, D. P. Comparative Phylogeography and the identification of genetically divergent areas of conservation. **Molecular Ecology**. 7: 419-429. 1998.

NEE, M. 2001. An overview of *Cestrum*. In: VAN DEN BERG, R. G.; BARENDSE, G.W.N.; VAN DER WEEDEN & MARIANI, C. (Eds.). **Solanaceae V: Advances in taxonomy and utilization**. Nijmegen: Nijmegen University Press. p. 109-136.

O'GRADY, P. M.; ASHBURNER, M.; CASTREZANA, S.. et al. Comment. **Bulletin of Zoological Nomenclature**. 65: 141-144. 2008.

POPPE, J. L.; VALENTE, V. L. S.; SCHMITZ, H. J. Population Dynamics of Drosophilids in the Pampa Biome in Response to Temperature. **Neotropical Entomology**, 42: 269-277. 2013.

PRINGENT, S. R. & TODA, M. J. The spread of the *Zygothrica samoensis* group (Drosophilidae, Diptera) over the Pacific. **Proc. of the 11th Pacific Science Intercongress**. 2006.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the *Drosophila* subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. 48: 310-321, 2010a.

ROBE, L. J. et al. Comparative ecological niche modeling and evolutionary ecology of Neotropical mycophagous Drosophilidae (Diptera) species. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. 49: 37-41, 2014.

ROCHA, L. A.; CRAIG, M. T. & BOWEN, B. W. Phylogeography and the conservation of coral reef fishes. **Coral Reefs**. 26: 501-512, 2007.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**. 8: 129-132. 1993.

ROHLF, F. J. Geometric morphometrics in systematics. In: Macleod N, Forey P [Eds], **Morphology, shape and phylogenetics**. p. 175-193. 2002.

SANTOS, R. C. O. & VILELA, C. R. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 49: 544-551. 2005.

SEPEL, L. M. N.; GOLOMBIESKY, R. N.; NAPP, M.; LORETO, E. L. S. Seasonal fluctuation of *Drosophila cestri* and *Drosophila imcompta*, two species of *flavopilosa* group. **Drosophila Information Service**. 83: 122-126. 2000.

SIDORENKO, V. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* (Insecta, Diptera). **Bulletin of Zoological Nomenclature**. 65: 98. 2008.

SMITH, M. A.; WOOD, D. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104: 4967-4972. 2007.

SOARES, E. L. C.; VIGNOLI-SILVA, M. & MENTZ, L. A. O Gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Botânica**. 58: 263-282. 2007.

SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **PNAS**. 105: 13486-13491. 2008.

TEMPLETON, A. R. **Population Genetics and Microevolutionary Theory**. John Wiley & Sons, New Jersey, 705 p. 2006.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: KING RC, ed. Handbook of genetics. New York, NY: **Plenum**, 421-469. 1975.

TODA, M. J. **DrosWLD-Species**: Taxonomic Information Database for World Species of Drosophilidae. <http://bioinfo.lowtem.hokudai.ac.jp/db/modules/stdb/>. Last accessed on 16/04/2015. 2007.

VAL, F. C.; MARQUES, M. D.; VILELA, C. R. Drosophilidae of neotropical region. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, J. N. (Eds.). **The genetics and biology of Drosophila**. Academic Press, Orlando, p. 123-168. 1981.

VAN DER LINDE, K.; BÄCHLI, G.; TODA, M. J.; ZHANG, W. X.; KATOH, T.; HU, Y. G. & SPICER, G. S. Case 3407. *Drosophila* Fallén, 1832 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage. **Bulletin of Zoological Nomenclature**. 64: 238-242. 2007.

VILELA, C. R. Occurrence of the *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) in the state of São Paulo (Brazil) with description of one new species. **Revista Brasileira de Zoologia**. 2: 63-69. 1984.

VILELA, C. R.; PEREIRA, M. A. Q. R. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 36: 475-482. 1992.

WHEELER, M. R, TAKADA, H.; BRNCIC, D. The flavopilosa species group of *Drosophila*. **Studies in Genetic II. Univ Texas Publ.** 6: 396-412. 1962.

WIEDEMANN, C. R. W. **Achias Diptorum Genus.** Kiliae Holsatorum. 1830.

YASSIN, A. et al. The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods 3 of species identification using DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 57, n. 2, p. 509-517, 2010.

YASSIN, A. Comments. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, 65: 55-57. 2008.

YASSIN, A. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology**. 38: 349-364. 2013.

CAPÍTULO II

Molecular markers helping morphology to identify putative cryptic species: the case of a new Neotropical *Zygothrica* Wiedemann (DIPTERA, Drosophilidae) species

1 Abstract

In this paper we identify a new *Zygothrica* Wiedemann species, with external morphology cryptic with *Zygothrica vittimaculosa* Wiedemann through DNA Barcoding and wing morphometry analyses. In this process, in addition to the ordinary DNA Barcoding mitochondrial gene *Cytochrome C Oxidase subunit I* (COI), we used sequences of another mitochondrial gene, *Cytochrome C Oxidase subunit II* (COII), in order to assess potential interference of numts (nuclear mitochondrial pseudogenes) in the obtained results. Moreover, sequences of the nuclear *Alpha methyl dopa* (Amd) gene were used to position the pair of cryptic species onto Drosophilidae phylogeny. Both molecular and morphometric analyses were developed with male specimens sampled in many points spread around Brazil, where collections were performed in three different resources: flowers of the genus *Cestrum* L. (Solanaceae Juss.), banana baited-traps and fungi fruiting bodies. Our molecular results, strengthened by the morphological identification and morphometric analyses, reinforce DNA Barcoding as a powerful tool to unraveling cryptic diversity, once the interference of numts is disregarded. In fact, reciprocal monophyly and a barcoding gap were detected, in spite of the strict external resemblance and the frequent sympatry and syntopy observed for the two cryptic species. The pair of *Zygothrica* species was positioned as sister to *Hirtodrosophila pictiventris*, supporting the monophyly of the previously proposed *Zygothrica* genus group. Moreover, this paper compares distribution and biotic niches between both sister species, showing that *Z. vittimaculosa* seems to be ecologically more versatile.

Keywords: Cryptic diversity; DNA Barcoding; Neotropics; numts; *Zygothrica* genus group.

2 Introduction

The genus *Zygothrica* Wiedemann 1830 currently comprises 124 described species (Bächli, 2014), most of which associated with fungi and/or flowers in different life stages: some species use these resources for oviposition and growing of larvae (Courtney et al., 1990; Grimaldi, 1987); other use fungi as courtship sites (Grimaldi, 1987; Gottschalk et al., 2009); and most use fungi for adults feeding (Malogolowkin, 1952; Grimaldi, 1987, 1990a; Courtney et al., 1990, Gottschalk et al., 2009). Almost all species of *Zygothrica* have their distribution restricted to the Neotropics, where the genus supposedly originated (Pringent & Toda, 2009), but some species of the genus are also found in Africa and Samoa (Grimaldi, 1990a; Pringent & Toda, 2006). In Brazil, 54 species of *Zygothrica* were described until the moment (Gottschalk et al., 2008). However, this number will probably increase as the collection efforts become more efficient, given that the sampling methods used nowadays (banana-baited traps mostly) are geared primarily to the genus *Drosophila*.

Zygothrica is closely related to *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila* and *Paramycodrosophila*, forming the mycophylic generic group named *Zygothrica* putatively positioned at the base of *Drosophilinae* phylogeny (Grimaldi, 1990a). Nevertheless, there are morphological and even molecular evidences presenting this genus as a derived branch inside *Drosophila* (Throckmorton, 1975; Yassin et al., 2013). Internally, *Zygothrica* is subdivided into 16 groups encompassing 103 species, in addition to 21 species that were not grouped yet (Bächli, 2014). According to Grimaldi (1987), *Zygothrica* is divided into five clades, which are also further subdivided.

Zygothrica vittimaculosa was described by Burla (1956) as a species with yellow spots on a black background on the back and sides of abdomen and

characteristic spot patterns at the tip of its wings (Fig. 1). This species is grouped within the *vittimaculosa* species group of clade 1 (Grimaldi, 1987), together with *Z. sectipoeyi*, *Z. vitticlara*, *Z. vittinubila*, *Z. vittipunctata* and *Z. zygopoeyi*, which were described in the same paper. *Zygothrica vittimaculosa* is occasionally sampled in fruit-baited traps (Gottschalk et al., 2008; Hochmüller et al., 2010; Poppe et al., 2013) or in association with fungi (Burla, 1956, Bolzan, 2011), but is mainly encountered in association with flowers of *Cestrum* L. (Solanaceae) (Vilela, 1984; Grimaldi, 1987; Vilela & Pereira, 1992; Sepel et al., 2000; Santos & Vilela, 2005). Yet, this species was recorded only in Brazil. On the description paper, as well as in Vilela (1984) and Grimaldi (1987), it was reported on the southeastern Brazilian region (states of Rio de Janeiro and São Paulo). Sepel et al. (2000), Gottschalk et al. (2007) and Döge et al. (2008) also indicated the presence of *Z. vittimaculosa* on the two southernmost states of Brazil, Santa Catarina and Rio Grande do Sul.

The original aim of this study was to access and characterize the molecular diversity levels achieved by such an interesting species across its distribution. Nevertheless, as the first results came out, we were faced by the possibility of a new species, morphologically cryptic to *Z. vittimaculosa*. Additional molecular and morphometric analyses were then performed in order to confirm this putative new species, which will be referred here as *Zygothrica* sp1. This paper describes these results, and shows the presence of a new Neotropical *Zygothrica* species which is not only cryptic, but also frequently sympatric and syntopic to its sibling, *Z. vittimaculosa*.

3 Material and Methods

3.1 Collections

Collections were made in all substrates known to be used by *Z. vittimaculosa*, throughout most of its known distribution and in localities among these points (Table 1). The collection on *Cestrum* was made leading the inflorescences to the laboratory, where they were kept in vessels with moist soil until the hatching of adult flies. The collection on fungi consisted in sucking directly the adult flies flying over or resting on fruiting bodies with an adapted portable vacuum cleaner (Machado et al., 2014). The third resource was explored providing banana-baited traps (Tidon & Sene, 1988), with one smashed banana sprinkled with baker's yeast per trap. The baits were put within forest fragments and tied in trees approximately 1,5m over the ground, where they were kept for three days. All adult flies were conserved in 100% ethanol for better preservation of genetic material.

3.2 Identification

Initially, identification was solely based on external morphology and diagnosis characters (Burla, 1956; Grimaldi, 1987). After realizing that this morphology pattern was common to two putative cryptic species, screening of males was further conducted through aedaeagus analysis (Fig. 2) as described by Bächli et al. (2004), and only this gender was used for molecular and morphometric analysis.

3.3 DNA manipulation

Total DNA of each identified specimen was extracted according to the protocol described by Sassi et al., (2005), with some modifications. The primers used to

amplify mitochondrial genes were TYJ1460 (5'-TAC AAT CTA TCG CCT AAA CTT CAG CC -3') and C1N2329 (5'-ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CAT ACA-3') for Cytochrome Oxidase c Subunit I (COI) and TL2J3037 (5'-ATG GCA GAT TAG TGC AAT GG-3') and TKN3785 (5'-GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG-3') for Cytochrome Oxidase c Subunit II (COII) (Simon et al., 1994). To amplify the nuclear gene *Amd* (*alpha* methyl dopa) the primers used were the forward *AmdEx4F* (5' GTB GTB GTN ATG GAY TGG YTV GCN AA 3') (Robe et al., 2010a), and the reverse *Amd-bw* (5' ACC ATR TAG ATY TTY TTN CGN TCC AT 3') (Tatarenkov et al., 2001).

The final components of each 25µl Polymerase Chain Reaction (PCR) mixture were: 2.5µl reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 30 pmol of each primer, 1U of Taq Polymerase (all from Invitrogen), and 15ng of DNA. The parameters of COI amplification were: denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation for 35s at 95 °C, annealing for 35s at 58 °C, and extension for 75 s at 72 °C, after which the reaction mixture was additionally held at 72 °C for 7 min to complete the extension. The COII cycling parameters were: denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 30s at 56 °C, and extension for 50 s at 72 °C, and final extension at 72 °C for 7 min. To amplify *Amd*, a touchdown was performed in the eleven first cycles, each of which included a 35s denaturing step at 95 °C, a 35s annealing step at 59-0,5 °C/cycle, and a 75s extension step at 72 °C. After this, reaction continued for 24 more cycles, in which the annealing temperature was held constant at 54 °C. The amplifications were checked on 0.8% agarose gel, and the obtained amplicons were purified with a solution containing PEG 13% and NaCl 1.6M. After purification, the amplicons were directed sequenced in a MegaBACE 500 sequencer using the kit DYEnamic ET® (Amersham) and each of the above described primers.

3.4 Molecular analyses

The obtained electropherograms were checked, corrected and assembled using the Staden Package Gap 4 program (Staden, 1996). COI, COII and Amd contigs were further aligned through the use of ClustalW, as implemented in Mega 5.10 (Tamura et al., 2012). In total, 16 male specimens of each, *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1*, had their COI and COII sequences established (access numbers KP859189 - KP859220 and KP859226 - KP859257, respectively), whereas the Amd sequences were characterized for 2 and 3 of these individuals (access numbers KP859221 - KP859225), respectively. In each case, individuals from different populations were sampled (Supplementary Material - Table 1S).

Whereas the two mitochondrial genes were used to infer phylogenetic and distance relationships between *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1* specimens, Amd sequences were used to assess the phylogenetic positioning of these two cryptic species within Drosophilidae. In each case, additional sequences were downloaded from GenBank (Supplementary Material - Table 2S): for mitochondrial analyses, sequences of *Hirtodrosophila thoracis* Williston were used as outgroup (Van der Linde, et al., 2010); for Amd analyses, several Drosophilidae sequences were added to the ingroup, whereas the sequence of *Culex quinquefasciatus* L. (Mauceli et al., 2007) was used as outgroup.

The two mitochondrial genes were individually analyzed in order to check for the presence of artifacts related to presence of paralogous nuclear copies of mitochondrial genes (numts) (Linares et al., 2009): premature stop codons or frameshifts and incongruence between genes. Phylogenetic analysis of each of these mitochondrial matrixes was performed through Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) on Mega 5.10 (TAMURA et al., 2012), with the use of Kimura 2-parameters (K2P)

nucleotide substitution model (Kimura, 1980). This software was also employed in the measurements of mean, maximum and minimum intra and interspecific K2P distances.

The phylogenetic analyses of the *Amd* nuclear gene were performed by Bayesian Analysis (BA), in MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011), and by Maximum Likelihood Analysis (ML), in PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003; Guindon, 2010). The GTR+I+G model was indicated for both analyses by the Akaike Information Criterion Test (AIC) (Akaike, 1974), carried out on MrModelTest 2.3 (Nylander, 2008) and ModelTest 3.7 (Posada & Crandall, 1998), respectively. BA analyses was performed using 22,000,000 generations of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) search, with tree sampling every 1,000 generations and discarding 25% of the initial results as burn-in. ML analysis was carried out using an optimized NJ starting tree, with 1,000 bootstrap replications.

3.5 Morphometrics

In total, 75 wings of male specimens were used in the morphometric analysis: 43 of *Z. vittimaculosa* and 32 of *Z. sp1* (Supplementary Material - Table 3S). These wings were fixed in slides with Canada balsam and the images were taken on SteREO DiscoveryV20, with the program AxioVs40 V 4.8.1.0 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH).

Ten landmarks were elected (Klingenberg & Zaklan, 2000; Bookstein, 1997) (Fig. 1) and plotted with TPSDig V2.17 (Rohlf 2013). The isometric estimator known as “centroid size” (CTR) – that is derived from coordinate data and is defined as the square root of the sum of the squared distances between the specimen’s landmarks and their arithmetic mean locations (Baylac & Daufresne 1996), as well as the

consensus of landmarks (Procrustes), the discriminant factors (Relative Warps) and the wing deformation graphs were obtained with TPSRelW (Rohlf 2008).

For analyzing wing size variation among species, the CTR was compared using a Mann-Whitney test. Besides, wing shape variation was evaluated using a Rotteling T2 test conducted with the discriminant factors, whose results (discriminant scores) were plotted in a XY graph against the CTR. Both analyses were performed on Past V 2.15 (Hammer, et al., 2001).

4 Results

4.1 Identification and Sampling Data

Based on external morphology, no differences could be found between *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1*, so that these are cryptic in relation to each other. Nevertheless, after detecting high levels of genetic divergence between them (see below), a careful inspection of male genitalia provided good diagnostic characters, and important differences were found at the aedeagus level (Fig. 2).

During four years of collections, 42 localities distributed around Midwest, South and Southeast Brazil were sampled, and in 24 of these registers of *Z. vittimaculosa* and/or *Z. sp1* were encountered (Fig 3). In total, 457 specimens were collected: 157 males of *Z. vittimaculosa*, 64 males of *Z. sp1* and 236 unidentified females (Table 1). *Zygothrica vittimaculosa* was recovered in all sampled resources, being encountered in 19 sampling localities, as opposed to *Z. sp1* that was found solely in ten sampling points (Table 1, Fig. 3). Almost 97% of *Z. sp1* males were obtained from *Cestrum* flowers and only in one of its northernmost registers, this species was found in association with fungi (Table 1, Fig. 3). No specimen of *Z. sp1* was captured from banana-baited traps (Table 1). Both species were found to be

sympatric in five of the sampling points, and in these cases they were syntopic to flowers of *C. parquii*, *C. strigilatum* and fungal fructification bodies.

4.2 Molecular Analyses

Divergence values of the order of 4% at the COI mitochondrial markers were the first indicatives of the existence of two morphologically cryptic species. After detecting differentiation at the aedeagus level (Fig. 2), further analyses were performed with this marker using only previously determined males, and this confirmed the evolutionarily independent status presented by both lineages. In fact, COI Neighbor-Joining trees recovered them as reciprocally monophyletic species (Fig. 4A), presenting low levels of intraspecific divergences (maximum of 1.6%) and high levels of interspecific distances (minimum of 3.9%) (Table 2). Reciprocal monophyly and the presence of a barcoding gap between intra and interspecific distances were also recovered for COII (Fig. 4B, Table 2). Congruence between markers, added to the absence of premature stop codons and frameshifts for both mitochondrial markers further support the argument that results here obtained could be hardly attributed to numts (Linares et al., 2009).

Phylogenetic analyses performed with a nuclear marker (*Amd*) in order to infer the position of the two species within Drosophilidae present them as sister species (bootstrap = 100, posterior probability = 1.00), although in this case *Z. vittimaculosa* appeared as paraphyletic in regard to *Z. sp1* (Fig. 5). Either Bayesian Analysis or Maximum Likelihood Analysis point towards the grouping of *both species* as a sister clade of *Hirtodrosophila pictiventris* (bootstrap = 98, posterior probability = 1.00), although the positioning of this clade within Drosophilidae could not be successfully evaluated (Fig. 5).

4.3 Morphometric Analyses

The mean ranks presented by both species in the Mann-Whitney test performed with the CTR values were quite different: 26.84 for *Z. vittimaculosa* and 11.16 for *Z. sp1* ($p < 0.0001$). The Rotteling T^2 test resulted in a value of 370.04 ($F = 21.725$; $p < 0.0001$), with scores of 98.67% of correct classification (Supplementary Material - Fig. S1). The results of shape variation analyses are represented on Figure 6, where it can be seen that the scores of discriminant analysis for wing shape variation are not overlapped between both species.

5 Discussion

Although at a first moment unrecognized, the set of results presented here clearly point to the presence of two externally cryptic sister species, which present distinct internal male genitalia patterns and appear to be sympatric and syntopic in at least part of their current distribution: (1) *Z. vittimaculosa* was already registered in Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina and Rio Grande do Sul Brazilian states (Burla, 1956; Vilela, 1984; Grimaldi, 1987; Sepel et al., 2000; Gottschalk et al., 2007; Döge et al., 2008) and appears to be more generalist than its sibling, being broadly associated with *Cestrum* flowers, but also captured in banana baited traps or in association with fungi (Burla, 1956; Gottschalk et al., 2008; Hochmüller et al., 2010; Poppe et al., 2013). (2) *Z. sp1*, whose registers are restricted to this paper, was encountered in Rio Grande do Sul and in the triple bordering among Paraná, São Paulo and Mato Grosso do Sul Brazilian states, and seems to be more restricted than its sister species both in terms of geographical distribution and resource utilization [only occasional samplings of this species were recovered from banana baited traps

(Hochmüller et al., 2010) or fungi (this paper)]. Distribution overlap comprehends at least a limited area at the center of the southernmost state of Brazil and an area around the northern boundary of the collection area (Fig. 3).

The first insight to the existence of these cryptic sister species was provided by molecular taxonomy, and further analysis proved that a DNA Barcoding approach should be able to help in their identification. DNA barcoding has been successfully used as a tool to identify and uncover cryptic diversity (Hebert et al., 2004b; Vences et al., 2005) through the use of sequences of the 5' section of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene (Hebert et al., 2003a and 2003b). Two prerequisites are necessary to allow effective inferences regarding DNA barcoding: (1) reciprocal monophyly among the evaluated species, and (2) the presence of a barcoding gap between intra and interspecific distances ranges (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2004b; Kuntner & Candek, 2014). Both of these properties applied to our *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1* dataset and the results obtained with this approach were further confirmed by morphology, which highlights the important role DNA barcoding may play in taxonomy, as some authors already inferred (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2004b; Gregory, 2005; Smith et al 2005; Miller, 2007; Meier, 2008; Koch, 2010). Furthermore, the convergence of *COI* and *COII* results allows us to discard the possibility that co-amplification of paralogous nuclear copies of mitochondrial genes (numts) are influencing our results. This inference is based on the notion that nuclear transfer usually involves small mitochondrial regions, so that under such circumstances, congruence between markers would not be expected (Linares et al., 2009).

Although at a first sight both species were entirely cryptic in regard to their external morphology, wing patterns were also able to distinguish them. In fact, wing

morphometry was already proved to be effective in reflecting even slight genetic differentiation (Weber, 1992; Guerra et al., 1997; Pezzoli et al., 1997; Moreto et al., 1998; Birdsall et al., 2000). The score of 98.67% of correct classification on the Rotteling T² test confirms that the pair of cryptic species have different wing shapes (Figure 6), and that wing patterns could be used as diagnostic characters. The centroid analysis concerning wing size adds confidence to the divergence of wing patterns between *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1*, showing that the former generally presents larger wings.

Finally, as concerns the phylogenetic relationships of this pair of cryptic and sibling species, our results support the study of Throckmorton (1975), in presenting them as sister to *Hirtodrosophila*. These genera were also recovered as sister clades by Grimaldi (1987 and 1990), which used external morphology and behavior in his inferences, and, more recently, by Yassin (2013a), in a supermatrix molecular approach. Even so, the positioning of this clade within Drosophilidae still remains an open question, and could not be confidently assessed by our single marker analyses.

6 Acknowledgements

The authors want to thank all students of Professor Elgion Loreto's lab that helped on the collections of the flies, especially the MSC. Francine Cenzi de Ré, MSC. João Pedro Junges dos Santos and MSC. Stela Machado. We are also grateful to the authorities responsible for Brazilian Parks and Reserves, besides the owners of private properties where we made the samplings. All these collections were authorized by the Brazilian Ministério do Meio Ambiente (MMA), in the form of the Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO – process

number 28013-6). We appreciate also Dr. Ronaldo Golombieski who performed the sequencing reactions. This work was supported by the Brazilian agencies CNPq (Universal-CNPq 14/2013, process number 471174/2013-0), CAPES and FAPERGS.

7 References

Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**: 716-723.

Bächli G. 2015. *TaxoDros, the Database on Taxonomy of Drosophilidae*, Version 1.04. Available at: <http://www.taxodros.uzh.ch/>

Baylac M, Daufresne T. 1996. Wing venation variability in *Monarthropalpus buxi* (Diptera, Cecidomyiidae) and the quaternary coevolution of box (*Buxus sempervirens* L.) and its midge: a geometrical morphometric analysis. In: Marcus L., ed. *Advances in Morphometrics*. New York, NY: Plenum Press, 285–302.

Birdsall K, Zimmerman E, Teeter K, Gibson G. 2000. Genetic variation for the positioning of wing veins in *Drosophila melanogaster*. *Evolution and Development* **2**: 16–24.

Bookstein FL. 1997. Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. *Medical Image Analyses* **1**: 225-243.

Burla H. 1956. Die Drosophiliden-Gattung *Zygothrica* und ihre Beziehung zur *Drosophila*-Untergattung *Hirtodrosophila*. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin* **32**: 190-321.

Courtney SP, Kibota TT, Singleton TA. 1990. Ecology of Mushroom-feeding Drosophilidae. *Advances in Ecological Research* **20**: 225–274.

Doge JS, Gottschalk MS, Bizzo LEM, Oliveira SCF, Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP. 2007. The genus *Zygothrica* Wiedemann 1830 (Diptera, Drosophilidae) in Santa Catarina state, southern Brazil: distribution and ecological notes. *Biota Neotropica* **7**: 33-36.

Gottschalk MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* **4**: 485–518.

Gottschalk MS, Bizzo L, Döge JS, Profes MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2009. Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. *Iheringia Série Zoologia* **99**: 442–448.

Grimaldi DA. 1987. Phylogenetics and Taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **186**: 103-268.

Grimaldi DA. 1990a. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **197**: 1-139.

Guerra D, Pezzoli MC, Giorgi G, Garoia F, Cavicchi S. 1997. Developmental constraints in the *Drosophila* wing. *Heredity* **79**: 564–571.

Guindon S, Gascuel O. 2003. PhyML original version: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307-21.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 1-9.

Hebert PDN, Gregory TR. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology* **54**: 852-859.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**: 313-21.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270 (Suppl.)**: S96-S99.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 14812–14817.

Hochmüller CJ, Da Silva ML, Valente VLS, Schmitz HJ. 2010. The Drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. *Papéis Avulsos de Zoologia* **50**: 285–295.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.

Klingenberg CP, Zaklan SD. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* **54**: 1273–1285.

Koch H. 2010. Combining Morphology and DNA Barcoding Resolves the Taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* Moure, 1961 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *AfricanInvertebrates* **51**: 413-421.

Candek K, Kuntner M. 2014. DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology* **15**: 268-277.

Linares MC, Soto-Calderon ID, Lees DC, Anthony NM. 2009. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: a test of the DNA Barcode approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **50**: 485-495.

Machado S, dos Santos JPJ, Robe LJ, Loreto ELS. 2014. An efficient and cheap entomological aspirator to collect mycophylic and anthophilic adult Drosophilidae flies. *Drosophila Information Service* **97**: 169-171

Malogolowkin C. 1952. Notas sobre “*Zygothrica dispar*” (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Biologia* **12**: 455–457.

Meier, R. 2008. DNA Sequences in Taxonomy: Opportunities and Challenges. In: Wheeler Q. D., ed. *The New Taxonomy Systematics Association Special Volume Series 76*. Boca Raton, FL: CRC Press, 95-128.

Miller SE. 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4775–4776.

Moreto B, Imasheva AG, Moren ZF, David JR. 1998. Wing shape and developmental temperature in two *Drosophila* species: different wing regions exhibit different reaction norms. *Genetika* **34**: 248-258.

Nylander JAA. 2008. MrModeltest v2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

Pezzoli MC, Guerra D, Giorgi G, Garoia F, Cavicchi S. 1997. Developmental constraints and wing shape variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **79**: 572–577.

Poppe JL, Valente VLS, Schmitz HJ. 2013. Population Dynamics of Drosophilids in the Pampa Biome in Response to Temperature. *Neotropical Entomology* **42**: 269-277.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817–818.

Prigent SR, Toda MJ. 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.

Prigent SR, Toda MJ. 2009. The spread of the *Zygothrica samoensis* group (Drosophilidae, Diptera) over the Pacific. *Proceeding. of the 11th Pacific Science Inter-Congress*.

Robe LJ, Loreto ELS, Valente VLS. 2010a. Radiation of the „Drosophila“ subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **48**: 310-321.

Rohlf FJ. 2013. tpsDig Version 2.17. *Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.*

Rohlf FJ. 2014. tpsRelw - Relative Warps Version 1.54. *Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.*

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.

Santos RCO, Vilela CR. 2005. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **49**: 544-551.

Sassi AK, Heredia F, Loreto ELS, Valente VLS, Rohde C. 2005. Transposable elements P and gypsy in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics and Molecular Biology* **28**: 734–739.

Sepel LMN, Golombiesky RN, Napp M, Loreto ELS. 2000. Seasonal fluctuation of *Drosophila cestri* and *Drosophila incompta*, two species of *flavopilosa* group. *Drosophila Information Service* **83**: 122-126.

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. *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 651–701.

Smith MA, Wood DM, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN. 2005. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4967–4972.

Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* **5**: 233-241.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.

Tatarenkov A, Zurovcová M, Ayala FJ. 2001. *Ddc* and *Amd* sequences resolve phylogenetic relationships of *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**: 321–325.

Throckmorton LH. 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King RC, ed. *Handbook of genetics*. New York, NY: Plenum, 421 – 469.

Tidon R, Sene FM. 1988. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Information Service* **67**: 89.

Val FC, Marques MD, Vilela CR. 1981. Drosophilidae of neotropical region. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN, eds. *The genetics and biology of Drosophila*. Orlando, FL, Academic Press: 123–168.

van der Linde K, Houle D, Spicer GS, Stepan SJ. 2010. A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genetics Research* **92**: 25-38.

Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR, 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**: 1859–1868.

Vilela CR, Pereira MAQR. 1992. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **36**: 475–482.

Vilela CR. 1984. Occurrence of the *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) in the state of São Paulo (Brazil) with description of one new species. *Revista Brasileira de Zoologia* **2**: 63-69.

Weber KE. 1992. How small are the smallest selectable domains of form. *Genetics* **130**: 345–353.

Wiedemann CRG. 1830. Achias Dipteriorum genus a Fabricio conditum; illustratum novisque auctum et conventui physicorum germanorum oblatum. Mohr, Kiliae.

Yassin A. 2013. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the post-genomic era. *Systematic Entomology* **38**: 349–364.

8 Figures and Tables

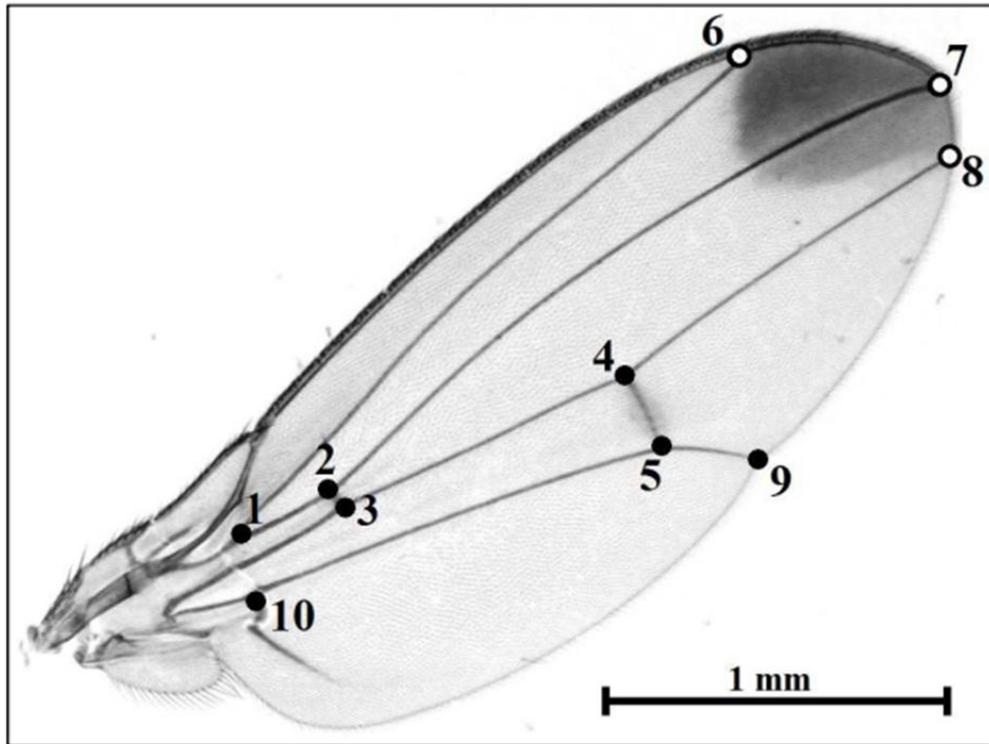


Figure 1: *Z. vittimaculosa* characteristic wing, with the 10 elected landmarks used for morphometric analysis.

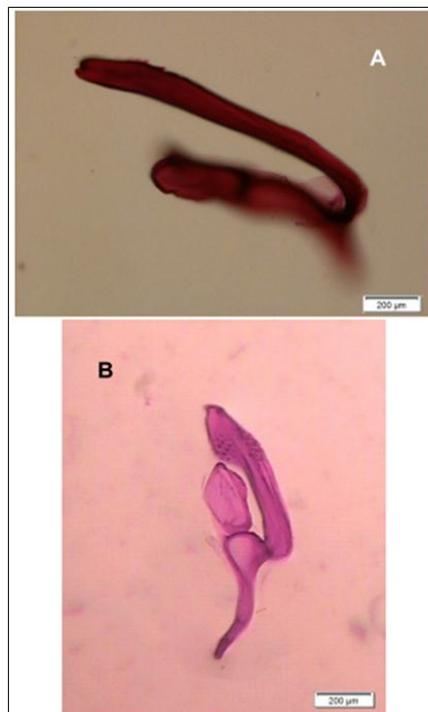


Figure 2: Microscope photography showing the aedeagus of both *Zygothrica* species (20x magnification). A: *Z. sp1*; B: *Z. vittimaculosa*.

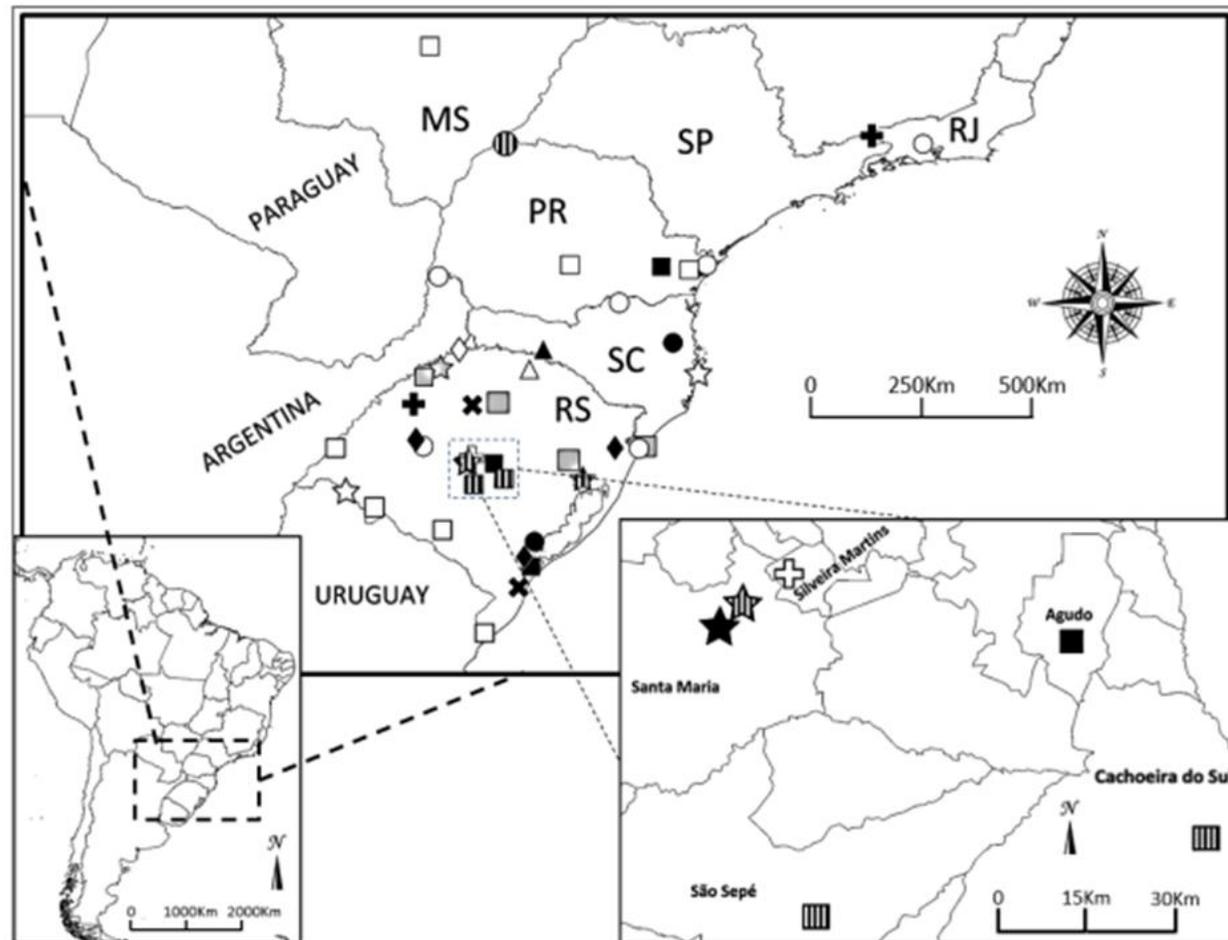


Figure 3: Map depicting the sampling points, discriminated by collected species and resource. *Species sampling legend:* **Black** = only *Z. vittimaculosa*; **Gray** = only *Z. sp1*; **Striped** = both species; **White** = none species. *Resources legend:* **Squares** = sampling performed only in *Cestrum* flowers; **Circles** = sampling in fungi only; **Triangles** = sampling in banana-baited traps only; **X** = sampling in both, *Cestrum* flowers and fungi; **Stars** = sampling in both, *Cestrum* flowers and banana-baited traps; **Crosses** = sampling in both, fungi and banana-baited traps; **Diamonds** = sampling in all resources.

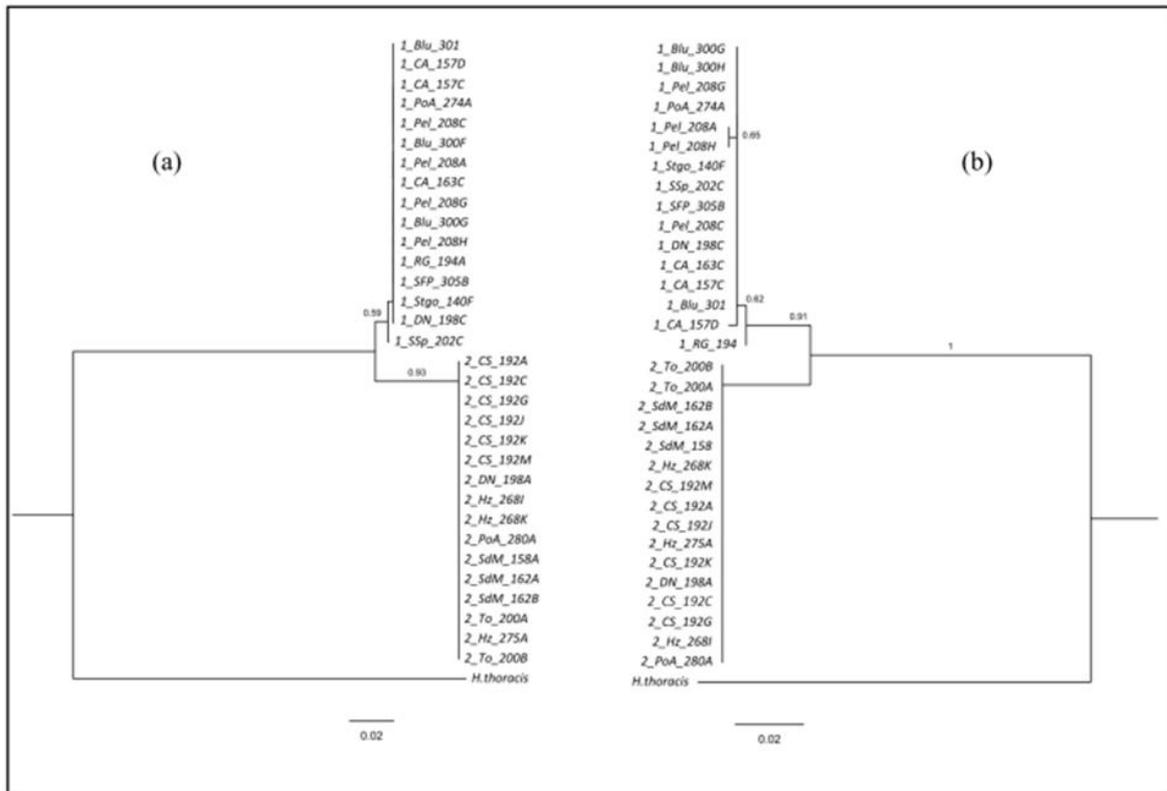


Figure 4: Neighbor-Joining Tree of *Z. vittimaculosa* (names started with 1) and *Z. sp1* specimens (names started with 2) based on **(a)** Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) and **(b)** Cytochrome C Oxidase subunit II (COII) sequences. Branch lengths are proportional to the scale, given in substitutions per site.

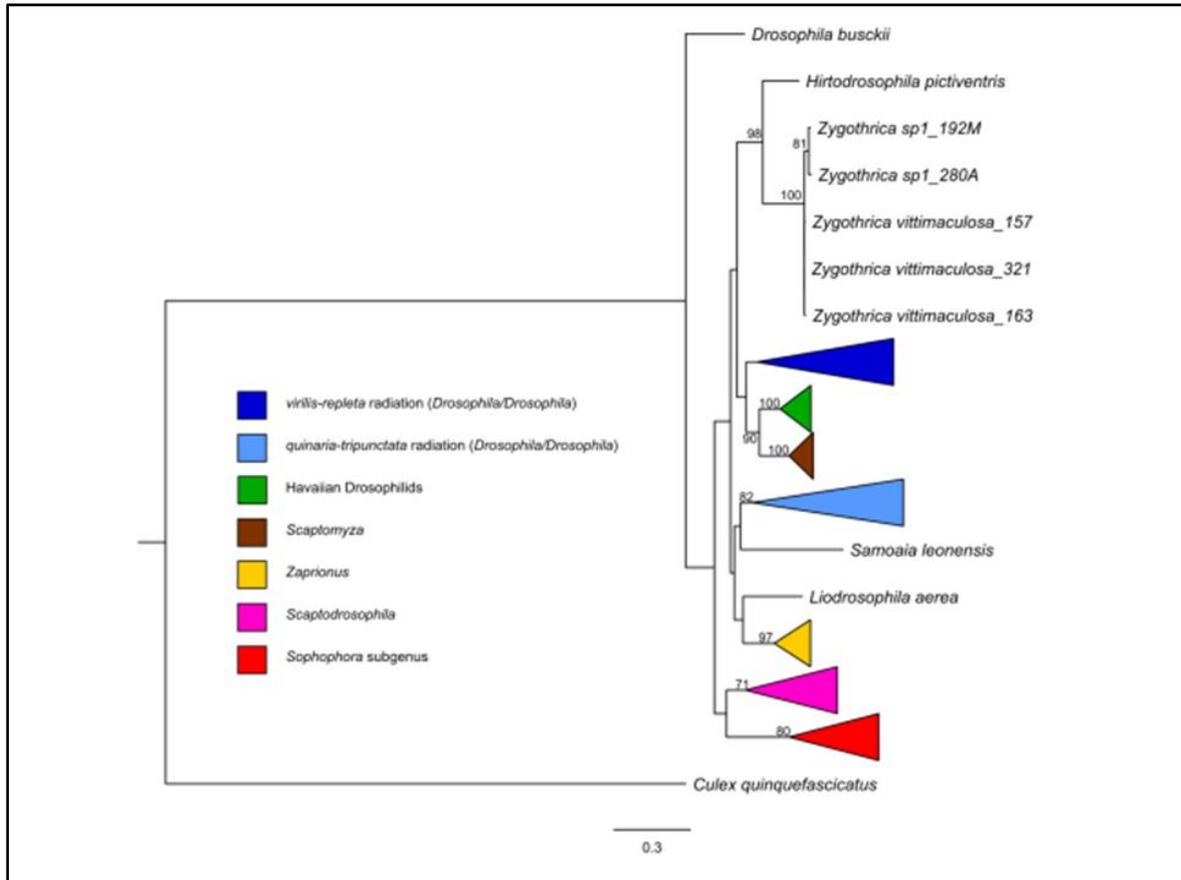


Figure 5: Majority rule Bayesian consensus tree depicting the positioning of *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1* within Drosophilidae according to sequences of the nuclear gene alpha methyldopa (*Amd*). Clades were collapsed according to the taxonomic hierarchies presented to the left. Bootstrap values presented by each clade in the Maximum Likelihood analysis are shown above the respective internal branch (values below 70 were omitted). Branch lengths are proportional to the scale, given in substitutions per nucleotide.

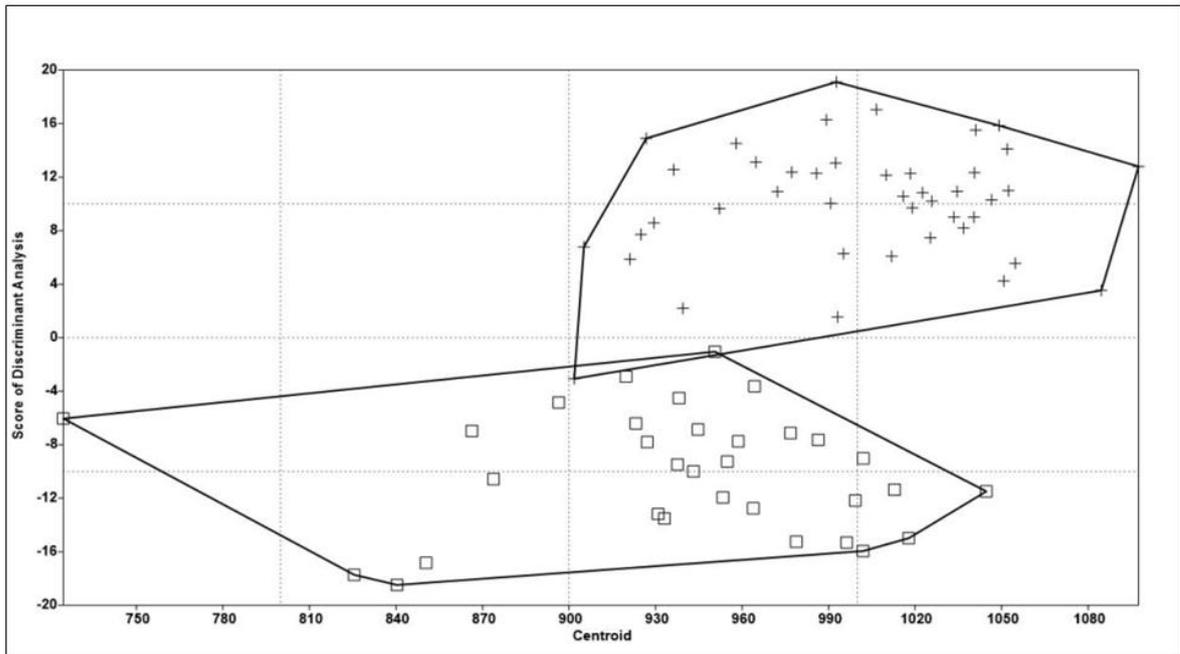


Figure 6: Graph depicting the relationship between centroid x discriminant scores for wings of *Z. vittimaculosa* (crosses) and *Z. sp1* (squares).

Table 1: Sampling sites (city and Brazilian state) of *Z. vittimaculosa* or *Z. sp1* in relation to the number of specimens collected and resource type utilized. Legend: †: *Z. vittimaculosa* males; ‡: *Z. sp1* males; #: females. **Zero** indicates neither *Z. vittimaculosa* nor *Z. sp1* specimen were found, although collections with the resource were conducted in the sampling point. **Blank** indicates absence of collection with the specific resource in the referred locality.

Sampled Site		Coordinates		Resource												Total per locality									
Brazilian State	City	Lat	Lon	Banana			<i>C. corymbosum</i>			<i>C. euanthes</i>			<i>C. intermedium</i>				<i>C. parquii</i>			<i>C. strigilatum</i>			Fungi		
				†	‡	#	†	‡	#	†	‡	#	†	‡	#	†	‡	#	†	‡	#	†	‡	#	
MS	Campo Grande	-20.4522	-54.5603																0	0	0				0
PR	Antonina	-25.4356	-48.7242										0	0	0										0
PR	Curitiba	-25.3569	-49.3519																1	0	1				2
PR	Diamante do Norte	-22.6158	-52.8697																		2	2	2		6
PR	Foz do Iguaçu	-25.5717	-54.3808																		0	0	0		0
PR	Guarapuava	-25.3186	-51.4039				0	0	0										0	0	0				0
PR	Guaraqueçaba	-25.3147	-48.3253																		0	0	0		0
RJ	Itatiaia	-22.4442	-44.6186	0	0	0															3	0	0		3
RJ	Nova Iguaçu	-22.6214	-43.4653																		0	0	0		0
RS	Agudo	-29.7428	-53.1208																0	0	4				4
RS	Bagé	-31.22	-54.2764																0	0	0				0
RS	Cachoeira do Sul	-30.0797	-52.8881																4	14	10				28
RS	Cruz Alta	-28.6447	-53.5083	0	0	0			14	0	24														38
RS	Dom Pedro de Alcântara	-29.3836	-49.8389																		0	0	0		0
RS	Erechim	-27.6444	-52.3217	0	0	0																			0
RS	Horizontina	-27.5964	-54.3167	0	0	0													0	18	36				54
RS	Itaqui	-29.4	-56.6769						0	0	0														0
RS	Jaguari	-29.3558	-54.7081																		0	0	0		0
RS	Monte Negro	-29.6669	-51.4281																0	1	1				2
RS	Pelotas	-31.8125	-52.4269	1	0	4			16	0	22										15	0	6		64
RS	Porto Alegre	-30.0708	-51.1225	1	0	1													0	2	15				19
RS	Quaraí	-30.3567	-56.4297	0	0	0													0	0	0				0
RS	Rio Grande	-32.0389	-52.2869						1	0	0								0	0	0				1
RS	Saldanha Marinho	-28.3858	-53.0333						0	3	1														4
RS	Santa Maria 1	-29.7167	-53.7269	1	0	2													0	0	2				5
RS	Santa Maria 2	-29.6786	-53.6914	1	0	2								24	6	21		12	10	31					107
RS	Santa Vitória do Palmar	-33.5114	-53.3282						0	0	0														0
RS	Santana do Livramento	-30.7064	-55.8111						0	0	0														0
RS	Santiago	-29.2172	-54.8639	0	0	0													5	0	4	0	0	0	9
RS	Santo Cristo	-27.8156	-54.6833																0	1	3				4
RS	São Francisco de Paula	-29.3908	-50.3833	0	0	0			11	0	14										16	0	0		41
RS	São Luiz	-28.4211	-54.9211																		7	0	4		11
RS	São Sepé	-30.2136	-53.5622																3	5	2				10
RS	Silveira Martins	-29.6278	-53.6083	0	0	0															0	0	0		0
RS	Taim	-32.5058	-52.5614						1	0	0														1
RS	Torres	-29.355	-49.7314																0	2	1				3
RS	Três Barras	-26.1647	-50.2975																		0	0	0		0
RS	Turuçu	-31.4806	-52.2111																		1	0	0		1
RS	Turvo	-27.21	-53.8853	0	0	0													0	0	0	0	0	0	0
SC	Blumenau	-27.0556	-49.0936																		11	0	4		15
SC	Concórdia	-27.205	-52.0111	6	0	19																			25
SC	Florianópolis	-27.7158	-48.5158	0	0	0													0	0	0				0
Total				10	0	28	0	0	0	43	3	61	0	0	0	24	6	21	25	53	110	55	2	16	457
Total per resource				38			0			107			0			51			188			73			

Table 2: K2P intra and interspecific distances presented by *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1* for the mitochondrial markers cytochrome oxidase c subunit I (COI) and cytochrome oxidase c subunit II (COII).

Distances	Genes							
	COI				COII			
	Mean	(SD)	Maximun	Minimum	Mean	(SD)	Maximun	Minimum
<i>Z. vittimaculosa</i> Intraspecific	0.00522	(±0.00272)	0.01660	0.00000	0.00325	(±0.00214)	0.01325	0.00000
<i>Z. sp1</i> Intraspecific	0.00023	(±0.00023)	0.00186	0.00000	0.00074	(±0.00069)	0.00397	0.00000
Interspecific	0.04298	(±0.00950)	0.04802	0.03940	0.04958	(±0.01141)	0.06154	0.04444

9 Supplementary Figures and Tables

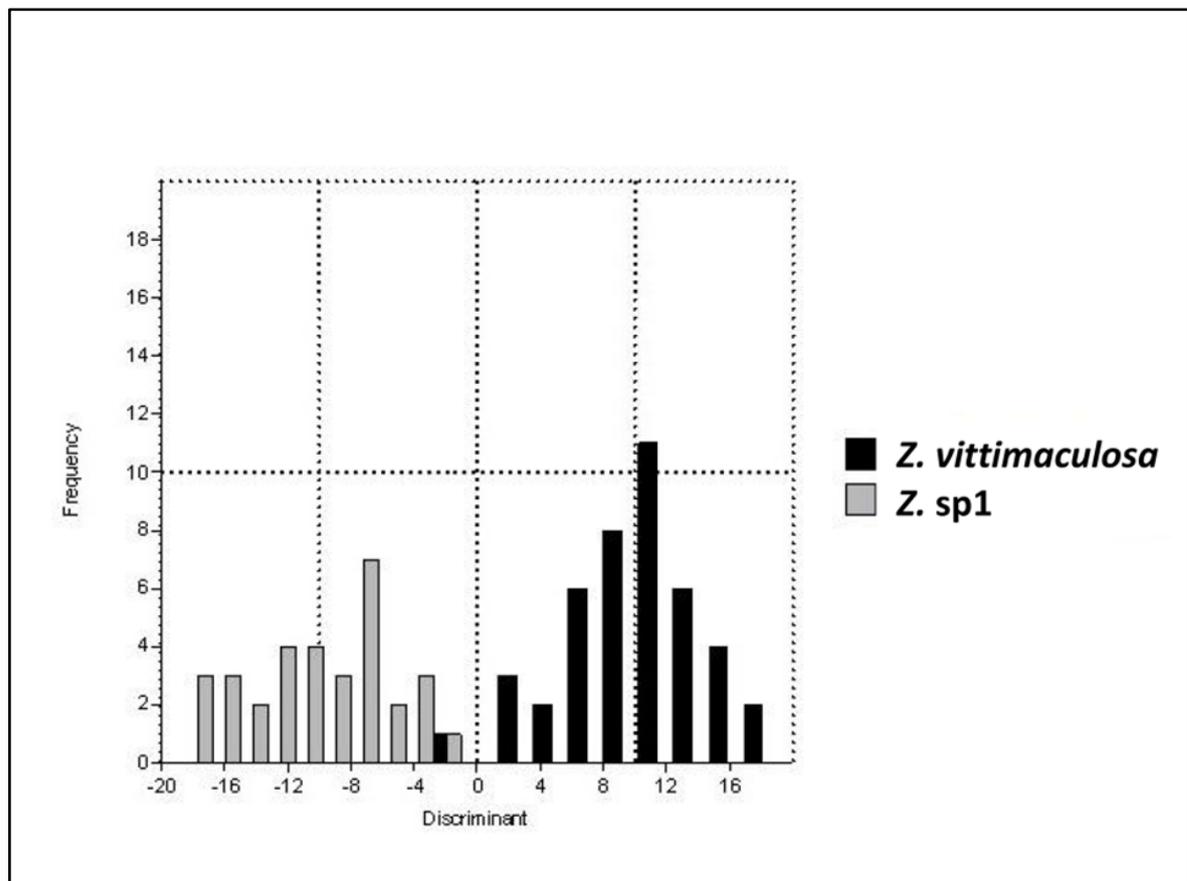


Figure S1: Graph of Rotteling T^2 test, evaluating the discriminant power of wing shape variation between *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1*, with scores of 98.67% correct classifications.

Table S1: All specimens of *Z. vittimaculosa* and *Z. sp1* used on molecular analyses, their respective number of identification (ID), the locals, resource, date of collection and access code on GenBank.

Species	ID	Brazilian State	Sampled Site	Resource	Sampling Date	Access Code		
						COI	COII	Amd
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Blu_300G	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13	KP859189	KP859200	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Blu_300H	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13	KP859190	KP859201	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Blu_301	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13	KP859191	KP859193	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_CA_157C	RS	Cruz Alta	<i>C. strigilatum</i>	Oct-10	KP859192	KP859190	KP859221
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_CA_157D	RS	Cruz Alta	<i>C. strigilatum</i>	Oct-10	KP859193	KP859191	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_CA_163C	RS	Cruz Alta	<i>C. strigilatum</i>	Oct-10	KP859194	KP859196	KP859222
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_DN_198C	PR	Diamante do Norte	Fungi	Apr-11	KP859195	KP859202	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Pel_208A	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11	KP859196	KP859198	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Pel_208C	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11	KP859197	KP859199	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Pel_208G	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11	KP859198	KP859189	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Pel_208H	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11	KP859199	KP859204	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_PoA_274A	RS	Porto Alegre	<i>C. strigilatum</i>	Jul-12	KP859200	KP859194	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_RG_194	RS	Rio Grande	<i>C. euanthes</i>	Jun-11	KP859201	KP859197	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_SFP_305B	RS	São Francisco de Paula	<i>C. euanthes</i>	Oct-13	KP859202	KP859195	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_SL_321D	RS	São Luiz Gonzaga	<i>C. strigilatum</i>	May-14	-	-	KP859223
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_SSp_202C	RS	São Sepé	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859203	KP859203	-
<i>Z. vittimaculosa</i>	1_Stgo_140F	RS	Santiago	<i>C. strigilatum</i>	Aug-10	KP859204	KP859192	-
<i>Z. sp1</i>	2_CS_192A	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859205	KP859208	-
<i>Z. sp1</i>	2_CS_192C	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859206	KP859209	-
<i>Z. sp1</i>	2_CS_192G	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859207	KP859210	-
<i>Z. sp1</i>	2_CS_192J	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859208	KP859211	-
<i>Z. sp1</i>	2_CS_192K	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859209	KP859212	-
<i>Z. sp1</i>	2_CS_192M	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. strigilatum</i>	Jul-11	KP859210	KP859213	KP859224
<i>Z. sp1</i>	2_DN_198A	PR	Diamante do Norte	Fungi	Apr-11	KP859211	KP859214	-
<i>Z. sp1</i>	2_Hz_268I	RS	Horizontina	<i>C. strigilatum</i>	Sep-12	KP859212	KP859217	-
<i>Z. sp1</i>	2_Hz_268K	RS	Horizontina	<i>C. strigilatum</i>	Sep-12	KP859213	KP859218	-
<i>Z. sp1</i>	2_Hz_275A	RS	Horizontina	<i>C. strigilatum</i>	Sep-12	KP859214	KP859219	-
<i>Z. sp1</i>	2_PoA_280A	RS	Porto Alegre	<i>C. strigilatum</i>	Sep-12	KP859215	KP859220	KP859225
<i>Z. sp1</i>	2_SdM_158	RS	Saldanha Marinho	<i>C. euanthes</i>	Oct-10	KP859216	KP859205	-
<i>Z. sp1</i>	2_SdM_162A	RS	Saldanha Marinho	<i>C. euanthes</i>	Oct-10	KP859217	KP859206	-
<i>Z. sp1</i>	2_SdM_162B	RS	Saldanha Marinho	<i>C. euanthes</i>	Oct-10	KP859218	KP859207	-
<i>Z. sp1</i>	2_To_200A	RS	Torres	<i>C. strigilatum</i>	Feb-12	KP859219	KP859215	-
<i>Z. sp1</i>	2_To_200B	RS	Torres	<i>C. strigilatum</i>	Feb-12	KP859220	KP859216	-

Table S2: Taxas used on Amd's molecular analyses with their location and GenBank access numbers.

Species	Origin	Access Code
<i>C. quinquefaciatus</i> Say, 1823	-	XM1863772
<i>D. annulimana</i> Duda, 1927 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	EU444554
<i>D. aracataca</i> Vilela and Val, 1983	-	AF324949
<i>D. arawakana</i> Heed, 1962 ^l	St Kitts, Carib	EU444555
<i>D. bandeirantorum</i> _1 Dobzhansky and Pavan, 1943 ^g	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444556
<i>D. bandeirantorum</i> _2 ^a	Derrubadas, RS, Brazil	EU444557
<i>D. bmcici</i> Hunter and Hunter, 1964 ^g	Bogotá, Colombia	EF560566
<i>D. bromeliae</i> Sturtevant, 1921	-	AF324950
<i>D. busckii</i> Coquillett, 1901	-	AF293707
<i>D. buzzatii</i> Patterson and Wheeler, 1942	-	AF324947
<i>D. camargoi</i> Dobzhansky and Pavan, 1950	-	AF324951
<i>D. canalinea</i> Patterson and Mainland, 1944	-	AF324952
<i>D. cardini</i> Sturtevant, 1916 ^f	Itaqui, RS, Brazil	EU444558
<i>D. cardinoides</i> Dobzhansky and Pavan, 1943 ^h	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444559
<i>D. cestri</i> Brncic, 1978 ^b	Santa Maria, RS, Brazil	EU444560
<i>D. cordeiroi</i> Brncic, 1978 ^h	Santa Maria, RS, Brazil	EU444561
<i>D. crocina</i> Patterson and Mainland, 1944 ^l	Marko, Brazil	EU444562
<i>D. cuaso</i> Bächli, Vilela and Ratcov, 2000 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	EU444563
<i>D. ellisoni</i> Vilela, 1983	-	AF324953
<i>D. erecta</i> Tsacas and Lachaise, 1974	-	XM1974256
<i>D. erecta</i> _2 Tsacas and Lachaise, 1974	-	AF293708
<i>D. flavopilosa</i> Frey, 1919 ^h	Santa Maria, RS, Brazil	EU444564
<i>D. funebris</i> Fabricius, 1787	-	AF293709
<i>D. gasici</i> _1 Brncic, 1957 ^g	Arica, Chile	EF560567
<i>D. gasici</i> _2 ^a	Cochabamba, Bolivia	EF560568
<i>D. gasici</i> _3 ^g	Bogota, Colombia	EF560569
<i>D. gaucha</i> Jaeger and Salzano, 1953 ^l	Campos do Jordão, SP, Brazil	AF324955
<i>D. griseolineata</i> _1 Duda, 1927 ^g	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444565
<i>D. griseolineata</i> _2 ^c	Florianópolis, SC, Brazil	-
<i>D. guaru</i> Dobzhansky and Pavan, 1943 ^d	Joinville, SC, Brazil	EU444566
<i>D. gymnobasis</i> Hardy and Kaneshiro, 1971	-	AF293710
<i>D. hydei</i> Sturtevant, 1921	-	AF293712
<i>D. immigrans</i> _1 Sturtevant, 1921	-	AF293713
<i>D. immigrans</i> _2 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444568
<i>D. immigrans</i> _3 ^d	Joinville, SC, Brazil	EU444567
<i>D. incompta</i> Wheeler and Takada, 1962 ^h	Santa Maria, RS, Brazil	EU444569
<i>D. maculifrons</i> _1 Duda, 1927 ^g	Santa Maria, RS, Brazil	EU444570
<i>D. maculifrons</i> _2 ^c	Florianópolis, SC, Brazil	EU444571
<i>D. mediodiffusa</i> Heed and Wheeler, 1957 ^l	Maricao, Porto Rico	EU444572
<i>D. mediopicta</i> Frota-Pessoa, 1954 ^g	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444573
<i>D. mediopictoides</i> Heed and Wheeler, 1957 ^l	Boquete, Panama	EU444576
<i>D. mediopunctata</i> _1 Dobzhansky and Pavan, 1943 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444575
<i>D. mediopunctata</i> _2 ^a	Itatiaia, RJ, Brazil	EU444574
<i>D. mediotriata</i> _1 Duda, 1925 ^g	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444577
<i>D. mediotriata</i> _2 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444578
<i>D. melanica</i> Sturtevant, 1916	-	AF324956
<i>D. melanogaster</i> _1 Meigen, 1830	-	NM165278

<i>D. melanogaster</i> _2 Meigen, 1830	-	NM057244
<i>D. mercatorum</i> Patterson and Wheller, 1942	-	AF324957
<i>D. mesophragmatica</i> Duda, 1927 ^g	La Paz, Bolivia	EF560572
<i>D. mimica</i> Hardy, 1965	-	AF293716
<i>D. mulleri</i> Sturtevant, 1921	-	AF324958
<i>D. nanoptera</i> Wheeler, 1949	-	AF324959
<i>D. nappae</i> _1 Vilela, Valente and Basso-da-Silva, 2004 ^h	Itapuã, RS, Brazil	EU444580
<i>D. nappae</i> _2 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444579
<i>D. nappae</i> _3 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	-
<i>D. neocardini</i> Streisinger, 1946 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444581
<i>D. nigrodunni</i> Heed and Wheeler, 1957 ⁱ	Barbados, Carib	EU444582
<i>D. ornatifrons</i> _1 Duda, 1927 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444583
<i>D. ornatifrons</i> _2 ^d	Joinville, SC, Brazil	EU444584
<i>D. ornatiennis</i> Williston, 1896 ⁱ	Guadalupe Island, Carib	EU444585
<i>D. pallidipennis</i> Dobzhansky and Pavan, 1943 ^d	Joinville, SC, Brazil	EU444586
<i>D. paraguayensis</i> _1 Duda, 1927 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444588
<i>D. paraguayensis</i> _2 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	EU444587
<i>D. paramediostriata</i> _1 Townsend and Wheeler, 1955 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444589
<i>D. paramediostriata</i> _2 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	EU444590
<i>D. pavani</i> Brcic, 1957 ^g	La Florida, Chile	EF560570
<i>D. persimilis</i> Dobzhansky and Epling, 1944	-	XM2023085
<i>D. phalerata</i> Meigen, 1830	-	AF293721
<i>D. polychaeta</i> Patterson and Wheeler, 1942	-	AF324960
<i>D. polymorpha</i> _1 Dobzhansky and Pavan, 1943 ^a	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444592
<i>D. polymorpha</i> _2 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	EU444591
<i>D. pseudoobscura</i> Frolova, 1929	-	AF293722
<i>D. pseudoobscura</i> _2 Frolova, 1929	-	XM1356249
<i>D. pseudoobscura</i> _3 Frolova, 1930	-	AF293706
<i>D. putrida</i> Sturtevant, 1916	-	AF293723
<i>D. repleta</i> Wollaston, 1858	-	AF324961
<i>D. robusta</i> Sturtevant, 1916	-	AF293724
<i>D. roehrae</i> Pipkin and Heed, 1964 ^b	Florianópolis, SC, Brazil	EU444593
<i>D. sechellia</i> Tsacas and Baechli, 1981	-	XM2039039
<i>D. simulans</i> Sturtevant, 1919	-	AF293726
<i>D. subbadia</i> Patterson and Mainland, 1943 ⁱ	El Narango, Mexico	EU444594
<i>D. tissieri</i> Tsacas, 1971	-	AF293727
<i>D. tripunctata</i> Loew, 1862 ⁱ	-	AF293728
<i>D. unipunctata</i> Patterson and Mainland, 1943 ⁱ	Medellin, Colombia	EU444595
<i>D. viracochi</i> Brcic and Koref-Santibanez, 1957 ^g	Bogotá, Colombia	EF560571
<i>D. virilis</i> Sturtevant, 1916	-	AF293729
<i>D. yakuba</i> Burla, 1954	-	XM2090630
<i>H. pictiventris</i> Duda, 1925	-	AF293711
<i>L. aerea</i> Okada, 1956	-	AF293715
<i>S. adusta</i> Loew, 1862	-	AF293704
<i>S. latifasciaeformis</i> Duda, 1940 ^j	Canal Zone, Panama	EU444596
<i>S. lebanonensis</i> Wheeler, 1949	Veyo, Utah	AF293714
<i>S. leonensis</i> Wheeler and Kambysellis, 1966	-	AF293725
<i>S. palmae</i> Hardy, 1965	-	AF293718
<i>Z. indianus</i> Gupta, 1970 ^b	Porto Alegre, RS, Brazil	EU444597
<i>Z. tuberculatus</i> Malloch, 1932	-	AF293731

Table S3: Specimens used on morphometric analyses with their ID, resource, locality and date of collection.

Species	ID	Brazilian State	Sampled Site	Resource	Sampled Date
<i>Z. vittimaculosa</i>	320A	RJ	Itatiaia	Fungi	Nov-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	300A	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	300B	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	300C	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	300D	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	301	RS	Blumenau	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	160F	RS	Cruz Alta	<i>C. Strigilotum</i>	Oct-10
<i>Z. vittimaculosa</i>	208A	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208B	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208C	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208D	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208E	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208F	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208G	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208H	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208I	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208J	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208K	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208M	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208N	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	208O	RS	Pelotas	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	274A	RS	Porto Alegre	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	141K	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Aug-10
<i>Z. vittimaculosa</i>	229B	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Sep-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	260	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Sep-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	261A	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Sep-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	261C	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Sep-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	261D	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Sep-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	261E	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Sep-12
<i>Z. vittimaculosa</i>	140F	RS	Santiago	<i>C. Strigilotum</i>	Aug-10
<i>Z. vittimaculosa</i>	305A	RS	São Francisco de Paula	<i>C. euanthes</i>	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	305C	RS	São Francisco de Paula	<i>C. euanthes</i>	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	305D	RS	São Francisco de Paula	<i>C. euanthes</i>	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	305E	RS	São Francisco de Paula	<i>C. euanthes</i>	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	310A	RS	São Francisco de Paula	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	310B	RS	São Francisco de Paula	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	310C	RS	São Francisco de Paula	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	310E	RS	São Francisco de Paula	Fungi	Oct-13
<i>Z. vittimaculosa</i>	202A	RS	São Sepé	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	202B	RS	São Sepé	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	202C	RS	São Sepé	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	206	RS	Turuçu	<i>C. euanthes</i>	Aug-11
<i>Z. vittimaculosa</i>	199A	SC	Concórdia	Banana	Aug-11
<i>Z. sp1</i>	192D	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	192E	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	192K	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	192L	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	192N	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	192P	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	192S	RS	Cachoeira do Sul	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-11
<i>Z. sp1</i>	266A	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	266B	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	266C	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	267A	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	267C	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	267D	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	267F	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	268A	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	268B	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	268C	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	268D	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	268E	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	268F	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	269A	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	269B	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	269C	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Sep-12
<i>Z. sp1</i>	275A	RS	Horizontina	<i>C. Strigilotum</i>	Jan-13
<i>Z. sp1</i>	216	RS	Porto Alegre	<i>C. Strigilotum</i>	Jul-12
<i>Z. sp1</i>	280A	RS	Porto Alegre	<i>C. Strigilotum</i>	Nov-12
<i>Z. sp1</i>	173A	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Apr-11
<i>Z. sp1</i>	173C	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Apr-11
<i>Z. sp1</i>	173D	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Apr-11
<i>Z. sp1</i>	175B	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Apr-11
<i>Z. sp1</i>	175D	RS	Santa Maria	<i>C. parquii</i>	Apr-11
<i>Z. sp1</i>	218	RS	Santo Cristo	<i>C. Strigilotum</i>	Dez-11

CAPÍTULO III

**Descrição de uma nova espécie de *Zygothrica* Wiedemann 1830
(Diptera: Drosophilidae) associada a flores de *Cestrum*
(Solanaceae)**

Resumo

Trabalhos recentes tem evidenciado a existência de uma grande diversidade críptica de drosofilídeos nos Neotrópicos. *Zygothrica* é um dos gêneros cujo número de espécies brasileiras parece estar bastante subestimado. Neste trabalho descrevemos uma nova espécie de *Zygothrica*, externamente críptica com *Z. vittimaculosa* e simpátrica a esta em grande parte de sua distribuição. Para tanto, comparamos medidas e, através de fotografias microscópicas, evidenciamos características que agora podem ser usadas como diagnósticas na diferenciação dessas espécies irmãs, entre as quais destacamos, fundamentalmente, o edeago dos machos e a espermateca das fêmeas.

Palavras-chave: Espécie críptica. Região neotropical. *Zygothrica vittimaculosa*.

Fungi. Isca de banana.

1. Introdução

Uma característica comum a muitos grupos de insetos é a dificuldade de identificação de espécies irmãs através de caracteres da morfologia externa. Nestes casos, a ausência total ou parcial de diferenciação externa entre espécies caracteriza “táxons crípticos” (Bickford et al., 2007). Esta realidade está presente também em Drosophilidae, onde a utilização da morfologia interna da terminália abdominal fornece uma alternativa funcional para a determinação dos espécimes, ao apresentar caracteres diagnósticos para as diferentes espécies (Sturtevant 1921, Hsu 1949, Vilela and Bächli, 1990).

Em trabalhos recentes, Bolzan (2011) e Machado et al. (em preparação) mostraram a existência de uma grande diversidade críptica de drosofilídeos na região Neotropical. Ambos os estudos demonstraram, através da tecnologia de DNA Barcode, que o número de espécies registradas para a região Neotropical representa uma grande subestimativa. Isto ocorre, provavelmente, devido ao método de coleta comumente empregado, que consiste na utilização de armadilhas com iscas de bananas fermentadas (Tidon & Sene, 1988). De fato, segundo Val e colaboradores (1981), este método de amostragem pode ser considerado tendencioso, já que a maior parte das moscas atraídas apresenta hábitos frugívoros.

Entre os grupos de Drosophilidae cuja diversidade Neotropical está severamente subestimada encontra-se *Zygothrica*. Este gênero apresenta, atualmente, 124 espécies descritas (Bächli, 2015), das quais 54 apresentam registros para o Brasil (Gottschalk et al., 2008). Entretanto, das 24 MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units) de *Zygothrica* amostradas por Machado

et al. (em preparação) em diferentes regiões dos biomas brasileiros Pampa, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, apenas 11 foram atribuídas a espécies conhecidas.

Um dos morfotipos de *Zygothrica* para os quais a presença de diversidade críptica já foi previamente sugerida (Fonseca et al., em preparação) é o de *Z. vittimaculosa* Burla 1956. Esta espécie é encontrada no Brasil, em sua maioria, em associação com *Cestrum* L. (Solanaceae) (Vilela, 1984; Grimaldi, 1987; Vilela & Pereira, 1992; Sepel et al., 2002; Santos & Vilela, 2005), utilizando suas flores como sítio de oviposição. Entretanto, *Z. vittimaculosa* tem sido coletada também através de iscas de bananas fermentadas (Gottschalk et al., 2008; Hochmüller et al., 2010; Poppe et al., 2013) e sobrevoando corpos de frutificação de fungos (Burla, 1956). Esta espécie pertence ao grupo específico homônimo juntamente com *Z. sectipoeyi*, *Z. vitticlara*, *Z. vittinubila*, *Z. vittipunctata* e *Z. zygopoeyi* (Grimaldi, 1987). Contudo nenhuma das demais espécies descritas do grupo é amostrada emergindo das flores de espécies de *Cestrum*.

Neste trabalho descrevemos a sétima espécie do grupo *vittimaculosa*, buscando compará-la e diferenciá-la com relação a sua espécie críptica, *Z. vittimaculosa*. Estas constituem espécies irmãs, e parecem ser simpátricas em boa parte da sua distribuição (Fonseca et al., em preparação). Além disso, com exceção de um único indivíduo coletado por Hochmüller et al. (2010) com iscas de banana fermentada e de dois indivíduos amostrados em fungos (Fonseca et al., em preparação), a nova espécie, assim como *Z. vittimaculosa*, tem a maior parte dos seus registros de coleta associados a flores de *Cestrum*. É, pois, de grande interesse encontrar caracteres diagnósticos que permitam a delimitação das duas espécies, e embora a descrição de *Z. vittimaculosa* limite-se originalmente a

exemplares masculinos (Burla, 1956), aqui provemos informações úteis na diferenciação de ambos os sexos.

2. Material e métodos

Três diferentes métodos foram empregados na amostragem de indivíduos pertencentes à *Z. vittimaculosa* e a sua espécie críptica: (1) coleta de recursos utilizados para oviposição, especialmente flores de espécies nativas de *Cestrum*, que foram acondicionadas em recipientes PET com areia umedecida à temperatura ambiente por até 21 dias para aguardar a eclosão dos indivíduos de interesse; (2) coleta direta de indivíduos pousados sobre ou sobrevoando corpos de frutificação de fungos macroscópicos com o auxílio de um aspirador entomológico (Machado et al, 2014); (3) coleta direta com armadilhas de banana fermentada (Tidon & Sene, 1988).

Após as coletas, os exemplares estudados foram fixados e conservados em etanol absoluto. As medidas foram realizadas no microscópio estereoscópio Olympus BX40. Para a análise da morfologia da genitália externa e interna, masculina e feminina, a porção final do abdômen de cada um dos espécimes de interesse foi retirada e tratada de acordo com o protocolo descrito por Bächli et al. (2004). As asas também foram removidas e fixadas em lâminas permanentes com Bálsamo do Canadá. Foram realizadas capturas de imagens dos indivíduos no microscópio SteREO DiscoveryV20, através do programa AxioVision40 V4.8.1.0 (Carl Zeiss).

3 *Zygothrica loretoi* sp. n.

Figs. 1-6; 9; 11. Tab. S1

Zygothrica loretoi (Hochmüller et al., 2010: 290, 293; Machado et al., em preparação; Fonseca et al., em preparação)

Material tipo. HOLÓTIPO: ♂, etiquetado “Local de origem: Horizontina, Rio Grande do Sul, Brasil. Data da coleta: Outubro/2012. Coletor: Lizandra Robe, nº de identificação 267F”, preservado em etanol absoluto, genitália dissecada e mantida em microtubo com glicerina, asas preservadas em lâmina com Bálsamo do Canadá. PARÁTIPOS: 03♂♂ “Local de Origem: Horizontina, Rio Grande do Sul, Brasil. Data da coleta: Outubro/2012. Coletor: Lizandra Robe”, nº de identificação 266A, 266B e 267D; 03♀♀ “Local de origem: Horizontina, Rio Grande do Sul, Brasil. Data da coleta: Outubro/2012. Coletor: Lizandra Robe”, nº de identificação 266C, 266D e 266E. Os parátipos apresentam as mesmas condições do holótipo.

Localidade tipo. Bosque no distrito de Eldorado, Horizontina, Rio Grande do Sul, Brasil. Coordenadas (UTM): -27.5964, -54.3167.

Diagnose. Moscas amarelas com faixas longitudinais marrons no tórax, parte dorsal do abdômen marrom com pares de manchas amarelas nos tergitos IV e V e por vezes no VII (Figs. 1 a 4). Asas com a extremidade distal com mancha marrom característica (Fig. 7). Edeago tubular oco (Fig. 8) com aproximadamente 0,385 mm de comprimento. Extremidade distal com invaginação e abertura ventral. Espinhos na região dorsal, originados nas laterais distais e convergindo até a linha mediana. Estreitamento na metade proximal com espessura mínima de aproximadamente 0,015mm. Espermateca em formato umbrelar, medianamente invaginada,

esclerotizada e enrugada externamente. Tubo com entrada central não chega a tocar na margem interna, antes expande-se voltando à margem da abertura formando um contínuo de fora para dentro (Fig. 9).

Etimologia. Os autores deste trabalho elegeram para a nova espécie de *Zygothrica* o epíteto específico '*loretoi*', em cordial homenagem ao geneticista, e sobre tudo, grande drosofilista Elgion Lucio da Silva Loreto do Departamento de Bioquímica Toxicológica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 Descrição

Cabeça (Figs. 1 a 6). Amarela. Palpos distalmente marrons, multitricosos, com cerdas longas (na metade apical do palpo). Antena com escapo amarelo, pedículo marrom, flagelômero I marrom polinoso. Arista marrom com 5-6 ramos dorsais, 1 ramo ventral e 4-5 ramos internos. Face amarela. Gena com uma mancha marrom na base da vibrissa e outra abaixo do olho. *Occiput* marrom. *Postgena* amarela. Olhos vermelhos. Fronte e placas orbitais amarelas. Faixas frontais marrons. Triângulo frontal amarelo. Triângulo ocelar marrom com o ápice mais escuro. Ocelos hialinos. Cerdas pós-ocelares convergentes.

Tórax (Figs. 1 e 2). Amarelo. Escuto com um par de faixas escuras longitudinais centrais nas proximidades do escutelo; um par de faixas escuras longitudinais alinhadas às cerdas dorsocentrais; um par de faixas escuras entre as cerdas supra-alares e as dorsocentrais interrompidas pela sutura transversal. Acrosticais em 8 fileiras regulares. Escutelo com uma mancha marrom cobrindo a superfície dorsal entre as cerdas escutelares, não tocando as basais e tocando as apicais. Cerdas escutelares basais convergentes. Pleura amarela. Cerdas proepisternais ausentes.

Halteres amarelos. Pernas amarelas, coxas anteriores podem apresentar manchas escuras.

Asas (Fig. 5) hialinas com veias castanhas. Dm-Cu levemente esfumada. Ápice da veia R₄₊₅ com mancha que pode atingir o ápice da veia M e o ápice da veia R₂₊₃. ¼ apical da célula R₂₊₃ manchada, se estendendo na célula R₄₊₅. Índice costal de 2,41 a 2,60.

Abdômen (Figs. 1 a 4). Tergito I amarelo. Tergitos II-III com faixas escuras posteriores, estendendo-se lateralmente mas não tocando suas margens laterais, interrompidas medianamente. Tergito IV-V marrons com duas manchas amarelas semicirculares anteriores e tocando o tergito anterior. Tergito VI marrom, podendo possuir duas manchas amarelas semelhantes às dos tergitos IV-V. Tergito VII marrom.

Genitália masculina (Figs. 8 e 9). Epândrio com 20 cerdas. Cercos microtricosos, não fusionados ao epândrio. Surstilo com 3-4 prenisetas proeminentes, e aproximadamente 10 prenisetas marginais; 5 cerdas marginais internas. Decarsternum não fusionado. Hipândrio com a metade do comprimento do edeago. Paráfises com três cerdas curtas. Gonópodes com uma cerda robusta. Aedeagus longo e tubular, com uma invaginação distal ventral; com duas fileiras de espinhos na sua ½ apical com disposição mediano-distal.

Genitália feminina (Figs. 10 e 11). Oviscapto alongado, com 8 cerdas apicais. Espermateca em formato umbrelar, esclerotizada, medianamente invaginada.

Indivíduos machos e fêmeas não apresentam dimorfismo sexual.

4 *Zygothrica vittimaculosa* Burla 1956: 227, 228, 280, 319.

Figs. 7-8; 10; 12. Tab. XX

Zygothrica vittimaculosa Burla 1956: 227, 228, 280, 319; Vilela, 1984: 64; Grimaldi, 1987: 124, 135, 150; Vilela e Pereira, 1992: 248, 249; Sepel et al., 2000: 48, 49, 56; Santos e Vilela, 2005: 547, 548, 549; Hochmüller et al., 2010: 290, 293; Poppe et al., 2013: 272, 273, 274, 275.

Material examinado. 03♂♂, etiquetados “Local de origem: Concórdia, Santa Catarina, Brasil. Data da coleta: Agosto/2011. Coletor: Francine de Ré”, n°s de identificação 199O, 199T e 199U. 02♂♂ “Local de Origem: Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Data da coleta: Outubro/2012. Coletor: Élgion Loreto”, n°s de identificação 261E e 261F; 03♀♀ “Concórdia, Santa Catarina, Brasil. Data da coleta: Agosto/2011. Coletor: Francine de Ré”, n°s de identificação 199X, 199Y e 199Z.

5 Distinção entre *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi* sp. n.

O padrão da morfologia externa e coloração de *Z. vittimaculosa* são idênticos aos de *Zygothrica* sp.1 sp. n. Entretanto, conseguimos distinguir os machos destas espécies pelo formato do aedeagus (Figs. 8), que é significativamente menor (aproximadamente 60%) e mais robusto em *Z. vittimaculosa* do que o de *Z. loretoi*. Os ornamentos espinhosos do aedeagus de *Z. vittimaculosa* também estão presentes na porção ventral da extremidade terminal, na qual é mais visível a diferença de espessura para com a metade proximal comparado à *Z. loretoi* sp. n., onde essa diferença é mais sutil. As fêmeas são facilmente distinguíveis quando levamos em consideração a espermoteca. Enquanto que em *Z. vittimaculosa* a

espermateca possui um engrossamento da parede externa circundante à abertura central, em *Z. loretoi* isso não é observado: nesta última espécie, a espermateca é perfeitamente umbreliforme e sem engrossamentos ou protuberâncias externas (Fig. 10). Além disso, o formato da asa é diagnóstico (Fonseca et al., em preparação). Em nenhuma das duas espécies foi encontrado dimorfismo sexual para coloração e/ou morfologia externa.

6 Conclusão

Com a descrição da nova espécie de *Zygothrica*, é possível reiterar a impossibilidade de distinção desta para com *Zygothrica vittimaculosa* através da morfologia externa, frente à semelhança nos padrões de coloração e às medidas taxonômicas. A cripticidade morfológica, aliada à divergência recente, e a ubíqua simpatria e sintopia apresentada por este par de espécies (Fonseca et al., em preparação) torna a diferenciação destas espécies um verdadeiro desafio. Demonstramos aqui, entretanto, que um caractere diagnóstico forte pode ser encontrado em nível de morfologia interna das genitálias, principalmente nas terminálias de indivíduos machos, padrão esse comum em drosofilídeos (Sturtevant 1921, Hsu 1949, Vilela and Bächli, 1990). Além disso, diferenças também podem ser observadas nas fêmeas em nível de espermateca. Estas características se somam à diferenciação molecular e a morfometria das asas (Fonseca et al., em preparação) no suporte ao acréscimo de uma nova espécie ao grupo *vittimaculosa* de *Zygothrica*.

7 Agradecimentos

Ou autores deste trabalho são gratos ao MSc João Junges pela ajuda nas coletas e identificações, à MSc Francine Cenzi de Ré pela ajuda nas coletas e à agência financiadora CAPES pelo apoio financeiro.

8 Referências

Bächli G. 2015. *TaxoDros, the Database on Taxonomy of Drosophilidae*, Versão 1.4.1 Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch/>

Bickford D. et al. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 148–155.

Bolzan AR. 2011. DNA barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Burla H. 1956. Die Drosophiliden-Gattung *Zygothrica* und ihre Beziehung zur *Drosophila*-Untergattung *Hirtodrosophila*. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin* **32**: 190-321.

Gottschalk MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* **4**: 485–518.

Grimaldi DA. 1987. Phylogenetics and Taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **186**: 103-268.

Hochmüller CJ, Da Silva ML, Valente VLS, Schmitz HJ. 2010. The Drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. *Papéis Avulsos de Zoologia* **50**: 285–295.

Hsu TC. 1949. The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to Systematics. *University of Texas Publications* **4920**: 80-142

Poppe JL, Valente VLS, Schmitz HJ. 2013. Population Dynamics of Drosophilids in the Pampa Biome in Response to Temperature. *Neotropical Entomology* **42**: 269-277.

Santos RCO, Vilela CR. 2005. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **49**: 544-551.

Sepel LMN, Golombiesky RN, Napp M, Loreto ELS. 2002. Seasonal fluctuation of *Drosophila cestri* and *Drosophila incompta*, two species of *flavopilosa* group. *Drosophila Information Service* **83**: 122-126.

Sturtevant AH. 1921. Genetic studies on *Drosophila simulans*. II. Sex-linked group of genes. *Genetics* **6**: 43--64.

Tidon R, Sene FM. 1988. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Information Service* **67**: 89.

Val FC, Marques MD, Vilela CR. 1981. Drosophilidae of neotropical region. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN, eds. *The genetics and biology of Drosophila*. Orlando, FL, Academic Press: 123–168.

Vilela CR, Pereira MAQR. 1992. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **36**: 475–482.

Vilela CR. 1984. Occurrence of the *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) in the state of São Paulo (Brazil) with description of one new species. *Revista Brasileira de Zoologia* **2**: 63-69.

Vilela CR and Bächli G. 1990. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt Schweiz Ent Ges* **63(suppl.)**:1-332.

9 Lista de Figuras

Figura 1: Hábito lateral do Holótipo de *Z. loretoi* sp. nov. Barra = 1mm.



Figura 2: Hábito lateral do parátipo fêmea 266E de *Z. loretoi* sp. nov. Barra = 1mm.



Figura 3: Vista dorsal da morfologia externa do Holótipo de *Z. loretoi* sp. nov. com foco no tórax. Barra = 1mm.



Figura 4: Vista dorsal da morfologia externa do (a) holótipo e (b) do parátipo fêmea 266D de *Z. loretoi* sp. nov. com foco no abdômen. Barra = 0,5mm.



Figura 5: Vista frontal da cabeça do holótipo de *Z. loretoi* sp. nov. Barra = 0,5mm.



Figura 6: Vista frontal da cabeça do parátipo macho 266A de *Z. loretoi* sp. nov. com destaque para as antenas e arista. Barra = 0,2mm.



Figura 7: Asa direita do holótipo de *Z. loretoi* sp. nov. Barra = 1mm.

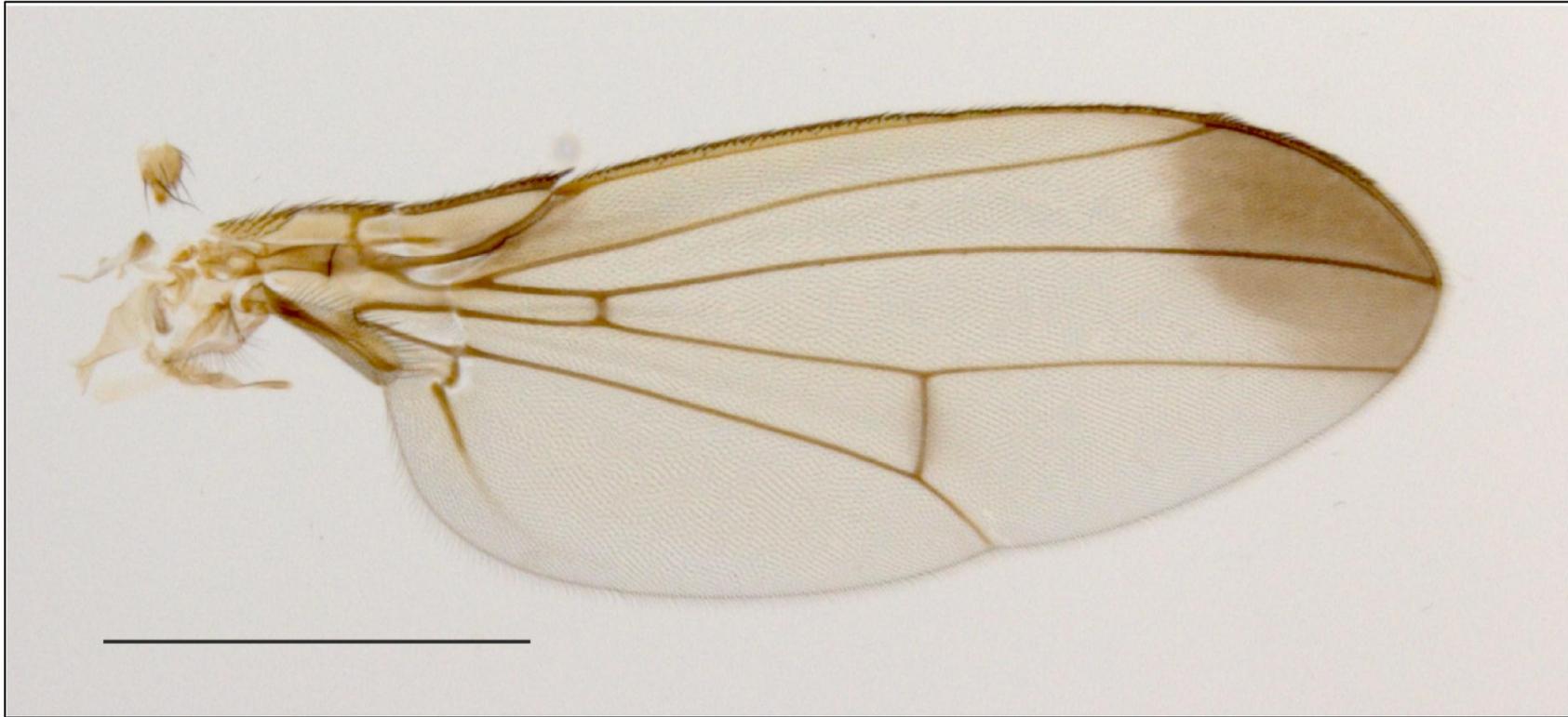


Figura 8: Prancha comparativa dos edeagus de *Z. loretoi* sp. nov. (a, b) e *Z. vittimaculosa* (c, d) em vista ventral (a, c) e lateral (b, d). Barra = 0,1mm.

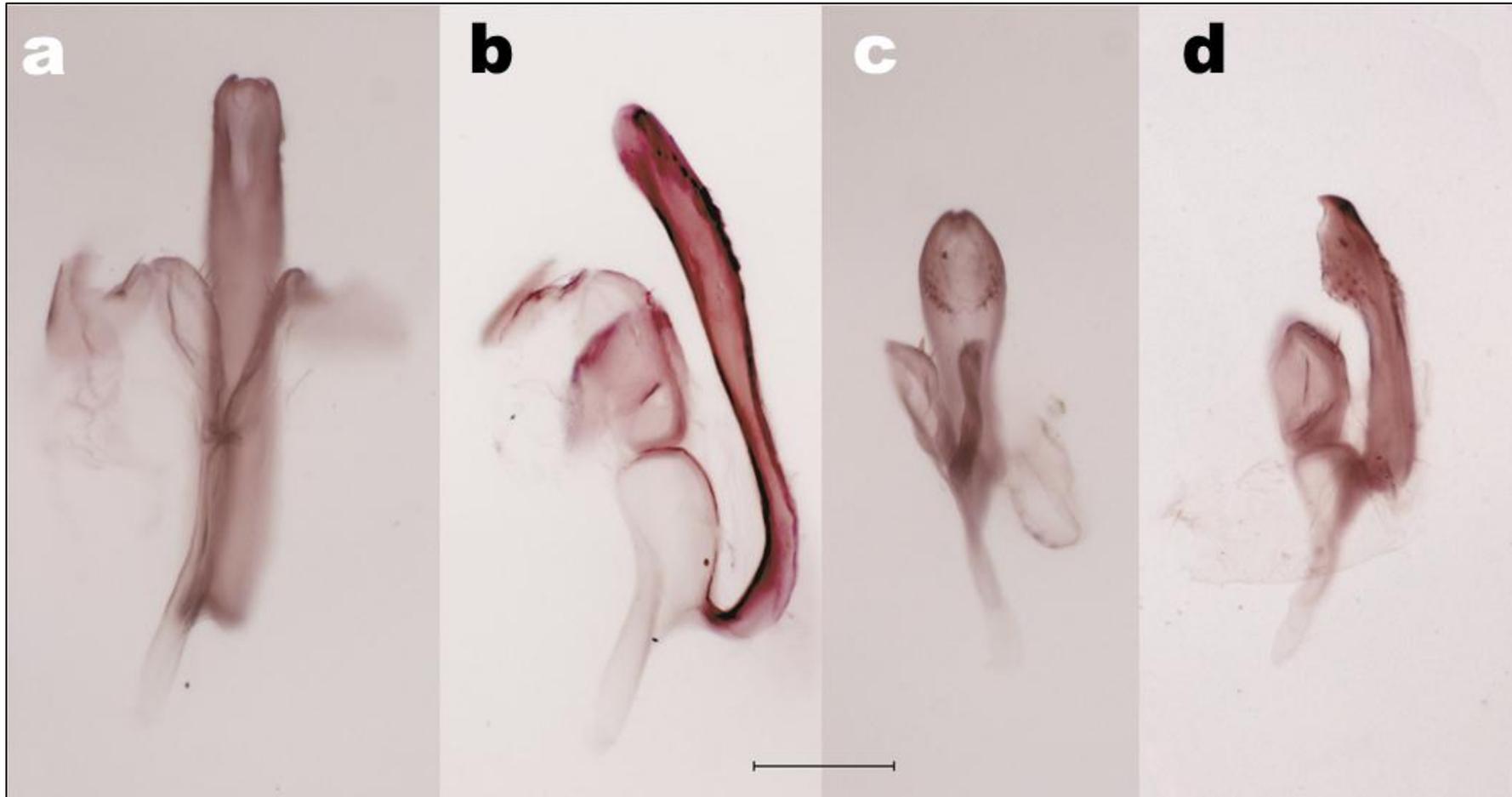


Figura 9: Prancha comparativa entre epândrios de (a) *Z. loretoi* sp. nov. (parátipo 267D) e (b) *Z. vittimaculosa*(indivíduo 261F). Barra = 0,1mm.



Figura 10: Prancha comparativa das espermatecas de (a) *Z. loretoi* sp. nov. (parátipo 266F) e (b) *Z. vittimaculosa* (indivíduo 199Y). Barra = 0,1mm

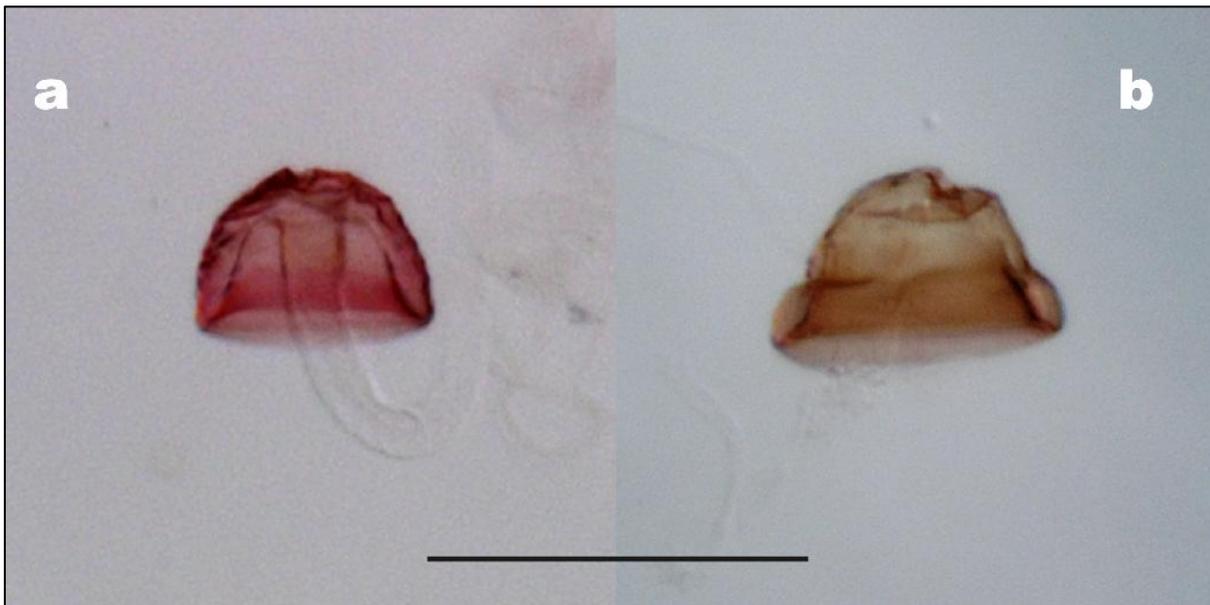


Figura 11: Ovipositor do parátipo 266E de *Z. loretoi* sp. nov. Barra = 0,1mm.



CAPÍTULO IV

**Filogeografia Comparativa de Duas Espécies Neotropicais de
Zygothrica Wiedemann, 1830 (Diptera: Drosophilidae)**

Resumo

Zygothrica vittimaculosa é uma espécie Neotropical que ocorre no Brasil em associação a três recursos diferentes: corpos de frutificação de fungos, frutas fermentadas e inflorescências de plantas do gênero *Cestrum* (Solanaceae). Sua recém-descrita espécie-irmã *Zygothrica loretoi* parece ser menos generalista, sendo coletada predominantemente em inflorescências de *Cestrum*. Estas duas espécies são externamente crípticas entre si, tendo divergido recentemente. Além disso, as duas são comumente encontradas em simpatria e sintopia. Neste trabalho realizamos um estudo filogeográfico comparativo entre as duas espécies através da análise de dois marcadores mitocondriais, COI (citocromo oxidase c subunidade I) e COII (citocromo oxidase c subunidade II), a fim de auxiliar na compreensão de sua história evolutiva. Também foi feita uma modelagem de nicho, a fim de estimar suas distribuições potenciais no presente e no Último Máximo Glacial (final do Pleistoceno). A modelagem evidencia que nossa amostragem abrangeu toda a suposta área de distribuição de ambas as espécies, e confirma a existência de uma sobreposição de nicho entre as espécies. As análises moleculares evidenciam a presença de padrões evolutivos contrastantes para o par de espécies-irmãs, com *Z. vittimaculosa* mais diversa e estruturada que *Z. loretoi*. Além disso, ambas as espécies apresentam sinais de expansão populacional, embora este evento pareça ser muito mais recente em *Z. loretoi*. Estes padrões distintos permitem sugerir a independência entre os processos evolutivos associados à diversificação de ambas as espécies, levando a proposição de uma origem em alopatria.

Palavras-chave: COI. COII. Especiação. Filogeografia Comparativa. Região neotropical.

1 Introdução

Vários recentes trabalhos (Peterson e Nyári, 2008; Thum e Harrison, 2009; Morgan et al., 2011; Magalhães et al., 2014) têm estudado os efeitos genéticos das glaciações do Pleistoceno em diferentes espécies de locais de clima temperado. Todavia, poucos estudos foram feitos sobre os efeitos destas oscilações na diversificação de espécies Neotropicais. Evidências coletadas até o momento sugerem que a região Neotropical, mais biodiversa (Amorim e Pires, 1996), sofreu menos com as glaciações (Fraser et al., 2011), já que diferentemente do que ocorreu no Hemisfério Norte, o Pleistoceno no Hemisfério Sul parece ter sido marcado pela ocorrência de uma alternância entre períodos secos e úmidos, sem a ocorrência de ciclos de expansão/retração de geleiras (Haffer, 1997).

Uma das teorias mais aceitas para a diversificação de espécies na região Neotropical é a teoria dos refúgios do Pleistoceno (Haffer, 1969), segundo a qual refúgios seriam capazes de permitir a sobrevivência de espécies ou populações em alopatria durante períodos de climas desfavoráveis. Com isso, acredita-se que essas áreas tendem a apresentar uma diversidade genética maior do que suas áreas vizinhas (Bennet e Provan, 2008; Hewitt, 1996 e 2000). Entretanto, estimativas de eventos de diversificação macroevolutiva na região Neotropical indicam que linhagens têm se originado constantemente desde o Eoceno tardio até o Pleistoceno (Rull, 2008). Em nível microevolutivo, as evidências são mais escassas e controversas, e diferentes espécies sul-americanas parecem ter experimentado diferentes efeitos dos ciclos glaciais (Turchetto-Zollet et al., 2013).

Embora a família Drosophilidae tenha surgido no Velho Mundo (Throckmorton, 1975), evidências apontam que o gênero *Zygothrica* teve sua origem

na região Neotropical (Pringent e Toda, 2009). Este gênero compreende atualmente 124 espécies descritas (Bächli, 2015), a maioria das quais é nativa dos neotrópicos (Pringent e Toda, 2009). Embora até o momento 54 espécies de *Zygothrica* tenham sido descritas para o Brasil (Gottschalk et al., 2008), este número parece ser muito maior (Machado et al., em preparação).

Zygothrica vittimaculosa foi descrita por Burla (1956) e parece ser bastante generalista em termos de utilização de recursos, tendo sido encontrada em associação a três substratos diferentes ao longo do sul e do sudeste do Brasil: corpos de frutificação de fungos (Burla, 1956; Bolzan, 2011); iscas de banana fermentada (Gottschalk et al., 2008; Hochmüller et al., 2010; Poppe et al., 2013); e, principalmente em flores do gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) (Vilela, 1984; Grimaldi, 1987; Vilela e Pereira, 1992; Sepel et al., 2002; Santos e Vilela, 2005). *Zygothrica loretoi* constitui a espécie irmã críptica de *Z. vittimaculosa* (Fonseca et al., em preparação), e embora ambas as espécies sejam comumente encontradas em simpatria, a última parece ser mais especializada ecologicamente (Fonseca et al., em preparação). A frequente simpatria e sintopia apresentada por este par de espécies, e suas peculiaridades ecológicas torna o estudo comparativo dos padrões e processos associados à sua evolução especialmente desafiador e interessante, ao levantar questões relacionadas ao seu modo de especiação e ao tipo de impacto que efeitos históricos e/ou recorrentes apresentaram em suas populações. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar os padrões evolutivos apresentados por diferentes populações de *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi*, através de análises filogenéticas e filogeográficas de dois marcadores mitocondriais (Citocromo C Oxidase Sub-unidade I – COI e Citocromo C Oxidase Sub-unidade II – COII).

2 Material e Métodos

2.1 Coletas

As coletas foram realizadas ao longo das regiões sul e sudeste do Brasil, contemplando os três substratos onde *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi* já foram amostradas (Fonseca et al., em preparação: Tabela 1). Para amostrar indivíduos através de iscas de banana, armadilhas contendo a fruta fermentada (Tidon e Sene, 1998) foram suspensas a cerca de 1,5 m de altura em fragmentos de mata nativa ou bosques. Em muitos destes locais, mas principalmente em áreas de sucessão secundária, inflorescências de *Cestrum* também foram coletadas e levadas para o laboratório, onde foram acondicionadas até a eclosão das moscas adultas. Por fim, para contemplar o terceiro recurso usado por ambas as espécies de *Zygothrica*, indivíduos encontrados pousados ou sobrevoando corpos de frutificação de fungos foram sugados com a ajuda de um aspirador entomológico adaptado (Machado et al., 2014). Após a eclosão ou captura, os indivíduos foram conservados em etanol absoluto P.A. e mantidos sob refrigeração.

2.2 Triagem

A triagem inicial dos indivíduos foi feita de acordo com os padrões de morfologia externa descritos para *Z. vittimaculosa* (Burla, 1956; Grimaldi, 1987). Os indivíduos do sexo masculino assim obtidos foram adequadamente separados nas espécies de interesse através de análise da morfologia interna das genitálias (Fonseca et al., em preparação).

2.3 Modelagem de nicho e testes de identidade

As coordenadas geográficas dos pontos de amostragem de *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi* (Fonseca et al., em preparação: Tabela 1) foram utilizadas na construção de modelos de distribuição potencial através do método de máxima entropia executado no MAXENT (Philips et al, 2006). As projeções foram construídas para o presente e para o último máximo glacial [cerca de 20.000 a 18.000 anos atrás (Ledru, et al 1998a)] com base na utilização de oito das 19 variáveis climáticas disponíveis no banco de dados WORLDCLIM 1.4 (Hijmans et al, 2005b), conforme seleção descrita em Cenzi de Ré et al. (2014), com uma resolução de 2,5 minutos. O modelo final para cada espécie foi construído de acordo com a média dos resultados obtidos através de 25 réplicas de bootstrap, em cada uma das quais 25% dos registros eram utilizados como teste. Os valores de AUC (Area Under the Receiving Operating Curve) ao longo destas réplicas foram utilizados para avaliar o desempenho dos modelos.

Duas medidas de sobreposição de nicho abiótico entre *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi* foram estimadas no programa ENMTools 1.3 (Warren, 2013) a partir dos modelos de distribuição potencial gerados no MAXENT: o teste D de Schoener e uma modificação do teste de Hellinger. A significância destas medidas foi avaliada através do teste de identidade realizado no mesmo programa, com 200 pseudo-réplicas. Este teste avalia se os valores observados de sobreposição de nicho são significativamente diferentes daqueles gerados sob a hipótese nula, de equivalência de nicho entre o par de espécies (Warren et al., 2008 e 2010).

2.4 Extração e Manipulação do DNA

O DNA total de cada espécime identificado foi extraído através do protocolo descrito por Sassy et al. (2005), com algumas adaptações. Fragmentos dos genes mitocondriais COI e COII foram então obtidos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o uso dos seguintes pares de *primers*: (a) TYJ1460 (5'-TAC AAT CTA TCG CCT AAA CTT CAG CC -3') e C1N2329 (5'-ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CAT ACA-3') (Simon et al., 1994) para o gene COI; e (b) TL2J3037 (5'-ATG GCA GAT TAG TGC AAT GG-3') e TKN3785 (5'-GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG-3') (Simon et al., 1994) para COII. As reações de PCR para ambos os marcadores foram realizadas em um volume total de 25µl, contendo 2,5µl de tampão de reação, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 30 pmol de cada *primer*, 1U da enzima Taq DNA Polymerase (todos os reagentes da Invitrogen), e aproximadamente 15ng de DNA. Os parâmetros de amplificação dos genes mitocondriais COI e COII foram os seguintes, respectivamente: (i) uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 35s a 95 °C, anelamento por 35s a 58 °C, e extensão por 75s a 72 °C, seguidos de uma etapa final de extensão de 7 minutos à 72 °C. e (ii) desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 30s a 95 °C, anelamento por 30s a 56 °C, e extensão por 50 s a 72 °C, e extensão final à 72 °C por 7 min. As amplificações foram checadas em gel de agarose a 0,8% e os amplicons obtidos foram purificados com uma solução de PEG 13% e NaCl 1,6M. Após a purificação, estes foram diretamente sequenciados em um sequenciador MegaBACE 500, usando o kit DYEnamic ET® (Amersham) e cada um dos primers citados acima.

2.5 Análises moleculares

Os eletroferogramas obtidos foram checados e corrigidos através do programa Gap 4 do pacote Staden (Staden, 1996). Os contigs de COI e COII foram então alinhados usando o algoritmo ClustalW no programa Mega 5.10 (Tamura et al., 2012). Para as análises moleculares, foram usadas 145 sequências dos gene COI (95 sequências de *Z. vittimaculosa* e 50 de *Z. loretoi*) e 92 sequências do gene COII (48 sequências de *Z. vittimaculosa* e 44 de *Z. loretoi*). As análises foram conduzidas independentemente para COI, COII e para o conjunto de dados concatenados.

As estimativas do número de haplótipos e de sítios polimórficos, e dos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram obtidas no programa DNAsp5 (Librado e Rozas, 2009), que também foi empregado na realização das análises de *Mismatch Distribution*. Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997) foram realizados no programa Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier, 2015). Neste programa, também foram estimados os níveis de diferenciação entre as populações de cada espécie através de FST e da Análise de Variância Molecular (AMOVA) com 1000 e 10000 permutações respectivamente.

As relações entre os haplótipos das duas espécies e de populações da mesma espécie foram inferidas no programa NetWork (Bandelt et al., 1999) por *median-joining*. Além disso, uma árvore filogenética foi construída para cada uma das matrizes segundo o algoritmo de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1997) no programa Mega 5.10 (Tamura et al., 2012).

3 Resultados

3.1 Coletas e Modelagens

Os modelos de adequabilidade ambiental gerados para *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi* indicam que ambas espécies apresentam padrões de distribuição potencial restritos, basicamente, à área amostrada neste estudo (Figura 1 – A e C). Entretanto, ainda que padrões de simpatria tenham sido sugeridos para a maior parte da região sul do Brasil e para o Uruguai, tanto no presente quanto no último máximo glacial (UMG), *Z. loretoi* apresenta uma área de alta adequabilidade situada no norte do Peru e no oeste do Chile, que não foram recuperadas para *Z. vittimaculosa*.

Os valores de sobreposição de nicho recuperados nos testes D e I (0,57 e 0,81, respectivamente) também sugerem que as preferências climáticas de ambas as espécies são similares. De fato, os testes de identidade confirmam que a sobreposição entre os modelos de distribuição potencial gerados com os dados empíricos caem dentro da distribuição nula, gerada quando os dados de presença das duas espécies são misturados e redistribuídos aleatoriamente em novas amostras, com o mesmo número de registros dos dados empíricos (Figura 2).

3.2 Análises Moleculares

No total, foram obtidas 145 sequências do marcador COI (95 de *Z. vittimaculosa* e 50 de *Z. loretoi*), e essas variaram entre 120 e 733 pares de base (pb). Para o gene COII, 92 sequências com extensão entre 154 e 625 pb foram geradas (47 e 45 de *Z. vittimaculosa* e da espécie nova, respectivamente). Com isso,

foi possível reconstituir um total de 86 sequências concatenadas, 45 de *Z. vittimaculosa* e 41 de *Z. loretoi*.

3.3 Parâmetros populacionais

Os índices de diversidade mostram que *Z. vittimaculosa* é geneticamente mais diversa que *Z. loretoi*, apresentando valores superiores para todas as estimativas consideradas [número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica ($\pi\%$)] (Tabela 1). Com relação ao número de haplótipos, por exemplo, *Z. vittimaculosa* apresentou valores de 21, 25 e 33, para COI, COII e ambos os genes concatenados, respectivamente; em *Z. loretoi*, estes valores ficaram em 3, 8 e 7, respectivamente. Uma discrepância similar também foi observada com relação ao número de sítios segregantes, que variou entre 18 e 44 para *Z. vittimaculosa* e entre 8 e 10 em *Z. loretoi*. A grande diferença nesses dados reflete nos resultados dos índices de diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica ($\pi\%$), que foram pelo menos 3 vezes superiores em *Z. vittimaculosa*. Num comparativo entre os dois genes, COII apresentou-se sempre mais variável que COI, num padrão que se manteve para ambas as espécies, ainda que aquele marcador tenha apresentado amostragens reduzidas com relação a este (Tabela 1). De fato, nem todos os indivíduos de que obtivemos sequência de um gene tiveram o outro marcador também sequenciado. Isso provavelmente explica o fato de que o gene COII de *Z. loretoi* tenha apresentado índices maiores do que os dados concatenados da mesma espécie, já que esses últimos sempre terão um N menor que os marcadores analisados separadamente.

Com relação aos testes de Neutralidade, resultados negativos estatisticamente significativos foram encontrados para o D e o F de Fu e Li (Tabela 1)

em ambas as espécies e para ambos os marcadores, sugerindo que tanto *Z. vittimaculosa* quanto *Z. loretoi* podem ter passado por um recente período de expansão populacional. Entretanto, embora resultados negativos e significativos tenham sido encontrados pelo teste D de Tajima para ambos os marcadores de *Z. vittimaculosa*, não houve significância no resultado deste teste para o marcador COI da espécie nova (Tabela 1), um resultado possivelmente relacionado ao reduzido número de haplótipos deste marcador nesta espécie.

Outro dado sugestivo de que *Z. loretoi* teve uma expansão muito recente, ou mesmo de que esta esteja em expansão foi a análise de *Mismatch Distribution*, em que, para ambos os genes, a curva observada sobrepõem-se com a curva esperada em distribuição unimodal (Figura 3 - A e B). Contudo, para *Z. vittimaculosa*, embora o gráfico de *Mismatch Distribution* para COI tenha apresentado uma distribuição unimodal para a curva observada, a mesma parece refletir uma expansão não tão recente quanto à de *Z. loretoi*. Já para o marcador COII, *Z. vittimaculosa* apresentou uma curva bimodal/multimodal, apresentando maiores indícios de estruturação entre populações.

3.4 Relações entre haplótipos

A relação entre os haplótipos encontrados nas diferentes populações de ambas as espécies para ambos os marcadores, e sua distribuição espacial, pode ser observada na Figura 3. Embora em todos os casos um padrão *starlike* possa ser evidenciado tanto para *Z. vittimaculosa* quanto para *Z. loretoi*, é notável a diferença dos padrões encontrados para as duas espécies, que se diferenciam em dois haplogrupos independentes separados por 14, 15 e 35 passos mutacionais para COI, COII e para os dados concatenados, respectivamente. Em *Z. loretoi*, nos três

casos, um haplótipo dominante com mais de 80% das sequências e espalhado geograficamente é encontrado, com os demais haplótipos sendo, em sua maioria, exclusivos de determinadas populações. Já em *Z. vittimaculosa*, a dominância de um dos haplotipos não é tão clara, e grande parte dos haplotipos é espalhada geograficamente. Já em *Z. vittimaculosa* não há uma dominância clara de um haplótipos, e sim, um número muito grande de haplótipos,

Assim, dentre os 21 haplótipos de COI encontrados em *Z. vittimaculosa*, o mais frequente (Haplótipo 2 – H2) teve representantes de populações de 16 localidades diferentes, inclusive a mais austral (Rio Grande - RS) e a mais setentrional (Itatiaia – RJ), sendo encontrado em um total de 45 indivíduos (47% da amostra) (Figura 4). Entre os haplótipos restantes, 10 são exclusivos de um único indivíduo. Um padrão similar é observado para o gene COII da mesma espécie, onde, dos 25 haplótipos amostrados, o mais frequente (Haplótipo 4 – H4) teve 17 representantes (36% da amostra), e estes foram encontrados em 12 localidades diferentes (Figura 4). Neste caso, 12 haplótipos foram exclusivamente encontrados em um único indivíduo.

Para *Z. loretoi*, por outro lado, apenas um haplótipos de COI foi amostrado, tendo 100% (Figura 4). Este padrão é similar ao encontrado para a mesma espécie para o gene COII, onde dos oito haplótipos, o mais frequente foi encontrado em 38 dos 45 indivíduos amostrados (84% da amostra), e os sete haplótipos restantes foram exclusivos (Figura 4).

A árvore filogenética gerada através do algoritmo de *Neighbor Joining* (Figura 5) apresenta, em geral, o mesmo padrão da rede de haplótipos, com ambas espécies reciprocamente monofiléticas. Neste caso, ambas espécies apresentam, basicamente, uma politomia basal nas árvores reconstruídas com as três matrizes,

embora níveis um pouco maiores de estruturação tenham sido recuperados para *Z. vittimaculosa* (Figura 5).

3.5 Estruturação entre populações

Os resultados dos índices de diferenciação entre as populações (F_{st}) para *Z. loretoi* (Tabela 2) com ambos os marcadores não demonstraram nenhum sinal de estruturação. Todavia, para *Z. vittimaculosa*, tanto para o gene COI quanto para o gene COII, os valores de F_{st} mostraram indicativos de diferenciação genética pronunciada entre algumas populações, especialmente quando no pareamento estão umas das populações de Agudo/RS (população 2) e/ou São Sepé/RS (população 3) (Tabelas 3 e 4).

Conforme esperado, as análises de Variância Molecular (ANOVA) realizadas com os dados de COI e de COII para *Z. loretoi* revelam que a maior parte da diferenciação ocorre dentro das populações (109.89% e 101.55%, respectivamente) (Tabela 5). Para *Z. vittimaculosa*, um componente mais significativo da variação foi encontrado entre populações (19,6% e 0.46% para COI e COII, respectivamente), embora, novamente, a variação genética não pôde ser explicada pela diferença entre as populações de diferentes biomas (Mata Atlântica e Pampa) (Tabela 6).

4 Discussão

Z. vittimaculosa e *Z. loretoi* constituem espécies irmãs de morfologia externa críptica (Fonseca et al., em preparação) e distribuição predominantemente simpátrica. Portanto, as evidências aqui apresentadas de que ambas compartilham nicho abiótico somadas às evidências empíricas de compartilhamento de nicho

biótico (Fonseca et al., em preparação), levantam dúvidas importantes quanto aos mecanismos associados à sua especiação. Entretanto, os padrões microevolutivos contrastantes recuperados em nossas análises parecem ser um reflexo da independência entre os eventos associados à origem e diversificação inicial de *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi*, o que pode ser tomado como um indicativo importante de especiação alopátrica.

Assim, as duas espécies diferiram marcadamente nos níveis de diversidade e estruturação, e embora ambas tenham apresentado sinais sugestivos de expansão populacional, a expansão de *Z. loretoi* para a área amostrada parece ter sido muito mais recente. A interpretação destes dados frente aos resultados obtidos através de modelagem de nicho permite levantar a hipótese de que *Z. loretoi* tenha migrado recentemente para a região sul do Brasil, a partir de populações que habitavam áreas mais a oeste na América Latina. Neste caso, existe a possibilidade de que ambas as espécies tenham apresentado refúgios populacionais distintos no período Pleistoceno, com áreas situadas dentro da região amostrada servindo como refúgio para *Z. vittimaculosa*, mas não para *Z. loretoi*. Isto explicaria os maiores níveis de diversidade e estruturação encontrados para a primeira, cujas populações habitariam a região sul do Brasil há mais tempo. Um análise de Relógio molecular relaxado datou a separação dessas espécies para 3,4 milhões de anos, no Plioceno, portanto, logo antes do pleistoceno e das glaciações (Machado et al., em preparação).

Alternativamente, os padrões evolutivos contrastantes também podem estar associados às diferenças ecológicas de amplitude de nicho apresentadas pelas duas espécies. De fato, enquanto *Z. vittimaculosa* é bem amostrada em fungos, iscas de banana fermentada e em inflorescências de *Cestrum*, *Z. loretoi* parece estar mais restrita ao último recurso mencionado. Diferenças entre padrões para espécies

generalistas e especialistas são esperados, já tendo sido encontrados em outras espécies de Drosophilidae (Gilchrist, 1995; Kellermann et al., 2012a). Entretanto, neste caso, o esperado seria o contrário do observado, já que espécies mais generalistas seriam menos propensas à diferenciação entre populações do que espécies mais especialistas.

5 Agradecimentos

Os autores são gratos aos mestres João Junges e Stela Machado pelas ajudas nas coletas. Também gostaríamos de agradecer ao técnico Ronaldo Golombieski pela ajuda com o sequenciamento e em especial à mestre Francine Cenzi de Ré pela imensa ajuda nas coletas e análises. Também agradecemos o apoio financeiro das agências fomentadoras brasileiras CNPq e CAPES.

6 Referências Bibliográficas

Amorin DS & Pires MRS. 1996. Neotropical biogeography and method for maximum biodiversity estimation. In: C. E. M. Bicudo & N. A. Menezes (eds.), Biodiversity in Brazil, a first approach, CNPq, São Paulo.

Bandlet, H et al. 1999. A. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37-48,

Bennett KD & Provan J. 2008. What do we mean by 'refugia'? *Quaternary Science Reviews*. **27**: 2449–2455.

Bolzan AR. 2011. DNA barcode de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Burla H. 1956. Die Drosophiliden-Gattung *Zygothrica* und ihre Beziehung zur Drosophila-Untergattung *Hirtodrosophila*. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin* **32**: 190-321.

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

Fraser et al. 2011. Systematic detection of polygenic cis-regulatory evolution. *PLoS Genet.* **7**: e1002023

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

Gilchrist GW. 1995. Specialist and generalist in changing environments. Fitness landscapes of thermal sensitivity. *Am. Nat.* **146**: 252 - 270

Gottschalk MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* **4**: 485–518.

Grimaldi DA. 1987. Phylogenetics and Taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **186**: 103-268.

Haffer J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.

Haffer J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodivers. Conserv.* **6**: 451–476.

Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**: 247–276.

Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature.* **405**: 907–913.

Hijmans RJ et al. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* **25**: 1965–1978.

Hochmüller CJ et al. 2010. The Drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. *Papéis Avulsos de Zoologia* **50**: 285–295.

Kellermann V et al. 2012. Phylogenetic constraints in key functional traits behind species' climate niches: patterns of desiccation and cold resistance across 95 *Drosophila* species. *Evolution.* **66**: 3377 – 3389.

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

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

Machado S, dos Santos JPJ, Robe LJ, Loreto ELS. 2014. An efficient and cheap entomological aspirator to collect mycophilic and anthophilic adult Drosophilidae flies. *Drosophila Information Service* **97**: 169-171

Magalhaes ILF et al. 2014. Strong spatial structure, Pliocene diversification and cryptic diversity in the Neotropical dry forest spider *Sicarius cariri*. *Mol. Ecol.* **23**: 5323–5336

- Morgan K. 2011.** Comparative phylogeography reveals a shared impact of pleistocene environmental change in shaping genetic diversity within nine anopheles mosquito species across the Indo-Burma biodiversity hotspot. *Mol Ecol.* **20:** 4533–4549.
- Peterson AT & Nyari AS. 2008.** Ecological niche conservatism and pleistocene refugia in the thrush-like mourner, *Schiffornis* sp., in the neotropics. *Evolution.* **62:** 173–183.
- Phillips SJ et al. 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modeling.* **190:** 231 – 259.
- Poppe JL, Valente VLS, Schmitz HJ. 2013.** Population Dynamics of Drosophilids in the Pampa Biome in Response to Temperature. *Neotropical Entomology* **42:** 269-277.
- Pringent SR & Toda MJ. 2009.** The spread of the *Zygothrica samoensis* group (Drosophilidae, Diptera) over the Pacific. *Proc. of the 11th Pacific Science Intercongress.*
- Rull V. 2008.** Speciation timing and Neotropical biodiversity: the Tertiary - Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology.* **17:** 2722 – 2729.
- Saitou N & Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution.* **4:** 406 – 425.
- Santos RCO & Vilela CR. 2005.** Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **49:** 544-551.

Sassi AK, Heredia F, Loreto ELS, Valente VLS, Rohde C. 2005. Transposable elements P and gypsy in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics and Molecular Biology* **28**: 734–739.

Sepel LMN, Golombiesky RN, Napp M, Loreto ELS. 2002. Seasonal fluctuation of *Drosophila cestri* and *Drosophila imcompta*, two species of *flavopilosa* group. *Drosophila Information Service* **83**: 122-126.

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

Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* **5**: 233-241.

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

Tamura K et al. 2012. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2012.

Throckmorton LH. 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: Handbook of Genetics. King RC, ed, pp 421-469. Plenum, New York.

Thum RA & Harrison RG. 2009. Deep genetic divergences among morphologically similar and parapatric *Skistodiaptomus* (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) challenge the hypothesis of Pleistocene speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. **96**: 150 – 165.

Tidon R, Sene FM. 1988. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Information Service* **67**: 89.

Turchetto-Zolet AC et al. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, **22**, 1193–1213.

Vilela CR, Pereira MAQR. 1992. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **36**: 475–482.

Vilela CR. 1984. Occurrence of the *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) in the state of São Paulo (Brazil) with description of one new species. *Revista Brasileira de Zoologia* **2**: 63-69.

Warren DL et al. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. **62**: 2868–2883.

Warren DL et al. 2010. ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*. **33**: 607-611.

7 Figuras e Tabelas

Figura 1: Modelagens de distribuição populacional atual (B e D) e simulação da distribuição no UMG para (A e C) para *Z. loretoi* (A e B) e *Z. vittimaculosa* (C e D).

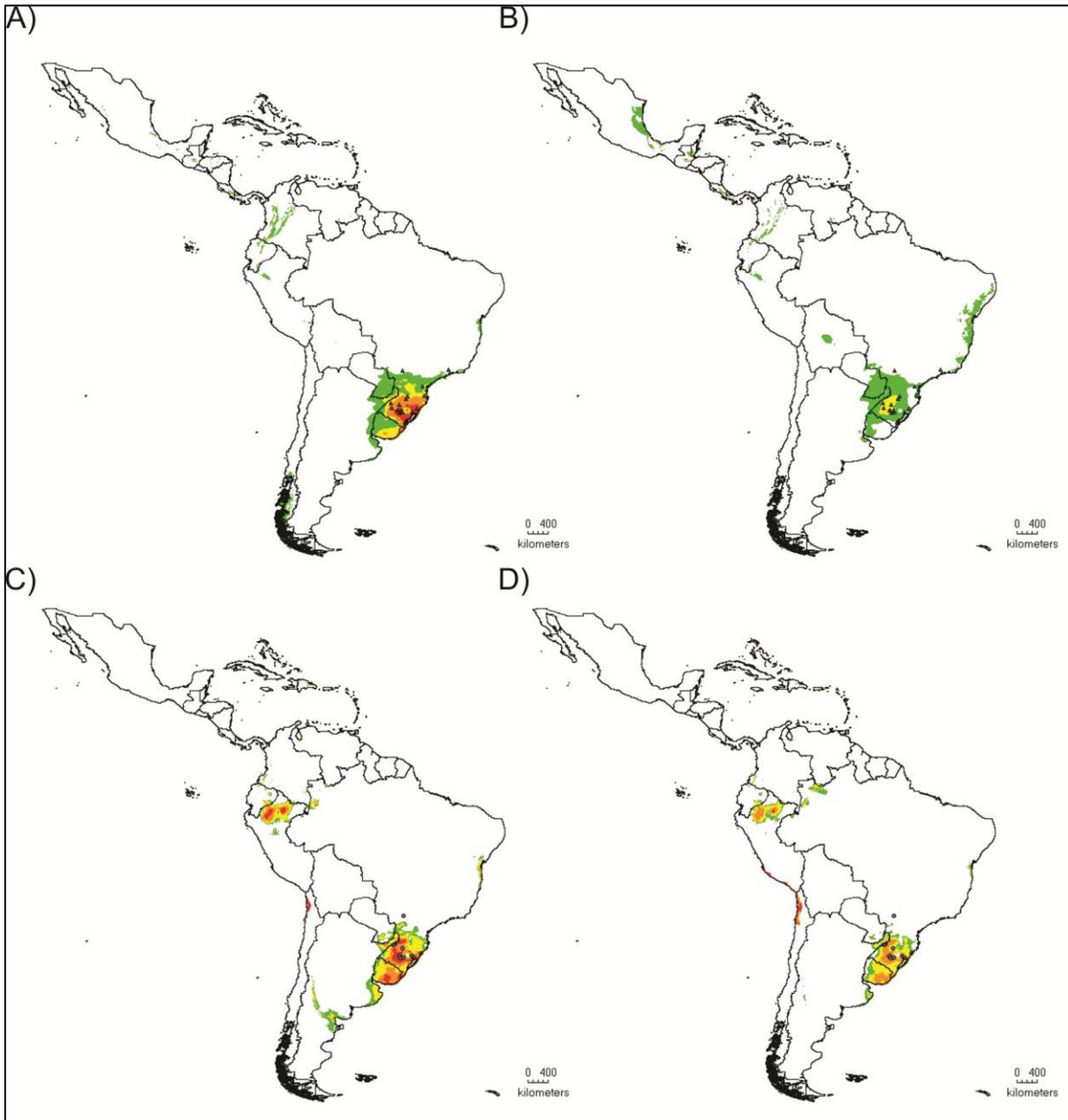


Figura 2: Gráfico do teste de identidade de sobreposição de nicho abiótico de *Z. loretoi* e *Z. vittimaculosa*.

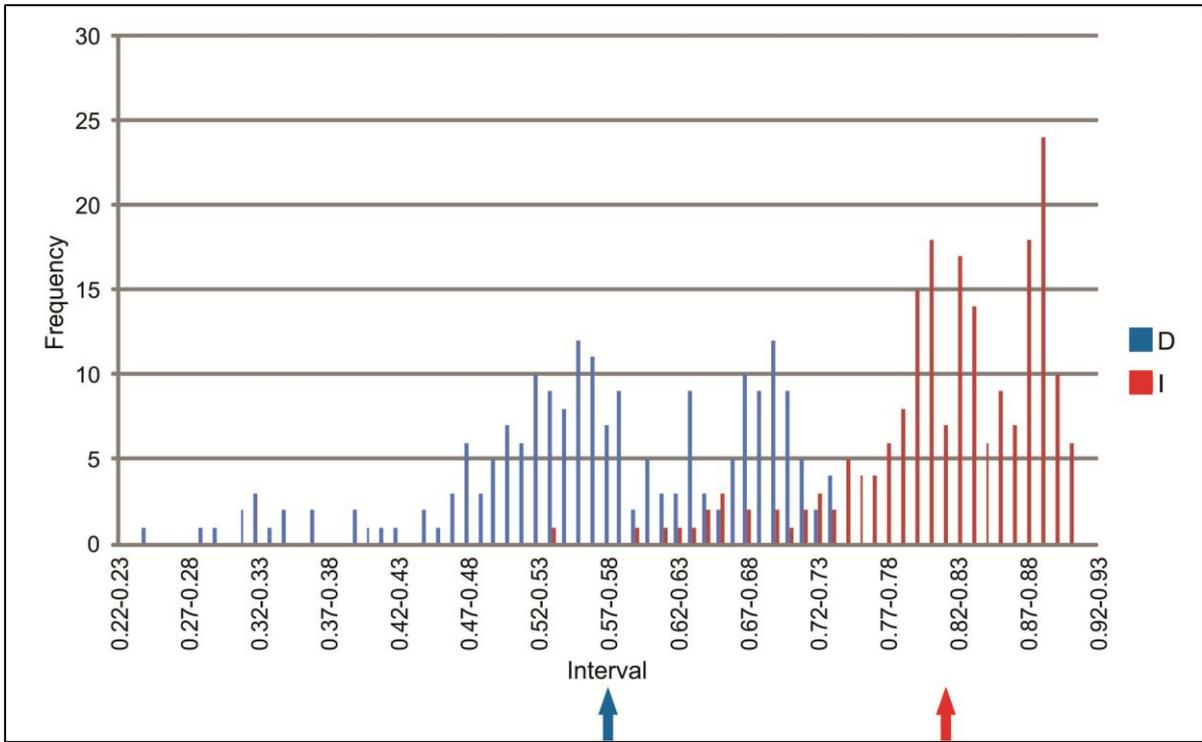


Figura 3: Gráficos de *Mismatch Distribution* para dos genes COI (A e C) e COII (B e D) para *Z. loretoi* (A e B) e *Z. vittimaculosa* (C e D).

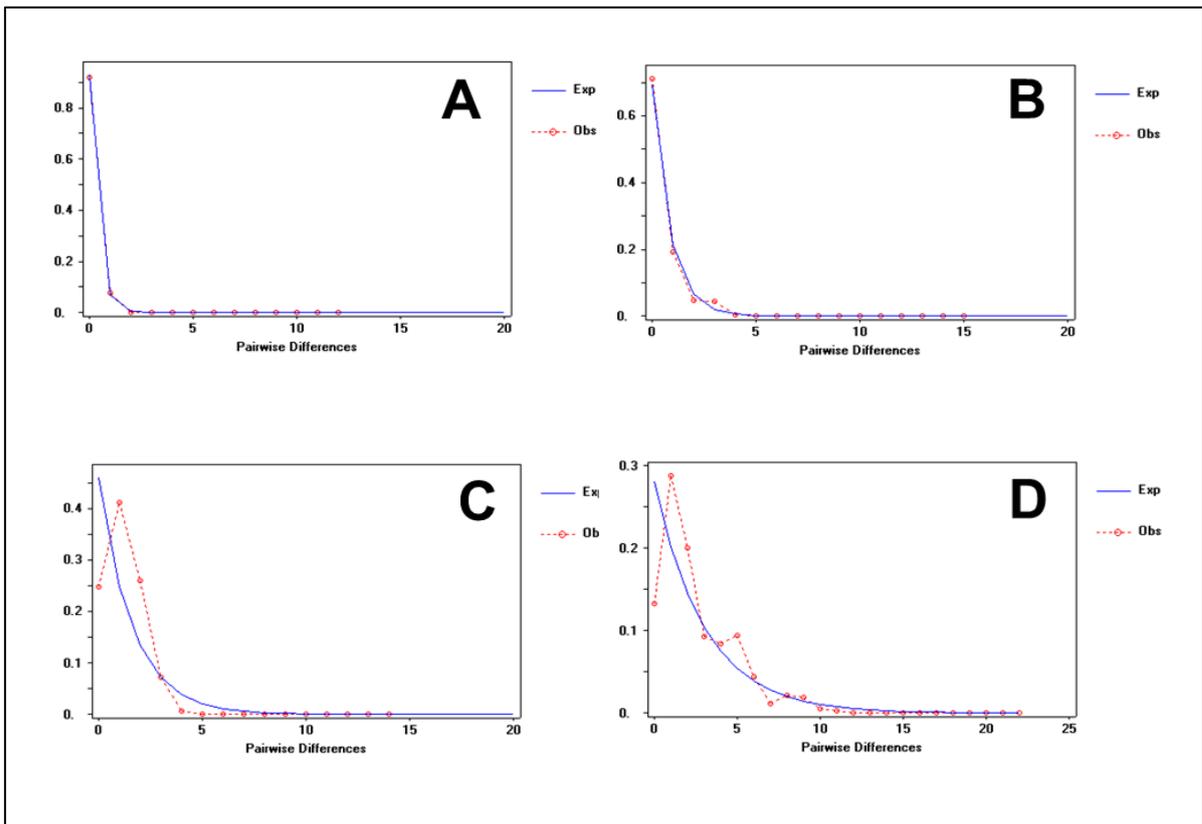


Figura 4: Median-Joining NetWork dos haplótipos de *Z. vittimaculosa* e *Z. loretoi* para (A) gene COI, (B) gene COII e (C) ambos os genes concatenados. Nos NetWorks A e B, as cores representam os locais amostrados (vide legenda na figura). No NetWork C, as cores indicam o número de espécimes sequenciados com cada haplótipos Os números nos parênteses representam a quantidade de mutações entre os haplogrupos. Em A e B, Haplogrupo superior = *Z. vittimaculosa*. Em C, Haplogrupo superior = *Z. loretoi*.

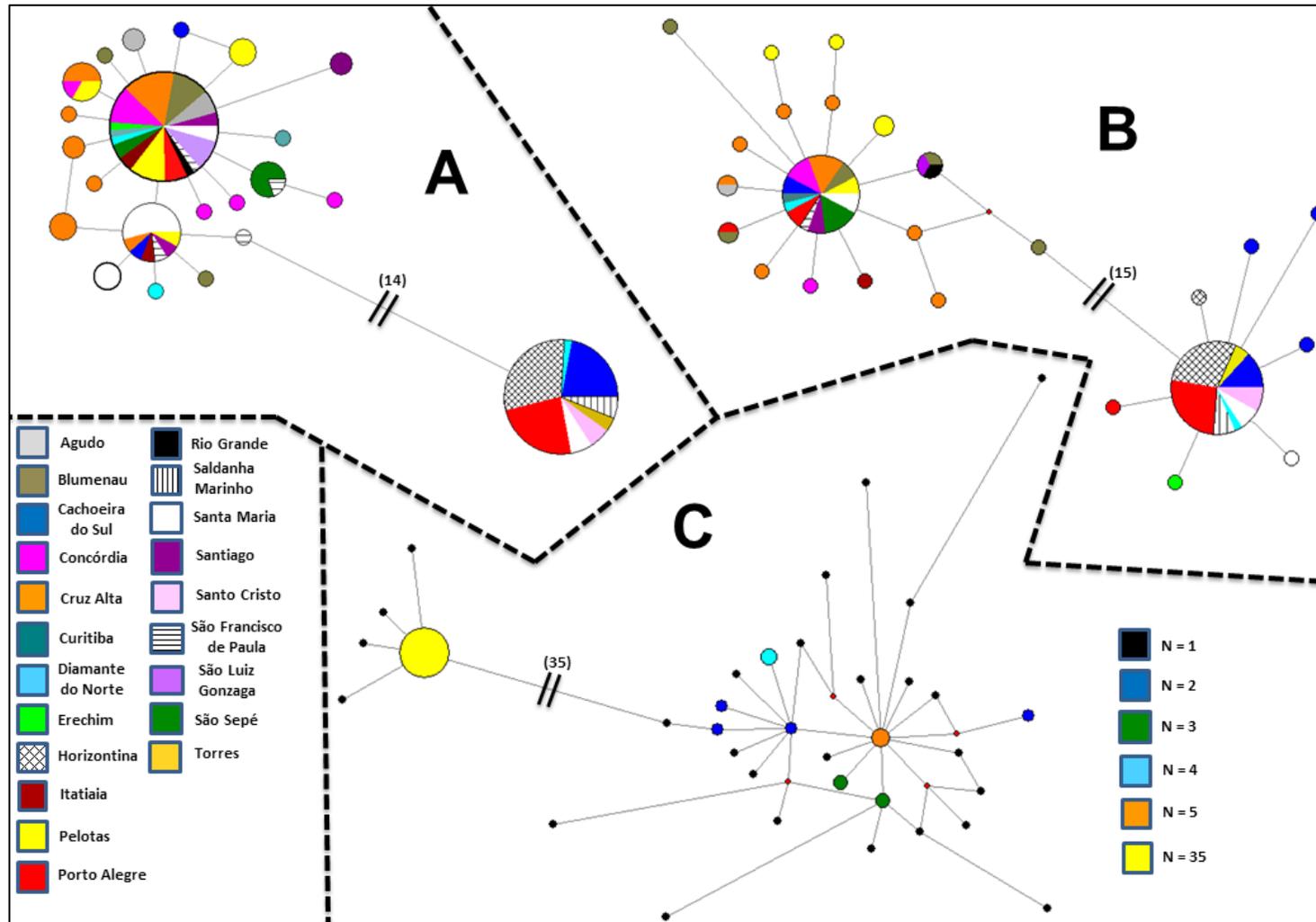


Figura 5: Árvores Filogenéticas por *Neighbor-Joining* para indivíduos de *Z. loretoi* (ID iniciando com 2) e *Z. vittimaculosa* (ID iniciando com 1) para os genes (A) COI, (B) COII e para ambos os genes concatenados (C).



Tabela 1: Testes de neutralidade e índices de diversidade.

Testes de neutralidade e índices de diversidade para COI, COII e ambos concatenados para <i>Z. vittimaculosa</i> e <i>Z. sp1</i> .						
	<i>Z. vittimaculosa</i>			<i>Z. sp1</i>		
	COI	COII	CONCATENADO	COI	COII	CONCATENADO
N	95	47	45	50	45	41
S	18	39	44	2	10	8
h	21	25	33	3	8	7
Hd(DP)	0.753 (0.043)	0.867 (0.047)	0.980 (0.011)	0.079 (0.052)	0.290 (0.089)	0.274 (0.092)
$\pi\%$ (DP)	0.002 (0.008)	0.005 (0.018)	0.004 (0.011)	0 (0)	0.001 (0.006)	0 (0.001)
Tajima's D	-1.97354 *	-2.45827 **	-	-1.46443	-2.34895 **	-
Fu e Li's D	-2.85261 *	-3.23817 *	-	-2.53305 *	-4.58722 **	-
Fu e Li's F	-3.01568 **	-3.52332 **	-	-2.57464 *	-4.54454 **	-

Legenda: N = número de seqüências utilizadas; S = número de sítios polimórficos; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; $\pi\%$ = diversidade nucleotídica.

Tabela 2: Fst de *Z. loretoi* para os genes COI (acima da diagonal) e COII (abaixo da diagonal).

Valores de FST para <i>Zygothrica loretoi</i> COI e COII								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0	0	-0.0076	-0.02212	0	0	0
2	-0.01734	0	0	-0.1892	-0.19318	0	0	0
3	-0.23251	-0.26316	0	-0.3266	-0.32911	0	0	0
4	0.1028	0.09648	-0.3253	0	0.00195	-1	-0.18919	-0.18919
5	0.11034	0.12529	-0.32766	-0.0202	0	-1	-0.19318	-0.19318
6	-0.83193	-1	0	-1	-1	0	0	0
7	-0.0987	-0.09091	0	-0.1871	-0.19084	0	0	0
8	-0.0987	-0.09091	0	-0.1871	-0.19084	0	0	0

Legenda: 1 = Cachoeira do Sul; 2 = Santa Maria; 3 = Torres; 4 = Porto Alegre; 5 = Horizontina; 6 = Diamante do Norte; 7 = Santo Cristo; 8 = Saldanha Marinho.

Tabela 3: Fst de *Z. vittimaculosa* para o gene COI.

Valores de FST para <i>Zygothrica vittimaculosa</i> - COI																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0																
2	0.6158*	0															
3	0.47124*	0.76877*	0														
4	0.19463	1*	0.62307*	0													
5	0.0583	0.72414*	0.15152	0.35135	0												
6	-0.5	1	0.47036	0	-0.5	0											
7	0.11765	1*	0.59699*	0	0.25	0	0										
8	0.04264	0.55627*	0.33855*	0.1294	-0.09343	-0.42857	0.07615	0									
9	0.13793	0.64023*	0.32792*	0.25801	-0.05727	-0.375	0.18317	0.0919	0								
10	-0.01695	1	0.55909	0	0.07692	0	0	-0.02612	0.05579	0							
11	0.13309	0.54472	0.41931	0.38462	-0.03125	-1	0.25	0.23461	0.15145	0	0						
12	-0.03604	0.82222	0.42107	0.38462	-0.2	-1	0.25	-0.08341	-0.06719	0	-0.38462	0					
13	0.08102	0.46667	0.0927	0.33333	-0.18033	-0.33333	0.25	0.04865	0.03226	0.11111	-0.04348	-0.08108	0				
14	-0.04808	0.42635*	0.35651*	0.03821	-0.02519	-0.65385	-0.02246	-0.01308	0.08193	-0.14328	0.13902	-0.1347	0.01942	0			
15	0.054	0.45809*	0.23616*	0.12213	-0.05978	-0.38824	0.07652	0.02122	0.08478	-0.0153	0.18422	-0.06845	0.00176	0.0218	0		
16	0.00614	0.65988*	0.38269*	-0.0473	-0.03279	-0.88889	-0.11562	0.00918	0.08223	-0.25594	0.1939	-0.10597	0.06365	-0.03243	0.02978	0	
17	-0.00181	0.81818*	0.24259	0.11111	-0.25	-1	0	-0.07704	-0.05565	-0.2	-0.01163	-0.2	-0.12281	-0.08755	-0.08361	-0.21011	0

0.00977 (+-0.0029), 0.00098 (+-0.001), 0, 0.0293 (+-0.0041), 0.02246 (+-0.0044), 0.03125 (+-0.0075), 0, 0.00977 (+-0.0029), 0.00977 (+-0.0029), 0, 0.00391 (+-0.0023), 0.03711 (+-0.0059), 0.00781 (+-0.0024), 0.01953 (+-0.0041), 0, 0.01270 (+-0.0037), 0, 0.00195 (+-0.0014), 0.00391 (+-0.0019).

Valores de p significativo. Respetivamente de cima para baixo e por coluna.

Tabela 4: Fst de *Z. vittimaculosa* para o gene COII.

Valores de FST para <i>Zygothrica vittimaculosa</i> - COII																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0															
2	1	0														
3	0.77778	0.71084	0													
4	1	0	0.71084	0												
5	0	0	0.58519	0	0											
6	1	1	0.77778	1	0	0										
7	1	1	0.77778	1	0	0	0									
8	0.5	-0.2	0.64021*	-0.2	0.11765	0.5	0.5	0								
9	-0.24444	-0.23529	0.26276*	-0.23529	-0.06286	-0.24444	-0.24444	-0.05882	0							
10	1	1	0.77778	1	0	1	1	0.5	-0.24444	0						
11	1	1	0.71429	1	0	1	1	0.5	-0.4	1	0					
12	1	1	0.92	1	0.6	1	1	0.875	0.46667	1	1	0				
13	1	0	0.6	0	-1	1	1	-1	-0.86667	1	1	1	0			
14	0.6	-0.26316	0.66667*	-0.26316	0.21127	0.6	0.6	0.01449	-0.00728	0.6	0.6	0.90476	-1	0		
15	-0.34667	-0.28812	0.19948*	-0.28812	-0.09333	-0.2625	-0.2625	-0.113	0.00718	-0.2625	-0.34667	0.46842	-0.92381	-0.07261	0	
16	-0.36	-0.275	0.22512*	-0.275	-0.11558	-0.7	-0.7	-0.13684	0.03377	-0.36	-0.36	0.38182	-0.94286	-0.04223	0.00946	0
						0.03027 (+0.0054)	0.00391 (+0.0019)	0.03320 (+0.0053)	0.03125 (+0.0048)	0.00684 (+0.0027)						
						Valores de p significativo. Respectivamente de cima para baixo										

Tabela 5: Análise da Variância Molecular (AMOVA) de *Z. loretoi* para os genes COI e COII em relação aos biomas Mata Atlântica e Pampa.

Análise de Variância Molecular (AMOVA) de COI e COII para <i>Z. loretoi</i>						
Fonte da Variação	COI			COII		
	GL	SQ	% de Variação	GL	SQ	% de Variação
Entre Biomas	1	0.041	6.93	1	0.5	0.91
Entre populações	6	0.069	-16.83	6	2.711	-2.45
Dentro das populações	42	1.85	109.89	37	18.789	101.55

Legenda: GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados.

Tabela 6: Análise da Variância Molecular (AMOVA) de *Z. vittimaculosa* para os genes COI e COII em relação aos biomas Mata Atlântica e Pampa.

Análise de Variância Molecular (AMOVA) de COI e COII para <i>Z. vittimaculosa</i>						
Fonte da Variação	COI			COII		
	GL	SQ	% de Variação	GL	SQ	% de Variação
Entre Biomas	1	1.284	-2.93	1	1.493	0.31
Entre populações	15	29.119	19.62	14	19.288	0.46
Dentro das populações	78	68.587	83.31	31	42.197	99.23

Legenda: GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados desse trabalho permitem corroborar trabalhos como os de Hebert et al. (2004b), Vences et al. (2005), entre vários outros, que apontam o DNA Barcoding como uma ferramenta para ajudar na identificação de espécies crípticas. De fato, a identificação inicial da espécie críptica a *Z. vittimaculosa* foi feita através de análises moleculares, já que num primeiro momento, as determinações eram feitas apenas com base na morfologia externa. Isto também evidencia a necessidade de refinamento nas identificações de drosofilídeos, seja a mesma feita com marcadores moleculares ou com a estrutura da genitália dos machos, que posteriormente se mostrou distinta entre as espécies irmãs.

A medida que nos aprofundamos nas análises relacionadas ao par de espécies em questão, evidenciamos aspectos ecológicos e evolutivos cada vez mais intrigantes. As duas espécies parecem ser simpátricas na maior parte de sua distribuição, compartilhando nicho abiótico e biótico. A partir dessa observação, o questionamento sobre o modo de especiação relacionado à sua origem é direto. Embora a mesma possa ter ocorrido em simpatria, associada a diferenças em escala micro-ecológica, o fato de termos encontrado padrões evolutivos essencialmente contrastantes para o par de espécies, e a sugestão de que a espécie nova passou a ocupar a região amostrada muito mais recentemente, acrescentam suporte a ideia de que a especiação tenha ocorrido em alopatria.

Dadas estas circunstâncias, a presente dissertação apresenta como principais perspectivas:

- o acréscimo de marcadores nucleares no estudo filogeográfico
- a extensão da região de amostragem mais para o Norte, bem como para regiões do Peru e do Equador, sugeridos como habitáveis por *Z. loretoi* nas análises de modelagem de nicho
- a realização de um estudo filogeográfico com as espécies de *Cestrum* exploradas por ambas as espécies na região sul do Brasil.