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

Tuane Letícia Carvalho

ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS ANTÓFILAS COM DIFERENTES GRAUS DE ESPECIALIZAÇÃO

Santa Maria, RS
2019

Tuane Letícia Carvalho

ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS ANTÓFILAS COM DIFERENTES GRAUS DE ESPECIALIZAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal.**

Orientadora: Dr.ª Lizandra Jaqueline Robe
Coorientadora: Dr.ª Juliana Cordeiro

Santa Maria, RS
2019

Carvalho, Tuane Letícia
Estruturação populacional de espécies de drosofilídeos antófilas com diferentes graus de especialização / Tuane Letícia Carvalho.- 2019.
90 f.; 30 cm

Orientador: Lizandra Jaqueline Robe
Coorientador: Juliana Cordeiro
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2019

1. Estruturação populacional 2. Diversidade genética
3. Especialização ecológica 4. DNA Barcode 5. Modelagem de nicho
I. Robe, Lizandra Jaqueline II. Cordeiro, Juliana III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Tuane Letícia Carvalho

ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS ANTÓFILAS COM DIFERENTES GRAUS DE ESPECIALIZAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal.**

Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:

_____
Lizandra Jaqueline Robe, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

_____
Elgion Lucio da Silva Loreto, Dr. (UFSM)

_____
Francine Cenzi De Ré, Dra. (IFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais por terem me auxiliado nas coletas que geraram esse trabalho. Pelo suporte, amor incondicional e respeito à natureza. Se hoje me sinto realizada é porque vejo em cada um de vocês um pouco da bióloga que me tornei.

À minha irmã Tamara, por todas as palavras de conforto que me encorajaram a permanecer nessa caminhada.

Ao meu namorado Felipe, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis. Pelo apoio emocional e pelos momentos de fuga. Grata por tudo, de coração.

À minha orientadora Lizandra, pela oportunidade, por todo o conhecimento compartilhado e por toda a paciência. Que um dia eu consiga me tornar um quinto da profissional competente e da pessoa humana que tu és.

À minha coorientadora Juliana Cordeiro, por me acompanhar desde a graduação e por ter guiado os meus primeiros passos para a vida acadêmica. Obrigada não somente pelo suporte científico, como também pelo suporte psicológico. Grata pela amizade.

Ao Hermes, por todo o tempo cedido para a identificação dos espécimes analisados nessa Dissertação.

Aos meus colegas de Rio Grande, por terem me recebido de braços abertos. Em especial à Thaisa, por ter tido paciência em me ensinar e me acompanhar em etapas que foram essenciais para a execução desse trabalho, e ao Henrique, pelas risadas e momentos de lazer.

Ao Professor Elgion, por ter cedido o espaço do seu laboratório para que eu pudesse continuar com a realização desse trabalho. E aos seus alunos, pela recepção.

Aos meus amigos de longa data, que sempre estiveram ao meu lado.

Às minhas amigas adquiridas durante a graduação, Aline e Priscila. Mesmo que a biologia não me traga grandes riquezas, ela já me presentou com grandes amizades.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de descontração e pelo sofrimento compartilhado. Que tenhamos força para continuarmos lutando por tudo aquilo que amamos.

À banca, por cederem o seu tempo e terem aceitado à esse convite.

"The love of complexity without reductionism makes art;
the love of complexity with reductionism makes science"
Consilience: The Unity of Knowledge – Edward O. Wilson

RESUMO

ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE DROSOFILÍDEOS ANTÓFILAS COM DIFERENTES GRAUS DE ESPECIALIZAÇÃO

AUTORA: Tuane Letícia Carvalho

ORIENTADORA: Lizandra Jaqueline Robe

COORIENTADORA: Juliana Cordeiro

Recentemente, o estudo da especialização ecológica se tornou um importante componente para a compreensão dos padrões relacionados à dinâmica populacional de muitas espécies. Drosofilídeos associados a flores são especialmente promissores em estudos deste tipo, por apresentarem espécies com o mais variado grau de especialização ecológica, fornecendo uma oportunidade para o entendimento de mecanismos ecológicos e evolutivos que promovem a diferenciação entre populações e o surgimento de novas espécies. Dito isso, esta dissertação de Mestrado teve como objetivo geral promover a compreensão dos padrões e processos associados à diversificação de espécies antófilas de *Drosophila*. Em um primeiro momento, documentamos a ampliação da ocorrência de *Drosophila alei* para o Brasil e caracterizamos genética, morfologica e ecologicamente as três espécies do grupo *lutzii* de ocorrência no país; e em um segundo momento, identificamos que a variabilidade genética e a estruturação populacional em espécies do grupo *flavopilosa, bromeliae* e *lutzii* de *Drosophila* não é significativamente associada ao grau de especialização ecológica.

Palavras-chave: Especialização ecológica. *Drosophila* sp. Gene COI. Gene COII. Diversidade genética

ABSTRACT

Population structure of antophilic drosophilids species with different degree of specialization

AUTHOR: Tuane Letícia Carvalho

ADVISOR: Lizandra Jaqueline Robe

COORIENTATOR: Juliana Cordeiro

Recently, the study of ecological specialization has become an important component for understanding the patterns related to the population dynamics of many species. Drosophilids associated with flowers are especially promising in studies of this type, since they present species with the most varied degree of ecological specialization, providing an opportunity for understanding the ecological and evolutionary mechanisms that promote the differentiation between populations and the emergence of new species. That said, this dissertation had the aim of promoting the understanding of the patterns and processes associated with the diversification of *Drosophila* anthophilic species. At first, we increased the know distribution of *Drosophila alei* in Brazil and characterized genetically, morphologically and ecologically the three species of the *lutzii* group occurring in the country; and in a second moment, we identified that the genetic variability and the population structure in species of the *flavopilosa, bromeliae* and *lutzii* group of *Drosophila* is not significantly associated with the degree of ecological specialization.

Key-words: Ecology specialization. *Drosophila* sp. Gene COI. Gene COII. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

MANUSCRITO 1

Figura 1 - Mapa de coleta na região Sul e Sudeste do Brasil, apresentando as localidades de distribuição das espécies *Drosophila alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii*.....41

Figura 2 - Morfologia externa e do edeago de *Drosophila alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii*.....42

Figura 3 - Terminália externa de *Drosophila alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii*. Hipandrium, cerco e surstylus.....43

Figura 4 – Gráficos de distribuição dos intervalos de divergência genética intra e interespecífica para os genes mitocondriais COI e COII em relação a sua frequência relativa.....44

Figura 5 – Árvore cronofilogenética baseada nas sequências concatenadas dos genes mitocondriais COI e COII.....45

Figura 6 – Mapas que descrevem os modelos de distribuição de adequação ambiental no último máximo glacial (LGM) e no presente recuperados para *D. alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii*.....46

Figura 7 - Curvas de resposta apresentadas por *Drosophila alei, D. denieri* e *D. lutzii* em função da variação encontrada em oito variáveis abióticas.....47

Figura 8 - Intervalos de tolerância apresentados por *Drosophila alei, D. denieri e D. lutzii* 48

Material Suplementar

Figura S1 – Reconstrução filogenética para o gene COI de *Drosophila alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii* a partir da análise Bayesiana (AB).....49

Figura S2 - Reconstrução filogenética para o gene COII de *Drosophila alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii* a partir da análise Bayesiana (AB).....50

MANUSCRITO 2

Figura 1 – Mapa de coleta na região Sul do Brasil, apresentando as localidades de distribuição das espécies *Drosophila incompta, D. bromelioides, D. bromeliae* sp. III, *D. bromeliae* sp. V e *D denieri*.....70.

Figura 2 - Reconstrução filogenética para o gene COI de *Drosophila incompta, D. bromelioides, D. bromeliae* sp. III, *D. bromeliae* sp. V e *D. denieri* a partir da análise Bayesiana (AB).....71

Figura 3 - Rede de interação entre as espécies de drosofilideos flower-breeding e os gêneros de planta.....72

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Tabela 1 - Espécimes de *Drosophila alei-like, D. denieri* e *D. lutzii* usados para as análises genéticas, com suas respectivas identificações (ID) e informações de coleta.....49

Tabela 2 - Distâncias intra e interespecíficas recuperadas para as espécies *Drosophila alei-like, D. denier* e *D. lutzii* para os genes mitocondriais COI e COII.....50

Tabela 3 - Índices de Sobreposição de nicho abiótico nas comparações pareadas entre *Drosophila alei-like, D. denier* e *D. lutzii*.....51

MANUSCRITO 2

Tabela 1 - Espécimes de *Drosophila incompta, D. bromeliodes, D. bromeliae* sp. III, *D. bromeliae* sp. V e *D. denieri* usados para as análises genéticas, com suas respectivas identificações (ID) e informações de coleta.....73

Tabela 2 - Índices de diversidade genética (Hd, π e número médio de alelos), índices médios de fixação de alelos (*Fst)* e índices de especialização calculados para cada uma das espécies.....74

Tabela 3 - Correlação entre os índices de especialização e as variáveis genéticas.....75

Material Suplementar

Tabela S1 - Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as localidades amostradas para *D. bromeliae* sp. V.....76

Tabela S2 - Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as localidades amostradas para *D. incompta*.....77

Tabela S3 - Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as localidades amostradas para *D. bromelioides*.....78

Tabela S4 - Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as localidades amostradas para *D. bromeliae* sp. III.....79

Tabela S5 - Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as localidades amostradas para *D. denieri*.....80

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONTEXTUALIZAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL.....13
1.2 MODELO BIOLÓGICO 16
1.2.1 Grupo *flavopilosa* de *Drosophila*.....18
1.2.2 Grupo *bromeliae* de *Drosophila*.....19
1.2.3 Grupo *lutzii* de *Drosophila*.....19

2 OBJETIVOS

1.3 OBJETIVO GERAL.....21
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....21

CAPÍTULO 2 - MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

MANUSCRITO 1 – Uso de abordagem integrativa na delimitação e caracterização evolutiva e ecológica de espécies brasileiras do grupo *lutzii* de *Drosophila*.....22

MANUSCRITO 2 – Especialização ecológica e diversidade genética: um estudo com drosofilídeos especialistas em flores.....54

CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

3.1 Discussão.....81

3.2 Conclusões.....83

CAPÍTULO 1 - *CONTEXTUALIZAÇÃO*

1.1 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL

A genética de populações é a área de conhecimento responsável por analisar a quantidade e a distribuição da variação genética nas populações e as forças que controlam essa variação (HARTL & CLARK, 2010). Nos ambientes naturais, as espécies encontram-se frequentemente subdivididas em populações locais ou subpopulações. Estas consistem de indivíduos que habitam uma área geográfica, das quais a maioria dos pares que se acasalam exibe um padrão de variação genética que demonstra uma estrutura populacional (GRIFFITHS et al., 2016). Segundo Templeton (2011), a compreensão dos níveis de variação genética, bem como dos padrões de estruturação entre populações são indispensáveis para a avaliação da evolução em uma população. Essa compreensão também permite, por outro lado, a realização de predições acerca da evolvabilidade e da potencial diversificação futura das espécies de interesse (YANNIC et al., 2014). Afinal, a estruturação populacional pode resultar em eventos de especiação (BUSH, 1975; BARTON & CHARLESWORTH, 1984).

Em geral, o nível de estruturação costuma ser inversamente proporcional a quantidade de fluxo gênico entre as subpopulações (HUTCHISON & TEMPLETON, 1999), embora outras variáveis, relacionadas ao sistema de acasalamento, ao tamanho das subpopulações e ao tipo de pressão seletiva, também sejam determinantes no estabelecimento destes padrões (TEMPLETON, 2011). O fluxo gênico, compreendido como a troca genética entre populações locais, é a força evolutiva responsável por manter a homogeneidade genética e limitar a divergência entre as subpopulações (GRIFFITHS et al., 2016). Para que haja fluxo gênico é necessário que ocorra tanto migração, representado pelo deslocamento dos indivíduos no espaço geográfico, quanto reprodução desses indivíduos que se encontram após o evento de migração. Com isso, o fluxo gênico representa uma interação complexa entre padrões de dispersão e sistemas de acasalamento (TEMPLETON, 2011). Além disso, frequentemente é encontrada uma correlação inversa entre os níveis de estruturação populacional e as distâncias geográficas entre as subpopulações (WRIGHT, 1943), reflexo da diminuição do fluxo gênico com o aumento da distância geográfica entre as subpopulações (SEXTON et al., 2014). Este padrão é referido como isolamento por distância (SLATKIN, 1987).

Segundo Ashburner et al. (1982), a estrutura populacional é reflexo de fenômenos que ocorrem em duas escalas: (1) temporal, decorrente de extinções e

recolonizações de populações locais, ou da contração e expansão do tamanho da população no tempo; ou, (2) espacial, decorrente da variação geográfica nas frequências gênicas e genotípicas, e da tendência dos indivíduos de manterem acasalamentos não aleatórios. Esse mesmo autor ainda destaca que a estrutura populacional pode ser estudada por meio de uma abordagem genética, onde frequências gênicas são determinadas por meio de marcadores e a estruturação inferida a partir de padrões observados. Ou ainda, pode ser estudada por meio de uma abordagem ecológica, onde é avaliada a contribuição de fatores como dispersão, densidade e escolha de habitat na estrutura populacional.

Mudanças paleogeoclimáticas parecem apresentar uma grande influência na dinâmica populacional de muitas espécies, contribuindo com os padrões de variabilidade genética dentro e entre populações atuais (HAFFER, 1997). Os eventos paleogeográficos ocorridos no Terciário, como a orogenia andina e o fechamento do Istmo do Panamá, por exemplo, parecem ter sido importantes na diversificação de muitos grupos Neotropicais (RULL, 2011). Além disso, os rearranjos das florestas Neotropicais durante esse período também parecem apresentar uma forte influência na história evolutiva de diversas espécies. Padrões filogeográficos de vários táxons distribuídos entre a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, por exemplo, corroboram com a hipótese de que estas florestas neotropicais encontravam-se separadas durante o período Terciário (COSTA et al., 2003). Alguns estudos recentes, no entanto, detectaram valores baixos de divergência entre linhagens destes dois Biomas, indicando que alguma conectividade entre as duas florestas existiu durante o período Quaternário (PAVAN et al. 2011; PERES et al. 2017).

Por outro lado, as intensas flutuações climáticas e, consequente fragmentação do habitat durante o período do Quaternário, também parecem explicar grande parte da distribuição e da estruturação populacional atual das espécies. Reconstruções paleovegetacionais demonstram que ocorreram drásticas mudanças nas composições vegetacionais durante os ciclos glaciais e interglaciais (QUATTROCCHIO et al., 2011; SANTOS LEAL et al., 2016). No Hemisfério Sul, a alternância de condições secas e úmidas, de ambientes florestados e não florestados, parece ter refletido diretamente na diversidade e na estruturação da biodiversidade Neotropical. Estudos com drosofilídeos restritos a ambientes xeromórficos, por exemplo, sugerem a ocorrência de eventos de expansão populacional associado a períodos glaciais áridos que ocorreram no Brasil durante o Pleistoceno (FRANCO et

al., 2010; FRANCO & MANFRIN, 2013). De forma contrária, eventos de expansão populacional em períodos interglaciais do último máximo glacial, há cerca de 12.000 anos atrás, foram evidenciados em diferentes espécies de drosofilideos restritos à áreas úmidas na América do Sul (CENZI DE RÉ et al., 2014; GUSTANI et al., 2015). Independente das divergências entre os padrões filogeográficos encontrados durante o período Quaternário, eles parecem refletir de forma significativa o potencial adaptativo e migratório das espécies (TURCHETTO-ZOLLET et al., 2013).

Apesar de menos investigados, alguns fatores ecológicos também podem desempenhar um papel importante na dinâmica populacional de muitas espécies (HOFMANN & NAPP, 1984; SEPEL et al., 2000; POPPE et al., 2013). Neste sentido, comparar os padrões de estruturação populacional entre espécies cuja distribuição geográfica se sobrepõe, mas que diferem em algum aspecto ecológico, parece promissor para avaliar o impacto destas diferenças na distribuição da variação genética (SAEKI et al., 2011; DELLICOUR et al., 2015a). Este é o caso de comparações envolvendo espécies com diferentes graus de especialização ecológica, cujos níveis de variabilidade genética e estruturação populacional podem variar em função dos padrões de ocorrência e distribuição dos recursos explorados (WANG & BRADBURD, 2014). Desse modo, enquanto algumas espécies mostram amplas tolerâncias (generalistas de habitat), outras demonstram tolerâncias ambientais mais específicas e estreitas (especialistas em habitat), e estas duas categorias de espécies demonstram ter diferentes dinâmicas populacionais (KOLASA & LI, 2003).

Espécies especialistas tendem a ser consideradas como as mais prejudicadas com as alterações ambientais que ocorreram no passado e das mudanças climáticais atuais, devido à maior sensibilidade às flutuações estócasticas de seus recursos. De fato, evidências sugerem diminuição na variação genética e aumento na estruturação populacional em espécies especialistas (KELLEY et al., 2000; PACKER et al., 2005; HABEL et al., 2009). Isto é esperado porque essas espécies tendem a ser limitadas pela distribuição de seus recursos, sendo mais impactadas pela fragmentação ambiental, podendo resultar em populações menores e mais isoladas. Dessa forma, espécies especialistas são mais sujeitas a dinâmicas de metapopulações, passando por eventos de gargalo de garrafa repetidos diminuindo ainda mais o tamanho das populações que já se encontram fragmentadas (NOSSIL, 2002). Como consequência da fragmentação, é esperado que haja um aumento na deriva local (em decorrência da redução do tamanho populacional), e uma redução no fluxo gênico entre as

populações, alterando a estrutura da população (HEDRICK & GILPIN, 1997; WHITLOCK & BARTON, 1997). O aumento da estruturação populacional por sua vez, aumenta ainda mais o risco de extinção, tanto devido a maior suscetibilidade a perda da variação genética e a eventos estocásticos, quanto pela redução da habilidade de adaptação à alterações ambientais (LI et al., 2013).

Enquanto que as espécies especialistas respondem principalmente às variações ambientais e a fragmentação de seu habitat, as espécies generalistas, por apresentarem uma maior disponibilidade de recurso, são menos influenciadas por estes fatores. Essa previsão resulta do fato de que espécies generalistas conseguem substituir um recurso escasso por outro mais facilmente, e portanto, suas populações encontram-se mais conectadas. Assim, é esperado que espécies generalistas apresentem uma fraca estruturação populacional, principalmente devido à livre ocorrência do fluxo gênico (KELLEY et al., 2000; BROAUT et al., 2003; ZAYED et al., 2005). O fluxo gênico por sua vez, diminui a variabilidade genética entre as populações locais e aumenta a variabilidade genética na população como um todo (BROAAUT et al. 2004). Sendo assim, é esperado que a história evolutiva dessas espécies seja afetada por outros processos como, por exemplo, aqueles associados a competição e a capacidade de dispersão (PANDIT et al., 2009; ARAUJO et al., 2011). No entanto, evidências recentes sugerem altos níveis de diversidade e baixa estruturação até mesmo em espécies especialistas (CENZI DE RÉ et al., 2016), o que traz novos questionamentos acerca dos fatores que influenciam esses padrões.

A estruturação genética populacional, ou seja, a partição da variabilidade genética intra e inter-populacional parece ser, portanto, resultado direto da interação entre forças evolutivas (seleção, deriva, mutação e migração) e dos seus efeitos dentro de um contexto ecológico. Além disso, as variantes genéticas no tempo e no espaço são influenciadas por diversos fatores relacionados a biologia do organismo, incluindo sucesso reprodutivo, migração, tamanho populacional, seleção natural e eventos históricos.

1.2 MODELO BIOLÓGICO

Drosophilidae é uma das maiores famílias da Ordem Diptera, possuindo mais de 4.300 espécies distribuídas em 76 gêneros (BÄCHLI, 2018). *Drosophila* constitui o gênero mais diverso da família, com 1.198 espécies subdivididas em oito subgêneros (BÄCHLI, 2018), embora sua natureza comprovadamente parafilética demonstre a

artificialidade destas subdivisões (THOROCKMORTON, 1975; O'GRADY & MARKOW, 2009; ROBE et al., 2010). Tradicionalmente chamados de "mosca-do-vinagre", os membros da família Drosophilidae apresentam uma ampla diversidade de nichos ecológicos e de amplitudes de distribuição (MARKOW & O'GRADY, 2008). Assim, enquanto algumas espécies da família apresentam menor dependência de umidade durante seu ciclo de vida, e são capazes de sobreviver até mesmo em ambientes relativamente secos (OLIVEIRA et al., 2016), outras são bastante dependentes de ambientes úmidos devido ao tipo de recurso que utilizam (CENZI DE RÉ et al., 2014). De fato, devido à grande diversidade de hábitos de vida, estes organismos têm se mostrado excelentes bioindicadores no estudo do efeito das flutuações climáticas do Quaternário em espécies Neotropicais (DE BRITO et al., 2002; MORAES et al., 2009; FRANCO & MANFRIN, 2013).

Em sua maioria, os drosofilídeos utilizam plantas em estágio inicial de decomposição como local de oviposição, onde as larvas se alimentam dos microorganismos em desenvolvimento (CARSON, 1971). No entanto, vários substratos podem ser utilizados como sítios de alimentação e/ou oviposição, como frutos, flores, cactos, cascas de árvore, fungos carnosos e até mesmo guano de morcego (CARSON, 1971; TOSI et al., 1990; FANARA et al., 2001; BLAUTH & GOTTSCHALK, 2007; SCHMITZ et al., 2007). Além disso, é possível observar casos de especialização extrema em algumas espécies associadas à caranguejos terrestres (ASHBURNER, 1982). Essa evolução de nichos associado à diversificação de substratos explorados parece explicar o sucesso evolutivo da família Drosophilidae (ROBE et al., 2010).

Embora menos estudados, drosofilídeos associados às flores constituem um grupo amplamente diverso. Existem pelo menos 208 espécies de drosofílideos que utilizam flores como sítio de oviposição e desenvolvimento larval, alimentação de adultos e/ou acasalamento (BRNCIC, 1983; CORDEIRO et al. em revisão). Porém, existe uma alta diversidade de drosofilídeos com hábito florívoro ainda não descrita, e um alto potencial de descoberta de novas espécies. Schmitz e Valente (2018) amostraram 28 espécies de Drosophilidae, sendo que 40% da amostra eram espécies novas. Estas espécies apresentam uma ampla gama de especialização ecológica, desde espécies que dependem de plantas para completar o seu ciclo de vida, chamadas de *flower-breeding drosophilid* (FDB *sensu stricto*), até espécies que

utilizam flores como sítiode oviposição de forma oportunística, chamada de antófilas ou antofílicas (*sensu latu*). Além disso, as espécies FDB podem apresentar hábitos mais especialistas, ovipondo em flores de apenas um gênero de plantas como hospedeiras, ou uma natureza mais generalista, usando uma grande variedade de espécies de flores de diferentes famílias de plantas (CORDEIRO et al., em revisão).

1.2.1 GRUPO *FLAVOPILOSA*

O grupo *flavopilosa* é o grupo de espécies especialista a flores (*flower-breeding drosophilid* - FBD) mais estudado da região Neotropical, sendo encontradas por toda a América do Sul e Central (ROBE et al., 2013). Esse grupo foi descrito por Wheeler (1962), e é constituído por 17 espécies (BÄCHLI, 2018), mais duas novas espécies descritas recentemente por Guillin & Rafael (2018). No Brasil, há registro de seis espécies do grupo: *Drosophila cestri* Brncic (1978), *D. cordeiroi* Brncic (1978), *D. flavopilosa* Frey (1919), *D. hollisae* Vilela (1992), *D. incompta* Wheeler (1962) e *D. mariaehelenae* Vilela (1984) (GOTTSCHALK et al., 2008).

Quanto às plantas hospedeiras, todas as espécies do grupo *flavopilosa* são extremamente dependentes de flores do gênero *Cestrum* (Solanaceae) para completar seu ciclo de vida (BRNIC, 1966; HOFMANN, 1984). Para isso, essas moscas contam com diversas adaptações morfológicas, como uma coloração amarelada das fêmeas (críptica com as flores que habitam), um ovipositor serrilhado (auxiliando na escarificação do tecido floral), e ovos com ausência de espiráculos (uma vez que os ovos são postos em camadas bastante superficiais do tecido floral) (BRNCIC, 1983; LUDWIG et al., 2002). Em vista da ecologia restrita do grupo, é observada uma correlação da distribuição de suas espécies com os limites de distribuição de suas plantas hospedeiras (ROBE et al., 2013), além de significativas reduções populacionais mediante decréscimo na floração de espécies do gênero *Cestrum* (SEPEL et al., 2000).

Em relação à posição filogenética do grupo, existem indícios de que ele faça parte da radiação *virilis-repleta* (CENZI DE RÉ et al., 2014; ROBE et al., 2010; THROCKMORTON 1975), ou, na visão da reformulação filogenética de Drosophilidae, do subgênero *Siphlodora* do gênero *Drosophila* (YASSIN, 2013). O seu posicionamento dentro deste clado, no entanto, ainda é controverso. Nesse sentido, enquanto alguns genes suportam o grupo *flavopilosa* como estreitamente relacionado ao grupo *repleta*, com exclusão de *D. virilis*, outros genes indicam que o grupo

flavopilosa está mais próximo de *D. virilis* do que de espécies do grupo *repleta* (ROBE et al., 2005; 2010). Cenzi De Ré et al. (2017) confirmaram a presença destas inconsistências em relação ao posicionamento filogenético do grupo *D. flavopilosa* ao estudar os genomas mitocondriais e nucleares de *Drosophila incompta.*

1.2.2 GRUPO *BROMELIAE*

O grupo *bromeliae* é um dos grupos de *Drosophila* especialista a flores mais abundante nas coletas no Neotrópico, apresentando registros desde o Sul do México, Cuba, América Central, Caribe, até o Sul do Brasil na América do Sul (GRIMALDI, 2016; SCHMITZ & HOFMANN, 2005; SCHMITZ et al., 2007; SCHMITZ, 2010; SCHMITZ & VALENTE, 2018). Atualmente, o grupo *bromeliae* possui 14 espécies descritas formalmente (BÄCHLI, 2018). Foi apenas com as coletas de Schmitz e Valente (2018) que a distribuição das espécies deste grupo foi expandida ao sul do Brasil, com o registro de *D. bromeliae* e *D. bromelioides*, além de outros seis diferentes morfotipos (tipo III, III', IV, IV', V e VI) que pertencem a potenciais espécies novas (SCHMITZ, dados não publicados). Diferentemente das espécies do grupo *flavopilosa*, entretanto, estas espécies apresentam diferenças nos níveis de amplitude de nicho quanto ao uso de flores para desenvolvimento larval, abrangendo desde espécies generalistas (*D. bromeliae*, *D. bromelioide,* III e III') até espécies especialistas (IV, IV', V e VI), encontradas exclusivamente em flores do gênero *Solanum* (SCHMITZ & VALENTE, 2018, CORDEIRO et al. em revisão).

O posicionamento filogenético dessas espécies, no entanto, é bastante debatido. Enquanto estudos moleculares recentes têm suportado o grupo *bromeliae* como táxon-irmão do grupo *nannoptera* (ROBE et al., 2010; RUSSO et al., 2013; YASSIN 2013), avaliações morfológicas prévias o agrupam junto ao grupo *peruviana* (THROCKMORTON, 1975). Porém, independente de quem é o táxon-irmão, o grupo *bromeliae* parece pertencer a radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila* (THROCKMORTON, 1975; ROBE et al., 2010), redesignada para subgênero *Siphlodora* do gênero *Drosophila* (YASSIN, 2013).

1.2.3 GRUPO *LUTZII*

O subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*, redesignado para grupo *lutzii* de *Drosophila* (YASSIN, 2013) é outro táxon representativo FBD no Neotrópico. Atualmente, o grupo conta com oito espécies tipicamente generalistas (BÄCHLI, 2018;

CORDEIRO et al. em revisão). Dentre elas, *D. lutzii* e *D. denieri* são as espécies com maior distribuição. Globalmente, *D. denieri* parece estar restrita à região Sul da América do Sul, enquanto que *D. lutzii* se estende ao norte da região Neotropical, co-ocorrendo com *D. denieri* em várias regiões do Brasil (VILELA 1986; GOÑI et al., 1998; SCHMITZ & VALENTE 2018). As outras seis espécies do grupo são menos amostradas, apresentando apenas alguns registros ocasionais relacionados principalmente à descrição da espécie-tipo (BRNCIC, 1962; STURTEVANT, 1921, VILELA & PIETRO, 2018; VILELA & BACHLI, 2002; DUDA, 1927). Quanto à diversidade de espécies de plantas hospedeiras, estas espécies já foram registradas utilizando espécies vegetais de pelo menos oito famílias diferentes: Araceae, Boraginaceae, Cucurbitaceae, Convolvulaceae, Malvaceae, Solanaceae e Passifloraceae (SCHMITZ & VALENTE, 2018; CORDEIRO et al. em revisão).

No que diz respeito a posição filogenética, os estudos, mais uma vez, diferem entre si. Enquanto Throckmorton (1975) considera o táxon como pertencente à radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila*, Grimaldi (1990) sugere um posicionamento basal à divergência dos subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*. No entanto, evidências morfológicas e moleculares recentes apresentam o grupo *lutzii* como pertencente ao subgênero *Drosophila*, conforme reclassificação proposta por Yassin (2013).

Os três grupos da Família Drosophilidae apresentados acima apresentam características particulares que auxiliam o estudo de associação entre padrões de especialização ecológica e diversidade genética. Por exemplo: (i) a independência filogenética entre os três grupos de FBD, onde semelhanças dos padrões tendem a ser resultado de convergência; (ii) a heterogeneidade ecológica, em relação aos níveis de especialização ecológica, apresentando espécies especialistas e generalistas ao uso de flores; e (iii) a sobreposição da distribuição geográfica apresentada por muitas espécies dos três grupos, facilitando as comparações em relação à variação abiótica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Auxiliar a compreensão dos padrões e processos associados à diversificação de espécies especialistas de *Drosophila*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Caracterizar morfológica e geneticamente as espécies do grupo *lutzii* que ocorrem no Brasil;
II. Avaliar e comparar os níveis de diversidade intraespecífica apresentados por cinco espécies *flower-breeding drosophilid* (FDB) com diferentes graus de especialização em relação a exploração de recursos;
III. Analisar e comparar os padrões de estruturação genética entre populações apresentados por cinco espécies FDB com diferentes níveis de especialização;
IV. Avaliar os processos históricos ou recorrentes associados aos padrões encontrados.

CAPÍTULO 2 *– MANUSCRITOS CIENTÍFICOS*

2.1 MANUSCRITO 1

DELIMITAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO EVOLUTIVA E ECOLÓGICA DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DO GRUPO *LUTZII* DE *DROSOPHILA*

Resumo

Dentre os grupos de espécies da família Drosophilidae que ovipositam em flores para completar o ciclo, o grupo *lutzii* de *Drosophila* [sensu Yassin (2013), previamente designado como subgênero *Phloridosa* Sturtevant, 1942], é um dos mais amplamente distribuídos na Região Neotropical. *Drosophila denieri* (Blanchard, 1938) e *D. lutzii* (Sturtevant, 1916) compreendiam as únicas espécies do grupo registradas no Brasil até agora. Neste estudo registramos pela primeira vez a ocorrência de um espécime similar a *Drosophila alei* (Brncic, 1962) no Sul do Brasil, descoberta essa inicialmente proporcionada pelo uso de estratégias associadas a tecnologia do DNA Barcode. Para auxiliar na inferência dos processos ecológicos e evolutivos associados a diversificação destas três espécies, nós utilizamos marcadores moleculares e morfológicos, junto a análises associadas à modelagem de nicho e à sobreposição de nicho biótico e abiótico. Nossos resultados comprovaram a eficiência da utilização de marcadores moleculares na identificação de espécies crípticas, uma vez que tanto o gene mitocondrial *COI* quanto o gene *COII* obtiveram sucesso e foram congruentes na delimitação das três diferentes linhagens filogenéticas aqui analisadas. De modo geral, *Drosophila alei-like* mostrou-se proximamente aparentada a *D. denieri*, e estas duas espécies apresentaram-se extremamente semelhantes entre si, tanto do ponto de vista morfológico, quanto genético e ecológico. Neste sentido, foi possível, inclusive, detectar a ocorrência de microsimpatria entre *D. alei-like* e *D. denieri* em flores de *Ipomoea alba* e *Brugmansia sualovensis*. Os resultados da análise cronofilogenética sugeriram que a diversificação das três espécies tenha ocorrido durante o período Neógeno, abrangendo o Mioceno e o Plioceno. Já os resultados da Modelagem de Nicho sugerem que *D. alei-like* tenha expandido sua distribuição recentemente para o sul do Brasil, de forma que a atual simpatria reflete um contato secundário entre as três espécies analisadas.

Palavras-chave: DNA Barcode. Modelagem de nicho ecológico. Sobreposição de nicho. drosofilideos flower-breeding.

1 Introdução

Um dos desafios da Biologia Evolutiva é definir características importantes na delimitação das espécies biológicas, assim como compreender quais são os principais mecanismos genéticos, ecológicos ou comportamentais envolvidos no processo de especiação (RABOSKY, 2016). Abordagens genéticas tem se revelado especialmente eficientes em complementar a taxonomia morfológica, especialmente nos casos de espécies crípticas ou de complexos de espécies (BEKKER et al., 2016; ELDERINK et al., 2016; IFTIKHAR et al., 2016; DINCA et al., 2015). A técnica de DNA Barcode é eficaz na maioria desses casos (CLARE et al., 2011; CRAWFORD et al., 2012; DOMINGOS et al., 2017; JANZEN et al., 2017). No entanto, cada vez mais, tem se mostrado a necessidade de integrar essa abordagem com avaliações de cunho morfológico e ecológico, a fim de auxiliar na difícil tarefa de descrever e diferenciar espécies e assim buscar uma compreensão mais completa da biodiversidade (FONSECA et al., 2017; MACHADO et al., 2017).

Drosophilidae compreende uma das famílias mais especiosas de dípteros, contando com mais de 4.300 espécies subdivididas em 76 gêneros (BÄCHLI, 2018). Essas espécies apresentam uma alta diversidade em relação a requisitos ecológicos, permitindo sua presença em quase todas as regiões biogeográficas (VAL et al., 1982; THROCKMORTON, 1975). Dentre as espécies florívoras desta família, o grupo *lutzii* do gênero *Drosophila* [*sensu* Yassin (2013), previamente designado como subgênero *Phloridosa* Sturtevant, 1942] constitui um dos táxons mais amplamente distribuídos na Região Neotropical. Este grupo possui, atualmente, oito espécies descritas: *Drosophila alei* Brncic, 1962; *D. alfari* Sturtevant, 1921; *D. cuzcoica* Duda, 1927; *D. denieri* Blanchard, 1938; *D. lutzii* Sturtevant, 1916; *D. merzi* Vilela & Bächli, 2002b; *D. tristani* Sturtevant, 1921; e *D. monsterae* Vilela & Pietro, 2018. No que diz respeito à sua posição filogenética, os dados são bastante controversos. Enquanto Throckmorton (1975) considera o táxon como pertencente à antiga radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila* [atualmente subgênero *Siphlodora sensu* Yassin (2013)], Grimaldi (1990) sugere um posicionamento basal à divergência do gênero *Drosophila*. No entanto, evidências morfológicas e moleculares recentes demonstram que o grupo *lutzii* faz parte do subgênero *Drosophila* [*sensu* Yassin (2013), antiga radiação *immigrans-tripunctata*].

Drosophila denieri e *D. lutzii* são as espécies do grupo *lutzii* com maior distribuição. Globalmente, *D. denieri* está distribuída na região sul da América do Sul, enquanto que *D. lutzii* se estende ao norte, abrangendo o Neotrópico e o Neártico, co-ocorrendo com *D. denieri* em várias regiões do Brasil (VILELA, 1986; GOÑI et al., 1998; SCHMITZ & VALENTE, 2018). Já *D. alei* parece estar restrita ao Chile e Peru (BRNCIC, 1962; VILELA & BÄCHLI, 2002), enquanto as demais espécies tem seus pontos de coleta restritos às localidades do holótipo. Tanto *D. denieri* quanto *D. lutzii* já foram reportadas utilizando diversas famílias de plantas como sítio de oviposição, demonstrando um comportamento ecológico tipicamente generalista (SCHMITZ & VALENTE, 2018). *Drosophila alei*, por outro lado, foi encontrada utilizando como plantas hospedeiras as flores de *Brugmansia* sp. (Solanaceae) e *Ipomoea* sp. (Convolvulaceae) (BRNCIC, 1962; VILELA & BÄCHLI, 2002a), também utilizadas por *D. denieri* e *D. lutzii* (BRNCIC, 1962; SCHMITZ & HOFMANN, 2005; SCHMITZ & VALENTE, 2018). Morfologicamente, as três espécies são crípticas, até mesmo a nível de morfologia da genitália interna dos machos (BRNCIC, 1962; VILELA, 1986; VILELA & BÄCHLI, 2002a, 2002b).

O objetivo deste trabalho foi analisar a identidade taxonômica de espécimes coletados no sul do Brasil, pertencentes ao grupo *lutzii*, e identificar padrões macroecológicos e evolutivos destas espécies. Para isso, (i) identificamos as espécies utilizando taxonomia tradicional; (ii) analisando sequências mitocondriais, identificamos as espécies por meio de taxonomia molecular; (iii) datamos a divergência das espécies por meio de análise cronofilogenética; e (iv) analisamos padrões macroecológicos por meio de modelagem e sobreposição de nicho. Através do uso desta abordagem integrativa, foi possível registrar pela primeira vez a ocorrência de uma espécie similar a *D. alei* no Brasil, onde a mesma co-ocorre com *D. denieri* em flores de *Ipomoea alba* e *Brugmansia sualovensis*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta e identificação dos espécimes

As coletas foram realizadas em sete municípios do sul do Brasil (Figura 1). Espécies de flores com registro prévio de utilização por espécies do grupo *lutzii* (SCHMITZ & VALENTE, 2018), foram coletadas *ad libidum* em antese. Posteriormente foram fotografadas para identificação, separadas em frascos com areia esterilizada e

armazenadas em câmara com temperatura e umidade controladas (±25ºC; 60%, respectivamente), até a emergência dos adultos. Todos os espécimes de Drosophilidae foram identificados com base em descrições da morfologia externa e da terminália masculina disponíveis na literatura (BRNCIC, 1962; STURTEVANT, 1921; DUDA, 1927; BLANCHARD, 1938; STURTEVANT, 1916; VILELA & BÄCHLI, 2002a, 2002b; STURTEVANT, 1921; VILELA & PIETRO, 2018). Para análise da terminália masculina, o tergito do abdômen foi tratado com hidróxido de potássio 10% e corado com fucsina ácida (BÄCHLI et al., 2004). A terminália foi posteriormente desarticulada em glicerol e analisada em microscópio ótico. Para posterior análise molecular, todos os espécimes foram armazenados em etanol absoluto. Todas as terminálias analisadas dos indivíduos utilizados para extração de DNA estão mantidas em tubos devidamente identificados contendo glicerol, e serão depositados na coleção de Drosophilidae do Museu Carlos Ritter/UFPel.

2.2 Extração de DNA, Amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA total dos espécimes foi extraído utilizando o kit de extração NucleoSpin DNA Insect kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Para a amplificação dos genes mitocondriais *cytochrome oxidase subunit* I e II (*COI* e *COII*) foram usados os pares de primers TYJ1460 (SIMON et al., 1994) e HCO1490 (FOLMER et al., 1994), e TL2J3037 e TKN3785 (SIMON et al., 1994), respectivamente. Os amplicons obtidos foram purificados seguindo o protocolo de purificação de acetado de amônio. As amostras foram sequenciadas na empresa Macrogen. Após o recebimento das sequências das fitas *forward* e *reverse*, os eletroferogramas foram avaliados e montados por meio do programa *GAP4* do pacote Staden v.4.11 (STADEN, 1996). Por fim, a matriz gerada para cada gene mitocondrial teve suas sequências alinhadas por meio do algoritmo ClustalW implementado no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

2.3 Análises Moleculares

Para a delimitação das potenciais espécies representadas pelas sequências geradas, foram utilizadas metodologias tradicionalmente empregadas para análises de DNA Barcode:

(1) Primeiramente, utilizamos a análise de identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais (*Operational Taxonomic Units* – OTUs) (HEBERT et al., 2003; 2005) que se baseia na reconstrução de árvores filogenéticas para os diferentes marcadores e na observação de monofilia recíproca entre as espécies. Para tanto, foi empregada uma análise Bayesiana (AB) no programa MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001), adotando o modelo evolutivo GTR+I determinado por meio do teste *Akaike Information Criterion* (AIC) (AKAIKE, 1974) realizado no software MrModeltest (NYLANDER, 2008). Esta análise envolveu duas iterações MCMC com 1 milhão de gerações cada, amostradas a cada mil, e descartando 25% dos resultados iniciais como *burn-in*. Como *outgroup,* foram usadas as sequências de *D. tripunctata* (*COI: KR758613; COII: EU493748*).

(2) Para a delimitação de espécies com base em dados de locos único, a partir da detecção da transição entre processos micro e macroevolutivos, utilizamos o modelo *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC). Para tanto, três árvores ultramétricas foram reconstruídas para cada um dos genes mitocondriais no programa BEAST (DRUMMOND et al., 2012), utilizando os seguintes modelos de árvore e de relógio molecular: (i) modelo Yule com taxa de especiação constante e relógio molecular estrito; (ii) modelo Yule com taxa de especiação constante e relógio molecular relaxado; e, (iii) modelo coalescente, com tamanho populacional constante e relógio molecular relaxado. Em todos os casos, foi utilizado o modelo de substituição nucleotídica GTR+I, determinado pelo teste AIC realizado no software MrModeltest. Todas as análises foram realizadas com 100.000.000 gerações, amostradas a cada 5.000, com *burn-in* de 10%. Os resultados obtidos foram avaliados no programa Tracer 1.6. Para a visualização dos resultados do GMYC, foram utilizados os pacotes APE (PARADIS et al., 2004) e SPLITS (EZARD et al., 2009), no software R (R Core Team, 2018).

(3) Utilizamos também a análise das distâncias genéticas pareadas dentro e entre os grandes clados recuperados na análise do item (1). As distâncias genéticas foram calculadas segundo o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), utilizando o programa MEGA6. Para a visualização da existência do *barcode gap*, foram construídos gráficos de distribuição das divergências genéticas.

(4) Por fim, realizamos a delimitação das espécies utilizando o programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE et al., 2011). Os valores de divergência genética encontrados para cada matriz individual dos genes COI e COII foram testados no programa ABGD para confirmar a existência de *barcode gap* que divide os dados no número máximo de grupos (ou seja, número máximo de potenciais espécies), de tal forma que o valor da distância entre os dados seja maior que um determinado limiar.

Após a delimitação das espécies, uma árvore cronofilogenética foi construída para os dados concatenados no programa BEAST v.1.8.0. O tempo de divergência entre as espécies foi estimado usando o relógio molecular relaxado (DRUMOND et al., 2006), com taxas de substituição para os genes mitocondriais COI e COII obtidas por Cenzi De Ré et al. (2014) para o grupo *cardini* de *Drosophila* ($7{,}42\times10^{-3}$ e $1{,}47\times10^{-2}$ Myr^{-1}, respectivamente). Os modelos de substituição nucleotídica escolhidos pelo teste AIC realizado no programa jModelTest (POSADA, 2008) foram atribuídos individualmente para cada gene, com parâmetros desassociados. Esta análise compreendeu 50 milhões de interações MCMC, amostrando a cada 10 mil. Os resultados obtidos foram avaliados no Tracer 1.6 e resumidos no TreeAnnotator.

2.4 Análises Ecológicas

Mapas de distribuição potencial, passados e atuais, foram construídos utilizando estratégias relacionadas a modelagem de nicho ecológica (ENM). Tais estratégias relacionam os registros já conhecidos para as espécies alvo com parâmetros abióticos locais a fim de projetar áreas de adequabilidade. Para a obtenção dos registros de ocorrência de cada uma das espécies amostradas, foram utilizados dados de distribuição geográfica disponíveis no banco de dados TaxoDros (BÄCHLI, 2018), bem como os registros obtidos neste estudo. Os mapas de distribuição potencial foram construídos por meio do algoritmo *maximum entropy* implementado no programa MAXENT (PHILLIPS et al., 2006). As projeções de distribuição foram construídas para o presente e para o último máximo glacial (LGM), utilizando as mesmas variáveis abióticas utilizadas por Cenzi De Ré et al. (2014) (precipitação do trimestre mais úmido (Bio-15); precipitação do trimestre mais seco (Bio-17); precipitação do trimestre mais quente (Bio-18); precipitação do trimestre

mais frio (Bio-19); média das temperatura mensais (Bio-2); temperatura máxima do mês mais quente (Bio-5); e, temperatura do mês mais frio (Bio-6)), disponíveis no banco de dados WORLDCLIM 1.4 (HIJMANS et al., 2005), com resolução de 2,5 min.

Finalmente, dados relacionados ao uso de recursos obtidos nesse trabalho foram adicionados a dados registrados na literatura (BLANCHARD, 1938; FROTA-PESSOA, 1952; BRNCIC, 1962; MONTAGUE & KANESHIRO, 1982; CHASSAGNARD & TSACAS, 1992; GOÑI et al., 1998; SCHMITZ & HOFMANN, 2005; BLAUTH & GOTTSCHALK, 2007; ROCK & TIDON, 2008; SCHMITZ & VALENTE, 2018), a fim de avaliar os padrões de sobreposição de nicho biótico entre as espécies. Essa análise foi realizada no programa EcoSimR 7.72 (GOTELLI & ELLISON, 2013), através dos índices de Czekanowski (C) e Pianka (P), com 1,000 permutações realizadas através do algoritmo RA3.

3 Resultados

3.1 Identificação e características morfológicas das espécies

Com base na morfologia do edeago foram identificados 104 indivíduos machos pertencentes a três espécies do grupo *lutzii*: 56 indivíduos de *D. denieri*, 38 de *D. lutzii* e 10 indivíduos com morfologia similar a *D. alei*. Esses indivíduos emergiram de espécies de plantas pertencentes a três gêneros de três famílias diferentes (Tabela 1).

Em relação à morfologia externa, as três espécies apresentam coloração escura, próxima a um tom marrom-café. As asas são hialinas. Os últimos tergitos abdominais de *D. denieri* são mais escuros do que os de *D. alei* e *D. lutzii* (Figura 2). Em *D. alei* e *D. denieri*, os dentes do surstilo estão dispostos em forma de ‘S’, diferentemente de *D. lutzii* que os apresenta dispostos em linha reta (Figura 3).

O edeago das três espécies é levemente invaginado no ápice, expandido ventralmente a partir da metade anterior. A metade posterior apresenta um par de expansões laterais marginalmente serrilhadas, com a extremidade final pontiaguda em *D. alei* e *D. denieri*, diferentemente de *D. lutzii*. As expansões laterais apresentam a forma de triângulo em *D. alei* e *D. denieri*, porém arredondado em *D. lutzii*. O apodema é ligeiramente flexionado e expandido anteriormente nas três espécies.

3.2 Análises genéticas

Os genes mitocondriais *COI* e *COII* foram caracterizados para 99 e 63 espécimes, respectivamente, abrangendo 11 localidades no total (11 para o gene *COI* e seis para o gene *COII*) (Tabela 1). As matrizes de alinhamento finalizaram em 654 bp, para o *COI*, e 673 bp, para o *COII*.

As análises filogenéticas realizadas por meio da abordagem Bayesiana individualmente para cada um dos genes suportaram a monofilia recíproca entre OTU´s. Os três clados recuperados foram bem suportados, com algumas politomias internas em ambos os genes (Figura S1, S2). As análises de GMYC também sugeriram a presença de três clusters de máxima verossimilhança para ambos os marcadores, em perfeita concordância com os clados recuperados na AB (Figura S1, S2). Na análise *single threshold*, no entanto, os intervalos de confiança recuperados para *COI* foram maiores que os de *COII* (3-13, $p<0.01$; 3-3, $p<0.01$, respectivamente).

Na análise de ABGD (PUILLANDRE et al., 2011) utilizando valor padrão do programa (1.5%), foi possível recuperar três diferentes grupos de sequências para *COI* e para *COII*, em praticamente todas as partições iniciais. Os dados de *COI* apresentaram *priors* para divergência intraespecífica máxima variando de 0.0017 a 0.0599, e para *COII* os valores foram de 0.0017 a 0.0359.Esses resultados, somados às avaliações morfológicas dos espécimes (descritas acima) resultaram na associação das três unidades taxonômicas a *D. lutzii*, *D. denieri* e *D. alei*.

Na análise de divergência genética e identificação de *barcode gap, D. denieri* apresentou os maiores valores de distância genética intraespecífica (0.011 para *COI* e 0.006 para *COII*), e a comparação entre *D. alei* e *D. denieri* resultou nos menores valores interespecíficos (0.058 para *COI* e 0.043 para *COII*) (Tabela 2). Assim, é possível perceber que a amplitude dos valores de distância intraespecíficos foi bem menor que a amplitude dos valores de distância interespecíficos, ilustrando a presença de um *barcode gap* (Figura 4).

Uma vez estabelecida a delimitação das espécies, a árvore cronofilogenética construída com base na análise simultânea das sequências de *COI* e *COII* reforçou mais uma vez a presença de monofilia recíproca entre as três espécies. Segundo esta análise, *D. alei* e *D. denieri* constituem espécies-irmãs, que divergiram há cerca

de 2.9 Mya (Figura 5). *Drosophila lutzii,* por outro lado, aparece como uma ramificação basal, tendo sua divergência datada para aproximadamente 6.7 Mya (Figura 5).

3.3 Modelagem de Nicho e Sobreposição de nicho biótico e abiótico

Todos os modelos de adequabilidade ambiental gerados apresentaram valores de AUC superiores a 0.91. Tanto para o presente, quanto para o passado, esses modelos suportam uma ampla distribuição geográfica para *D. lutzii*, com uma distribuição geográfica mais reduzida para *D. alei* e *D. denieri* (Figura 6). Globalmente, *D. alei* parece estar restrita à América do Sul, com registros atuais para o Chile, Peru e Brasil (VILELA,1986; GOÑI et al., 1998) e manchas de adequabilidade atual e passada no Chile, Peru, Sul da América do Sul e Nordeste do Brasil (Figura 6). Semelhante à *D. alei*, *D. denieri* apresenta registros atuais na Argentina, Brasil e Uruguai (BRNCIC, 1962) e manchas de adequabilidade atual e passada na Argentina, Uruguai, Sul e Nordeste do Brasil (Figura 6). Em contraste, *D. lutzii* se estende para o norte, da região Neotropical para Neoartica, com registros no Brasil, Costa Rica, Cuba, Jamaica, México, Porto Rico, Sul dos EUA e Havaí (JOHNSON, 1919; STURTEVANT, 1921; MONTAGUE & KANESHIRO, 1982; CHASSAGNARD & TSACAS, 1992; HARDY, 1982; O'GRADY & KIDWELL, 2002; ROCK & TIDON, 2008; SCHMITZ & VALENTE 2018), e manchas de adequabilidade passadas e atuais por praticamente toda a América do Sul e parte da América do Norte (Figura 6).

O resultado da contribuição das diferentes variáveis abióticas nos modelos gerados varia entre as espécies (Figura 7). *Drosophila alei* parece ser extremamente influenciada pela precipitação do trimestre mais úmido (Bio-16); *D. denieri* é influenciada principalmente pela sazonalidade de precipitação (Bio-15) e amplitude térmica diária (Bio-2). Já *D. lutzii* é influenciada tanto pela precipitação do trimestre mais úmido (Bio-16) quanto pela temperatura máxima do mês mais quente (Bio-5). Embora tanto *D. alei* quanto *D. lutzii* sofram a influência de Bio-16, as curvas de resposta obtidas pelas mesmas são bastante diferentes, demonstrando uma maior sensibilidade da primeira com relação a maiores níveis de umidade (Figura 8). Para Bio-5, por outro lado, enquanto *D. alei-like* e *D. denieri* apresentam maiores

adequabilidades em temperatura maiores, *D. lutzii* parece apresentar maior adequabilidade em regiões com valores intermediários para esta variável (Figura 8).

Por fim, os valores de sobreposição de nicho biótico e abiótico não diferiram muito entre os índices analisados e estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Esses resultados demonstram que *D. alei* e *D. denieri* apresentam os maiores níveis de sobreposição tanto de nicho biótico como de nicho abiótico. Ainda, segundo os testes de equivalência de nicho abiótico, nenhuma comparação rejeitou a hipótese nula, sugerindo a equivalência de nicho entre as espécies.

4 Discussão

Em nosso estudo, foi possível demonstrar a ocorrência de três espécies do grupo *lutzii* no Brasil, sendo que até então o país apresentava registros para apenas duas espécies do grupo, *Drosophila lutzii* e *D. denieri* (BLAUTH & GOTTSCHALK, 2007; SCHMITZ & HOFMANN, 2005; ROCK & TIDON, 2008; SCHMITZ & VALENTE, 2018). Nossos dados morfológicos sugerem que a terceira espécie pertence a *D. alei* Brncic, 1962, uma vez que os espécimes analisados encaixam-se na descrição apresentada por Vilela & Bächli (2002a). Além disso, tanto os dados morfológicos quanto os dados genéticos desta espécie demonstram que a mesma apresenta um morfotipo e um cluster genético distinto daquele apresentado por *D. denieri* e *D. lutzii*.

O primeiro *insight* sobre a ocorrência de *D. alei*, no entanto, só foi possível graças à utilização da taxonomia molecular, visto que os principais caracteres diagnósticos da espécie são extremamente semelhantes àqueles de *D. denieri* (VILELA & BÄCHLI, 2002a). De fato, a morfologia do edeago é idêntica entre as três espécies do grupo *lutzii* aqui amostradas, e isto dificulta bastante as diferenciações, uma vez que esta é a principal característica diagnóstica de espécies crípticas na família Drosophilidae (KULLIKOV et al., 2004; FRANCO et al., 2006, 2008). Isto é especialmente interessante, uma vez que, em artóprodes, a genitália masculina costuma evoluir a taxas particularmente altas, sendo um dos primeiros órgãos a divergir durante a especiação (SOTO et al., 2007). Para Futuyma (2009), por exemplo, o isolamento reprodutivo dentro de uma espécie ancestral é o principal mecanismo que leva a especiação entre espécies próximas. Vale ressaltar que, neste caso, é

provável que outras barreiras de isolamento reprodutivo estejam atuando mais diretamente. De fato, em Drosophilidae, um dos mecanismos de isolamento reprodutivo mais frequentemente encontrado entre espécies ocorre através do reconhecimento específico por meio de sinais visuais, químicos e acústicos (ASPI, 2000; SWAMURA & TOMARU, 2002; GRILLET et al., 2012).

Diversas metodologias moleculares que utilizam premissas de DNA Barcode, ou ligadas a genes mitocondriais, mostraram sucesso em responder problemas taxonômicos, especialmente quando a especiação ocorre na ausência de diferenciação morfológica (MACHADO, 2015; LOW et al., 2015; FONSECA et al., 2017). Neste estudo, a análise dos genes COI e COII conseguiram atingir os dois principais pré-requisitos da técnica de DNA Barcode (HEBERT et al., 2005): (1) a presença de monofilia recíproca entre as espécies avaliadas, recuperada através da análise Bayesiana e da árvore cronofilogenética; e (2) a presença de um intervalo entre faixas de distância intra e interespecífica, recuperada por meio das análises de distância genética e ABGD. Ressalta-se aqui que a utilização de dois genes mitocondriais é importante para eliminar a possibilidade de interferência de artefatos associados a numts (cópias nucleares de DNA mitocondrial), uma vez que, dificilmente, as regiões de DNA mitocondrial integradas no genoma nucleares abrangem mais do que alguns pares de bases (RICHLY & LEISTER, 2004). Assim, em caso de numts, seria esperado que os dois genes apresentassem sinais incongruentes, o que não foi detectado no presente estudo.

Nas comparações moleculares, tanto *D. alei-like* quanto *D. denieri* apresentaram distâncias interespecíficas altas quando comparadas com *D. lutzii*, mostrando-se mais distantes geneticamente dessa espécie. De fato, o resultado da análise cronofilogenética sugerem que *D. lutzii* teve a sua divergência em 6.4 Mya, enquanto que *D. alei* e *D. denieri* parecem ter divergido muito mais recentemente, em torno de 2.9 Mya. Estes resultados sugerem que a diversificação do grupo ocorreu no período Neogeno, abrangendo o Mioceno Tardio e o Plioceno (COHEN et al., 2013). Estimativas de tempos de divergência e análises biogeográficas indicam que os principais eventos ligados a diversificação de diferentes linhagens da família Drosophilidae ocorreram a partir do Oligoceno tardio ao Plioceno (TROCKMORTON, 1975; ROBE et al., 2010; IZUMITANI et al., 2018), em concordância com os resultados aqui recuperados. A transição Mioceno/Plioceno foi uma época de mudanças ecológicas globais, marcadas por rotatividade de fauna e flora atribuída ao aumento

da sazonalidade e maior aridez (JANIS, 1993). Interessantemente, estas estão entre as variáveis que demonstraram maior importância na reconstrução dos mapas de distribuição potencial das três espécies, ainda que de forma alternada.

Para ajudar a desvendar o suposto cenário espaço-temporal associado à especiação das três espécies, foram construídos mapas de adequabilidade ambiental projetados para o passado e para o presente. Os resultados da Modelagem de Nicho mostram que, com exceção de *D. lutzii*, as espécies apresentam áreas de distribuição potencial restritas e sobrepostas. Mais do que isso, a projeção de *D. alei-like* para o LGM mostrou a ausência de áreas de adequabilidade ambiental na região sul do Brasil. Isso permite inferir que, possivelmente, esta espécie expandiu sua distribuição recentemente para o sul do Brasil, de forma que a atual simpatria reflete um contato secundário entre *D. alei-like* e *D. denieri*. Esse resultado está em concordância com os resultados obtidos a partir das randomizações executadas no programa EcoSim, onde a ausência de significância indica que o compartilhamento de recursos não é diferente do esperado ao acaso, de forma que a competição não parece ter levado ao um maior particionamento de recursos ao longo da história evolutiva das espécies.

Os resultados obtidos no EcoSim são especialmente curiosos em vista da sobreposição de nicho observada entre as espécies e da microssimpatria frequentemente detectada entre elas com relação à escolha das suas flores hospedeiras. Em nossas coletas, *D. alei-like*, *D. denieri* e *D. lutzii* nasceram de três gêneros de plantas, pertencentes a três famílias: Cucurbitaceae, Convolvulaceae e Solanaceae. Esses resultados são congruentes com Schmitz e Valente (2018), que amostraram *D. lutzii* e *D. denieri* em cinco diferentes famílias de plantas: Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Passifloraceae e Solanacae. No entanto, aqui, *D. alei-like* e *D. denieri* foram encontradas compartilhando recurso em flores de *I. alba* e *B. suaveolens*, e *D. denieri* e *D. lutzii* em flores *I. purpurea* no extremo sul do Brasil. Microsimpatria e compartilhamento de recurso já foram relatados anteriormente no Sul do Brasil para espécies do grupo *flavopilosa*, *D. cestri*, *D. incompta* e *D. flavopilosa*, as quais ovipositam exclusivamente em flores do gênero *Cestrum* sp. (Solanaceae) (NAPP & BRNCIC, 1978). No entanto, o compartilhamento de recurso fora até o momento apenas ocasionalmente registrado entre *D. lutzii* e *D. denieri* (SCHMITZ & HOFMANN 2005, SCHMITZ & VALENTE 2018), o que sugere a existência de competição entre essas espécies. Desta forma, a segregação espaço-temporal deve fornecer a estratégia necessária para permitir a coexistência, em pelo

menos algumas áreas. Porém, é possível que exista segregação em escala microecológica e/ou microespacial, como encontrado para as espécies do grupo *flavopilosa* (BRNCIC, 1966; NAPP & BRNCIC, 1978).

Este estudo ilustra a importância de abordagens moleculares para a delimitação de espécies crípticas de Drosophilidae. Além disso, os dados moleculares, somados às informações morfológicas e ecológicas geradas para as três espécies do grupo *lutzii* de ocorrência no Brasil, permitiram um maior esclarecimento acerca da história evolutiva destas interessantes espécies de ecologia restrita a flores, além de levantar importantes questionamentos para estudos futuros.

Referências

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716–723, 1974.

ASPI, J. Inbreeding and outbreeding depression in male courtship song characters in *Drosophila montana.* **Heredity**, v. 84, p. 273-284, 2000.

BÄCHLI, G. TaxoDros — The database on taxonomy of Drosophilidae. Database 2018/03; TaxoDros v1.04, available at http://www.taxodros.uzh.ch/ (accessado em 9 Dezembro de 2018).

BEKKER, E. L.; KARABANOV, D. P.; GALIMOV, Y. R. ; KOTOV, A. A. DNA Barcoding Revels High Cryptic Diversity in the North Eurasian *Moina* Species (Crustacea: Cladocera). **Plos One**, v. 11, n. 8, p. 1-19, 2016.

BLANCHARD, E. E. Descripciones y anotaciones de Dipteros argentines. **Anales de la Sociedad Científica Argentina**, v.126, p. 345-386, 1938.

BLAUTH, M. L.; GOTTSCHALK, M. S. A novel record of Drosophilidae species in the Cerrado biome of the state of Mato Grosso, west-central Brazil. ***Drosophila* Information Service**, v. 90, p. 90-96, 2007.

BRNCIC, D. Ecological and cytogenetical studies of *Drosophila flavopilosa*, a Neotropical species living in *Cestrum* flowers. **Evolution**, v. 20, n. 1, p. 16-29, 1966.

BRNCIC, D. Chromosomal structure of populations of *Drosophila flavopilosa* studied in larvae collected in their natural breeding sites. **Chromosoma**, v. 13, p. 183-195, 1962.

CENZI DE RÉ, F.; WALLAU, G. L.; ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S. Characterization of the complete mitochondrial genome of flower-breeding *Drosophila incompta* (Diptera, Drosophilidae). **Genetica**, v. 142, p. 525-535, 2014.

CHASSAGNARD M. T. & TSACAS L. *Drosophila* (*Phloridosa*) *lutzii* Sturtevant (Diptera: Drosophilidae), espécie antófila de México. **Folia Entomológica Mexicana**, v. 85, p. 95-105, 1992.

CLARE, E. L.; LIM, B. K.; FENTON, M. B.; HEBERT, P. D. N. Neotropical Bats: estimating species diversity with DNA Barcodes. **Plos One**, n. 6, v. 11, e22648, 2011.

COHEN, K. M.; FINNEY, S. C.; GIBBARD, P. L.; FAN, J-X. The ICS International Chronostratigraphic Chart. **Episodes**, v. 36, p. 199-204, 2013.

CRAWFORD, A. J.; CRUZ, C.; GRIFFTH, D.; ROSS, H.; IBÁÑEZ, R.; LIPS, K. R.; DRISKELL , A. C.; BERMINGHAM, E.; CRUMP, P. DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 6, p. 1005-18, 2012.

DINCA, V.; MONTAGUD, S.; TALAVERA, G.; HERNÁNDEZ-ROLDÁN, J.; MUNGUIRA, M. L.; GARCÍA-BARROS, E.; HEBERT, P. N. D; VILA, R. DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. **Scientific Reports**, 5(12395): p. 1-12, 2015.

DOMINGOS, F. M. C. B.; COLLI, G. R.; LEMMON, A.; LEMMON, E. M.; BEHEREGARAY, L. B. In the shadows: Phylogenomics and coalescent species delimitation unveil cryptic diversity in a Cerrado endemic lizard (Squamata: Tropidurus). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 107, p. 455-465, 2017.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 1969–1973, 2012.

DUDA, O. Die südamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter Berücksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen Arten. **Archiv fur Naturgeschichte**, v. 91, p. 1-228, 1927.

ELDERINK, C.; CLEWING, C.; NDEO, O. W.; ALBRECHT, C. Molecular phylogeny and DNA barcoding confirm cryptic species in the African freshwater oyster *Etheria elliptica* Lamarck, 1807 (Bivalvia: Etheriidae).**Biological Journal of Linnean Society**, v. 118, p. 369-381, 2016.

EZARD, T.; FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. (2009). Splits: Species' Limits by Threshold Statistics. R package version 1.0-14/r31. http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

FONSECA, P. M.; LORETO, E. L.; GOTTSCHALK, M. S.; ROBE, L. J. Cryptic diversity and speciation in the Zygothrica genus group (Diptera, Drosophilidae): the case of Z. vittimaculosa Wiedemann. **Insect Systematics & Evolution**, v. 48, n. 3, p. 285-313, 2017.

FRANCO, F. F.; PRADO, F. M.; SENE, L. F.; COSTA, M. H.; MANFRIN. Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related cactophilic species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in South America. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 203-212, 2006.

FRANCO, F. F.; SOTO, I. M.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Phenotypic Variation of the Aedeagus of *Drosophila serido* Vilela & Sene (Diptera: Drosophilidae). **Systematics, Morphology and Physiology**, v. 37, n. 5, p. 558-563, 2008.

FROTA-PESSOA, O. Flower-feeding Drosophilidae. **Drosophila Information Service**, v. 26, p.101-102, 1952.

FUTUYMA, D.J. (2009). Evolution, 2nd edn. Sinauer Associates: Sunderland, MA.

GOÑI, B.; MARTINEZ, M. E.; VALENTE, V. L. S.; VILELA, C. R. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 42, p. 131-140, 1998.

GOTELLI, N. J. & ELLISON, A. M. (2013) *EcoSimR: Null Models for Ecology*, available online at http://www.uvm.edu/~ngotelli/EcoSim/EcoSim.html (acessado em 10 de Janeiro 2019).

GOTELLI, N.J. & GRAVES, G.R. Niche overlap. In: Gotelli, N.J. & Graves, G.R. (Eds) *Null Models in Ecology*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p. 65–94, 1996.

GRILLET, M.; EVERAERTS, C.; HOUOT, B.; RITCHIE, M. G.; COBB, M., FERVEUR, J-F. Incipiet speciation in *Drosophila melanogaster* involves chemical signals. **Scientific Reports**, v. 2, n. 224, p. 1-11, 2012.

GRIMALDI D. A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 197, p. 103-268, 1990.

HARDY, D. E. *Drosophila (Phloridosa) floricola* Sturtevant. **Procedings of the Hawaiian Entomological Society**, v. 24, n.7, 1982.

HEBERT, P. D. N. & GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology,** v. 54, p. 852–859, 2005.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313–321, 2003.

HIJMANS, R. J.; CAMERON, S. E.; PARRA, J. L.; JONES, P. G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology***,* v. 25, p. 1965–1978, 2005.

HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

IFTIKHAR, R.; ASHFAQ, M.; RASOOL, A.; HEBERT, P. D. N. DNA Barcode Analysis of Thrips (Thysanoptera) Diversity in Pakistan Reveals Cryptic Species Complexes. **Plos One**, v. 11, n. 1, e0146014, 2016.

IZUMITANI, H.F.; KUSAKA, Y.; KOSHIKAWA, S.; TODA, M.J.; KATOH, T. Phylogeography of the Subgenus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): Evolutionary History of Faunal Divergence between the Old and the New Worlds. **Plos One***,* v. 11, n. 17, e0160051, 2018.

JANIS, C. M. Tertiary mammal evolution in the contexto of changing climates, vegetation, and tectonic events. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 467-500, 1993.

JANZEN, D.; BURNS, J. M.; QIAN, C.; HALLWACHSA, W.; DAPKEVA, T.; MANJUNATHE, R.; HAJIBABAEIE, M.; HEBERT, P.; GRISHINC, N. V. Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology. **PNAS Early Edition**, v. 114, n. 31, p. 8313-8318, 2017.

JOHNSON, C. W. A revised list of the Diptera of Jamaica. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 41, p. 421-449, 1919.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

LOW, V. L; TAKAOKA, H.; PRAMUAL, P.; ADLER, P. H.; YA'COB, Z.; HUANG, Y.; DA PHAM, X.; RAMLI, R.; CHEN, C. D.; WANNAKET, A.; SOFIAN-AZIRUN, M. Delineating taxonomic boundaries in the largest species complex of black flies (Simuliidae) in the Oriental Region. **Scientific Reports**¸ v. 6, n. 20346, 2015.

MACHADO, S.; JUNGES DOS SANTOS, J. P.; FONSECA, P. M.; BOLZAN, A. R.; DAVID, J.; LORETO, E. L. S.; GOTTSCHALK, M. S.; ROBE, L. J. Neotropical mycophagous drosophilids (Diptera: Drosophilidae): DNA barcoding as a way of overcoming the taxonomic impediment. **Insect Conservation and Diversity**, v. 10, p. 271-281, 2017.

MONTAGUE, J. R.; KANZESHIRO K. Y. Flower-breeding species of Hawaiian drosophilids in an early of sympatry. **Pacific Insects**, v. 24, p. 209-213, 1982.

NAPP, M. & BRNCIC, D. Eletrophoretic variability in two closely related Brazilian species of the *flavopilosa* species group of *Drosophila.* **Genetica**, v. 1, p. 1-10, 1978.

NYLANDER, J.A.A. (2008) *MrModeltest v2.3*. Program distributed by the author.

O'GRADY, P. M. & KIDWELL, M. G. Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 22, p. 442-453, 2002.

PARADIS, E., CLAUDE, J., STRIMMER, K. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. **Bioinformatics***,* v. 20, p. 289-290, 2004.

PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling***,* v. 190, p. 231–259, 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution***,* v. 25, p. 1253-1256, 2008.

PUILLANDRE, N. et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 1864-1877, 2011.

RABOSKY, D. L. Review Article: Reproductive isolation and the causes of speciation rate variation in nature*.* **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 118, p. 13-25, 2016.

RICHLY, E. & LEISTER, D. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, 2004.

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**, v. 48, p. 310–321, 2010.

ROCK, F. & TIDON, R. Eight new records of drosophilids (Insecta; Diptera) in the Brazilian savanna. ***Drosophila* Information Service**, v. 91, p. 94-98, 2008.

SCHMITZ H. J. & VALENTE V. L. S. (2018) The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the Brazilian fauna. bioRxiv 402834 https://doi.org/10.1101/402834

SCHMITZ, H. J. & HOFMANN P. R. P. First record of subgeus *Phloridosa* of *Drosophila* in southern Brazil, with notes on breeding sites. **Drosophila Information Service**, v. 88, p. 97-101, 2005.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. 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**, v. 87, p. 651–701, 1994.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; FANARA, J. J.; HASSON, E. Evolution of male genitália: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids**. BMC Evolutionary Biology**, v. 77, p. 1-11, 2007.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology***,* v. 5, p. 233–241, 1996.

STURTEVANT, A. H. The classification of the genus *Drosophila,* with descriptions of nine new species. **University of Texas at Austin Bulletins and Publications**, v.3, n. 421, p. 51-55, 1942.

STURTEVANT, A. H. Noteson North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 9, p. 323-343, 1916.

STURTEVANT, A. H. The North American species of *Drosophila*. **Carnegie Institute of Washington Publication, Washington**, p. 1-150, 1921.

SWAMURA, K. & TOMARU, M. Biology of reproductive isolation in *Drosophila*: toward a better understanding of speciation. **Population Ecology**, v. 44, p. 209-219, 2002.

TAMURA, K.; GLEN, S.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

THROCKMORTON, L. H. (1975) The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: King, R.C. (Ed.) *Handbook of Genetics, Volume 3*. Plenum, New York, NY, p. 421–469.

VAL, F. C. The male genitália of some Neotropical *Drosophila:* notes and illustrations. **Papeis avulsos de Zoologia***,* v. 34, p. 309-347, 1982.

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

VILELA, C. R. & BACHLI, G. On the identity of four poorly known species of neotropical Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 75, p. 197-210, 2002a.

VILELA, C. R. & BÄCHLI, G. Two new North American *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 75, p. 211-221, 2002b.

VILELA, C. R. & PIETRO D. A new Costa Rican species of *Drosophila* visiting inflorescences of the hemi-epiphytic climber *Monstera lentii* (Araceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 3, p. 225-231, 2018.

VILELA, C. R. The type-series of *Drosophila denieri* Blanchard (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 30, n. 2, p. 223-226, 1986.

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

Figuras

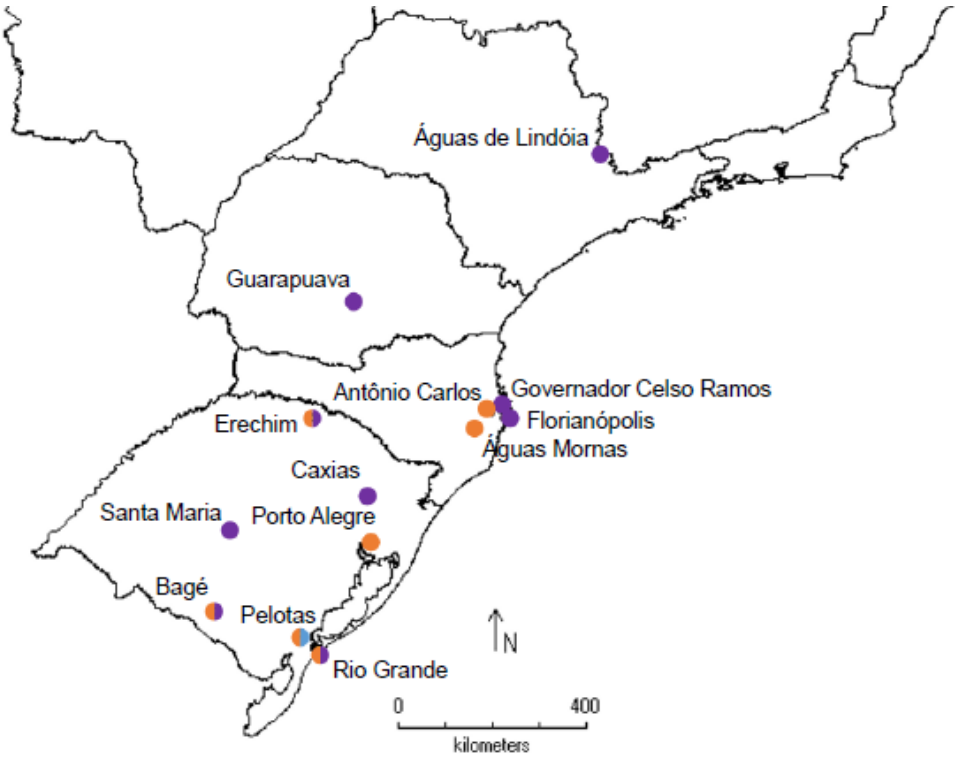


Figura 1. Mapa de coleta na região Sul e Sudeste do Brasil, apresentando as localidades de distribuição das espécies *Drosophila alei* (azul), *D. denieri* (laranja) e *D. lutzii* (roxo).

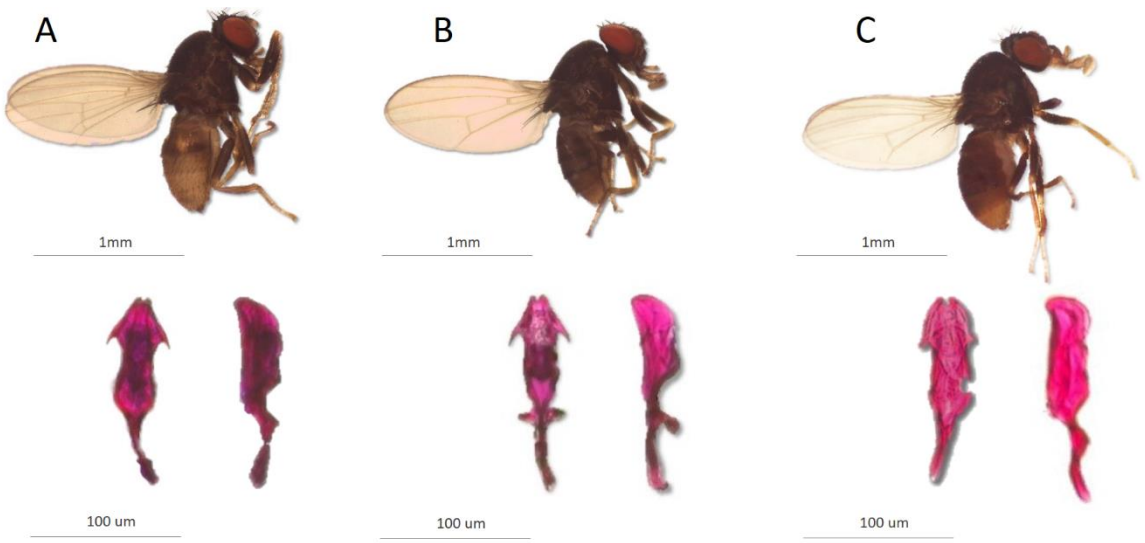


Figura 2. Morfologia externa lateral de *D. alei* (A superior), *D. denieri* (B superior) e *D. lutzii* (C superior); edeago em vista ventral e lateral das espécies *D. alei-like* (A inferior), *D. denieri* (B inferior) e *D. lutzii* (C inferior).

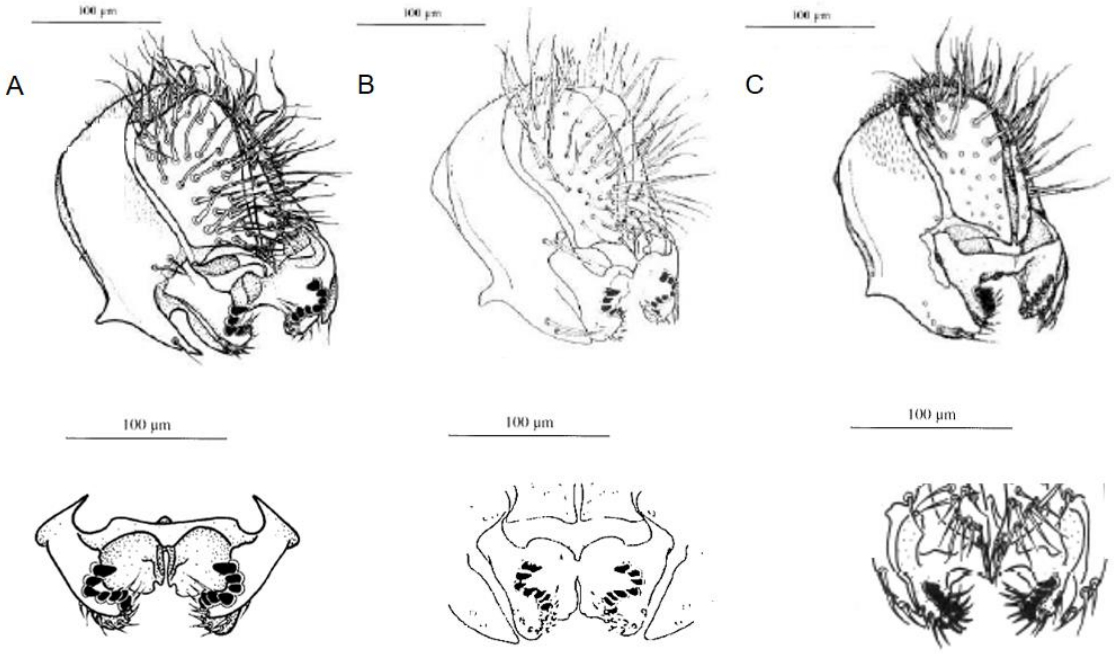


Figura 3. Terminália externa de *Drosophila alei* (a), *D. denieri* (b) e *D. lutzii*. Hipandrium, cerco e surstylus em vista lateral (superior) e surstylus isolado em vista ventral (inferior). Modificado a partir de Vilela (1984, 1986); Vilela & Bächli (2002a, 2002b).

Figura 4. Gráficos de distribuição dos intervalos de divergência genética intraespecífica (vermelho) e interespecífica (verde) em relação a frequência relativa das comparações para os genes mitocondriais *COI* e *COII*.

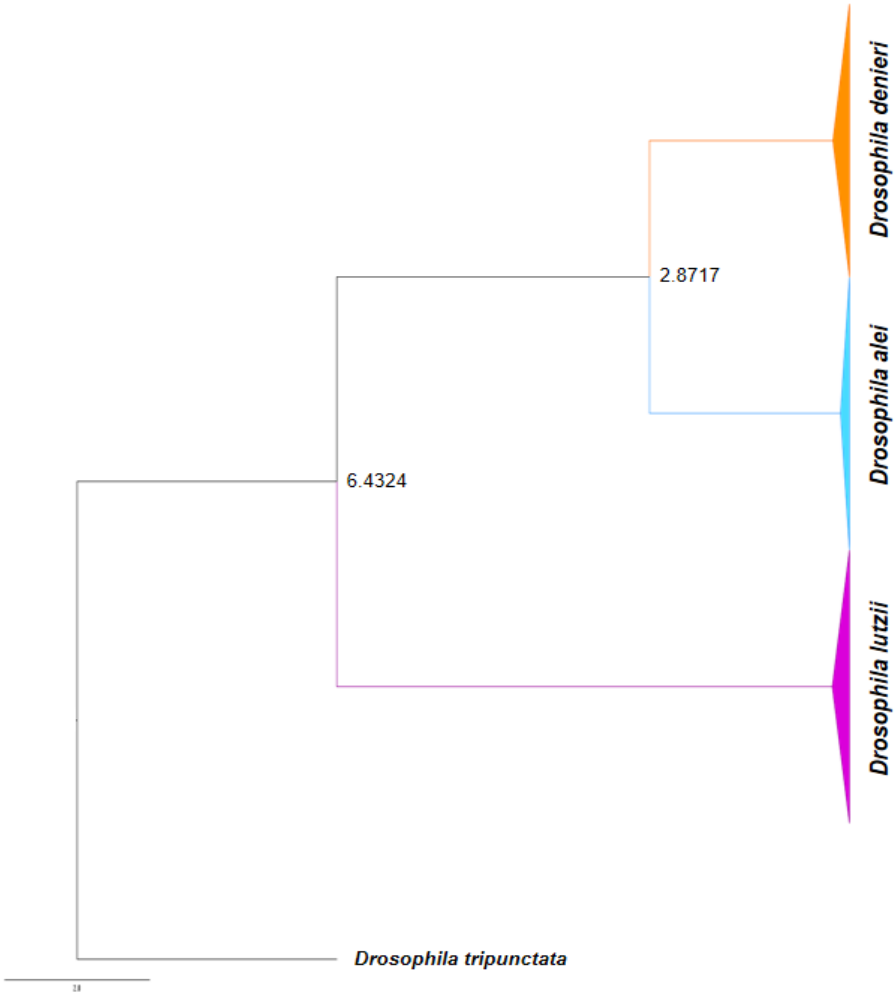


Figura 5. Árvore cronofilogenética baseada nas sequências concatenadas dos genes mitocondriais *COI* e *COII*. Os valores presentes nos nós referem-se as datações das divergências dentro dos clados.

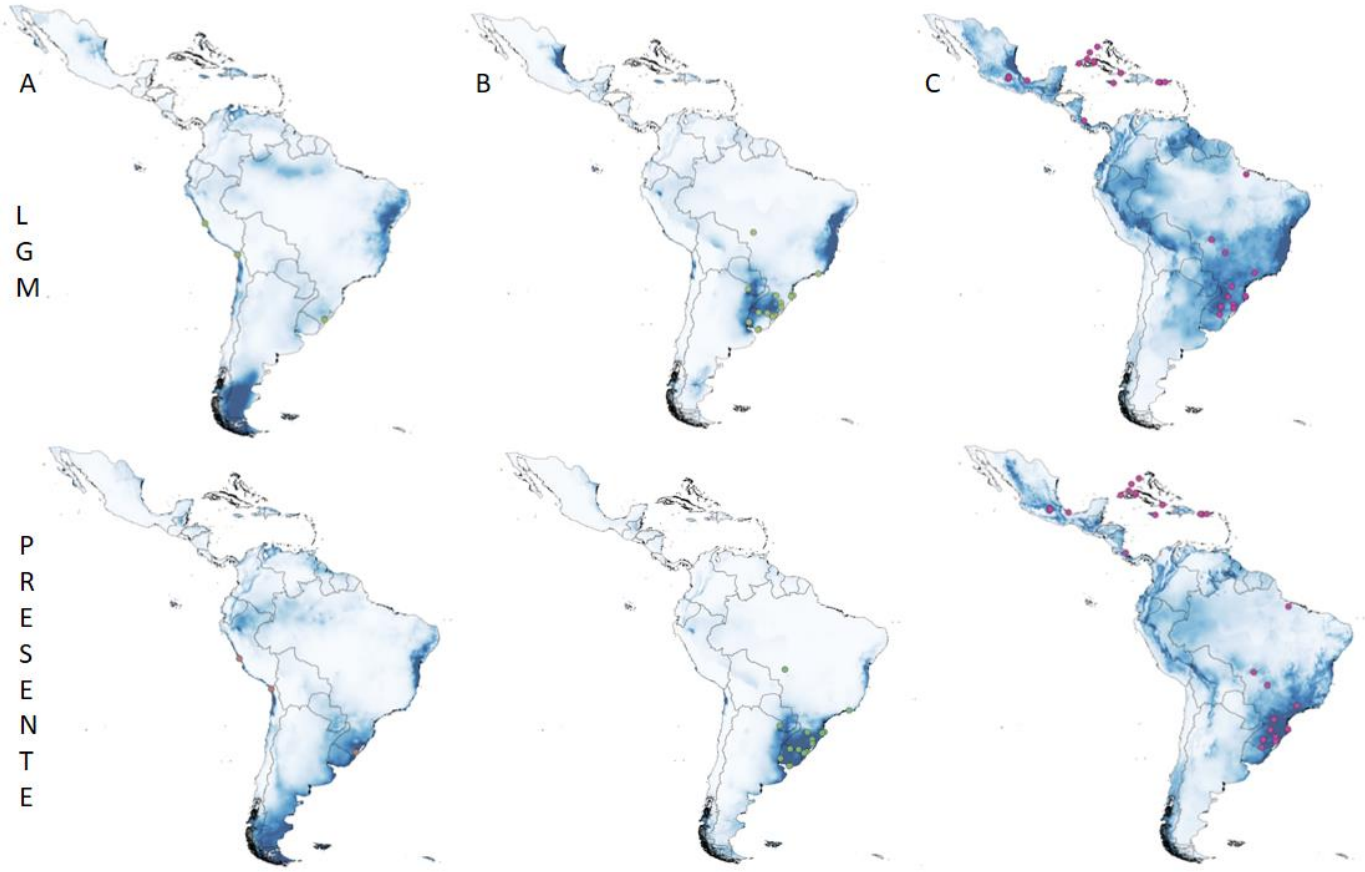


Figura 6. Mapas que descrevem os modelos de distribuição de adequação ambiental no último máximo glacial (LGM) (superior) e no presente (inferior) recuperados por MAXENT para (A) *D. alei*, (B) *D. denieri* e (C) *D. lutzii*.

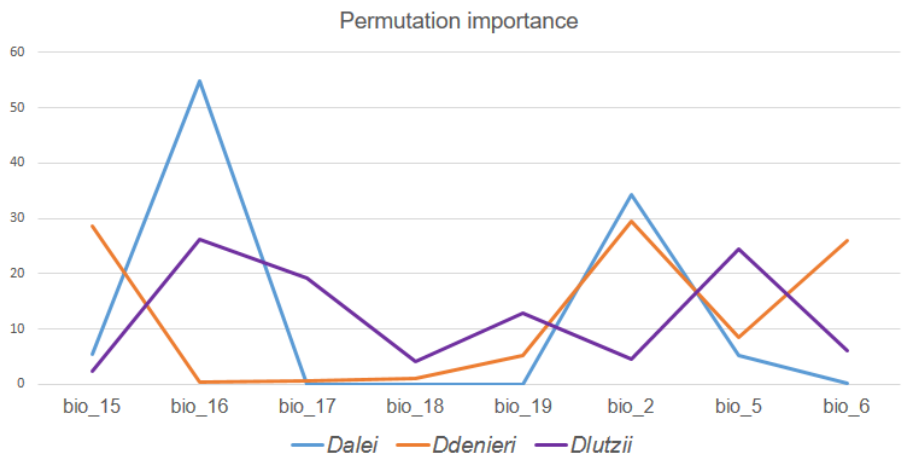


Figura 7. Contribuição das variáveis abióticas para *Drosophila alei* (azul)*, D. denieri* (laranja) *e D. lutzii* (roxo): sazonalidade de precipitação (Bio15), precipitação do trimestre mais úmido (Bio16), precipitação do trimestre mais seco (Bio17), precipitação do trimestre mais quente (Bio18), precipitação do trimestre mais frio (Bio19), amplitude térmica diária (Bio2), temperatura máxima do mês mais quente (Bio5) e temperatura do mês mais frio (Bio6)*.*

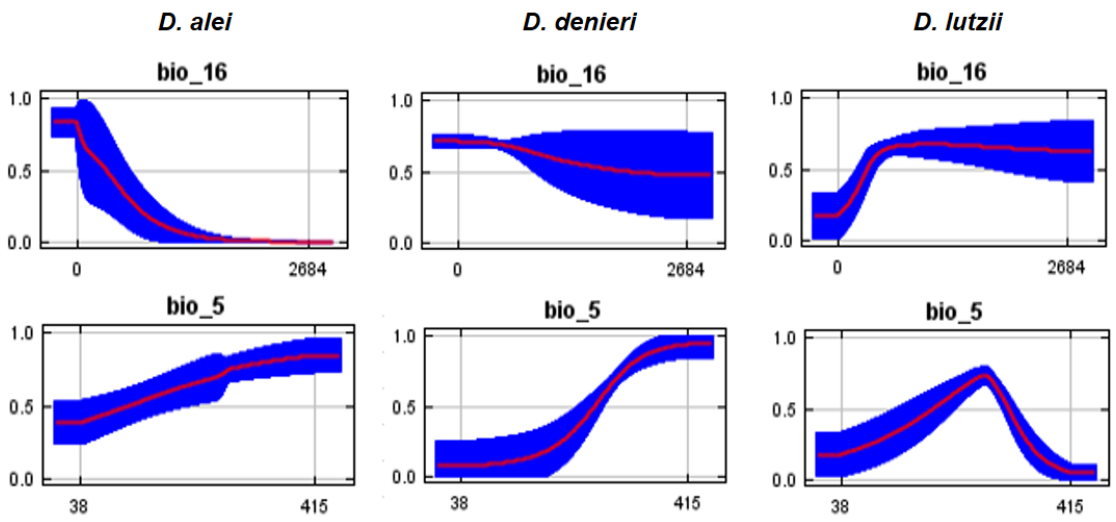


Figura 8. Intervalos de tolerância apresentados por *Drosophila alei, D. denieri e D. lutzii* no que diz respeito aos gradientes de precipitação do trimestre mais úmido (Bio16) e temperatura máxima do mês mais quente (Bio5).

Tabelas

Tabela 1. Espécimes de *D. alei, D. denieri* e *D. lutzii* usados para as análises morfológicas e genéticas, com suas respectivas identificações (ID) e informações de coleta.

ID	Espécie de drosofilídeo	N amostral	Flor hospedeira	Localidade	Latitude_y	Longitude_x
Dalei01-08	*D. alei*	8	*Ipomea alba*	Pelotas (RS)	31°46'08.4"S	52°25'05.1"W
Dalei09-10	*D. alei*	2	*Brugmansia suaveolens*	Pelotas (RS)	31°48'53.4"S	52°25'42.3"W
denieri_BAG01,02,03,05,06	*D. denieri*	5	*Ipomoea indica*	Bagé (RS)	31°20'06.5"S	54°06'41.3"W
denieri_BAG06-10	*D. denieri*	5	*Brugmansia suaveolens*	Bagé (RS)	31°20'08.5"S	54°06'19.6"W
denieri_BAG01	*D. denieri*	1	*Ipomoea indica*	Bagé (RS)	31°20'06.5"S	54°06'41.3"W
denieri_ERE01-10	*D. denieri*	10	*Curcubita maxima*	Erechim (RS)	27°35'36.0"S	52°13'45.3"W
denieri_FP01-10	*D. denieri*	10	*Brugmansia suaveolens*	Rio Novo - Águas Mornas (SC)	27°47'57.9"S	49°00'11.7"W
denieri_PEL02,04	*D. denieri*	2	*Ipomea alba*	Pelotas (RS)	31°46'08.4"S	52°25'05.1"W
denieri_PEL06	*D. denieri*	1	*Ipomea alba*	Pelotas (RS)	31°46'08.4"S	52°25'05.1"W
denieri_PEL08	*D. denieri*	1	*Brugmansia suaveolens*	Pelotas (RS)	31°48'53.4"S	52°25'42.3"W
denieri_RG01-10	*D. denieri*	10	*Ipomoea indica*	Rio Grande (RS)	32°06'17.2"S	52°55'01.2"W
denieri1,2,6	*D. denieri*	3		Porto Alegre (RS)	30°04'12.4"S	51°07'06.9"W
denieri3,4,5	*D. denieri*	3		Antônio Carlos (SC)	27°31'03.373"S	48°46'18.23"W
denieri7-11	*D. denieri*	5		Pelotas (RS)	31°45'18.3"S	52°23'01.1"W
lutzii_BAG02-10	*D. lutzii*	9	*Ipomoea indica*	Bagé (RS)	31°20'06.5"S	54°06'41.3"W
lutzii_ERE01-10	*D. lutzii*	10	*Ipomoea indica*	Erechim (RS)	27°37'21.6"S	52°16'02.7"W
lutzii_SM01-10	*D. lutzii*	10	*Ipomoea indica*	Santa Maria (RS)	29°41'05.3"S	53°48'10.7"W
lutzii1-4	*D. lutzii*	4		Águas de Lindóia (SC)	22°28'17"S	46°37'36"W
lutzii5	*D. lutzii*	1		Governador Celso Ramos (SC)	27°25'38.09"S	48°33'53.89"W
lutzii6	*D. lutzii*	1		Florianópolis (SC)	27°36'08.127"S	48°31'30.39"W
lutzii7-8	*D. lutzii*	2		Guarapuava (PR)	25°24'9.099"S	51°28'30.82"W
lutzii9	*D. lutzii*	1		Caxia do Sul (RS)	29°11'01.3"S	51°10'14.4"W

Tabela 2. Distâncias intra e interespecíficas recuperadas para as espécies *D.alei, D. denieri* e *D. lutzii* para os genes mitocondriais *COI* e *COII* (antes e depois da barra, respectivamente), utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros.

Espécies	Média	Mínimo	Máximo
D. alei	0.001 / 0.001	0.000 / 0.000	0.003 / 0.004
D. denieri	0.004 / 0.002	0.000 / 0.000	0.011 / 0.006
D. lutzii	0.002 / 0.001	0.000 / 0.000	0.006 / 0.003
D. alei vs *D. denieri*	0.061 / 0.048	0.058 / 0.043	0.066 / 0.053
D. ale vs *D. lutzii*	0.105 / 0.081	0.102 / 0.077	0.109 / 0.084
D. denieri vs *D. lutzii*	0.093 / 0.091	0.088 / 0.087	0.102 / 0.094

Tabela 3. Análise de Sobreposição de nicho biótico realizada no programa EcoSimR 7.72 (GOTELLI & ELLISON, 2013), através dos índices de Pianka (acima da diagonal) e Czekanowski (abaixo da diagonal) para as espécies *D. alei, D. denieri* e *D. lutzii*.

	D. alei	*D. denieri*	*D. lutzii*
D. alei		0.577	0.289
D. denieri	0.333		0.333
D. lutzii	0.125	0.25	

Material suplementar

Figura S1. Reconstrução filogenética para o gene COI de *Drosophila alei-like* (azul), *D. denieri* (laranja) e *D. lutzii* (roxo) a partir da análise Bayesiana (AB), adotando o modelo evolutivo GTR+I determinado por meio do software MrModeltest.

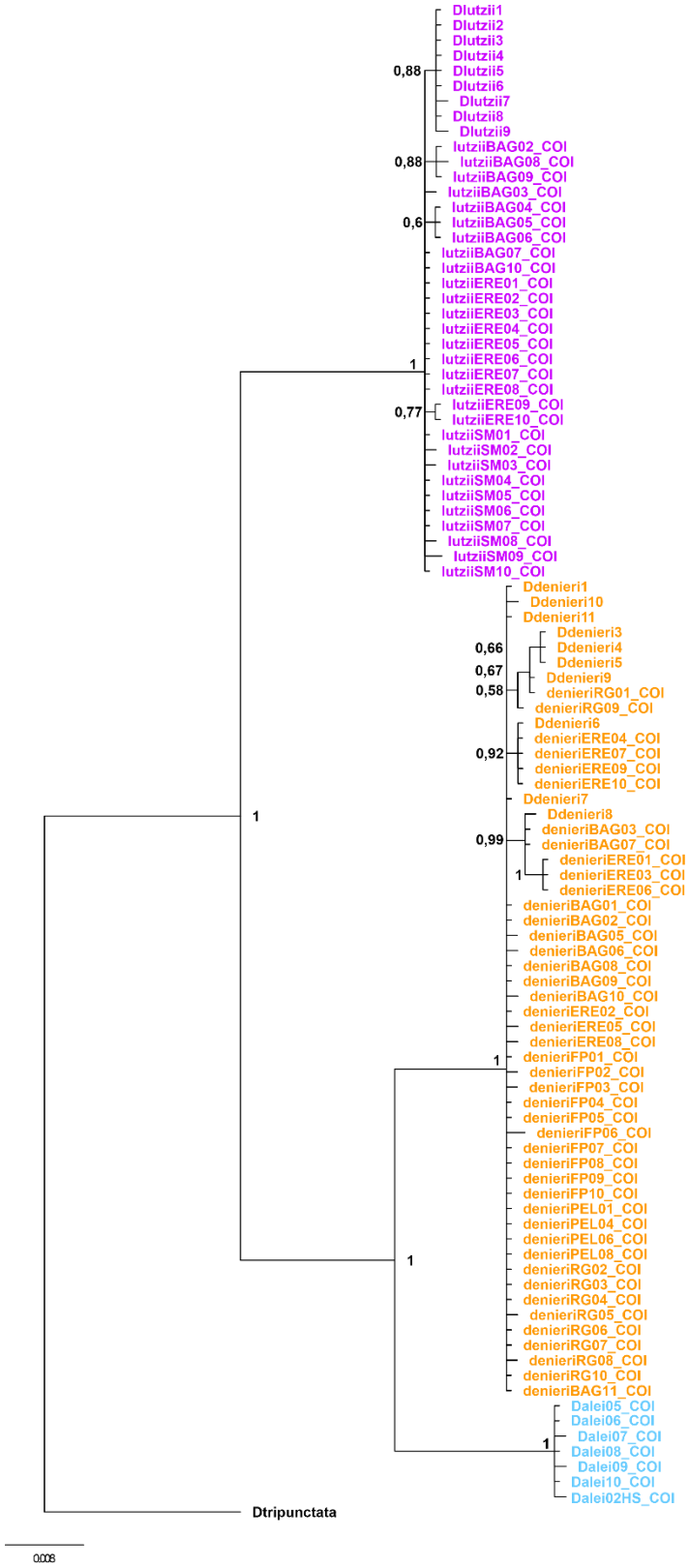
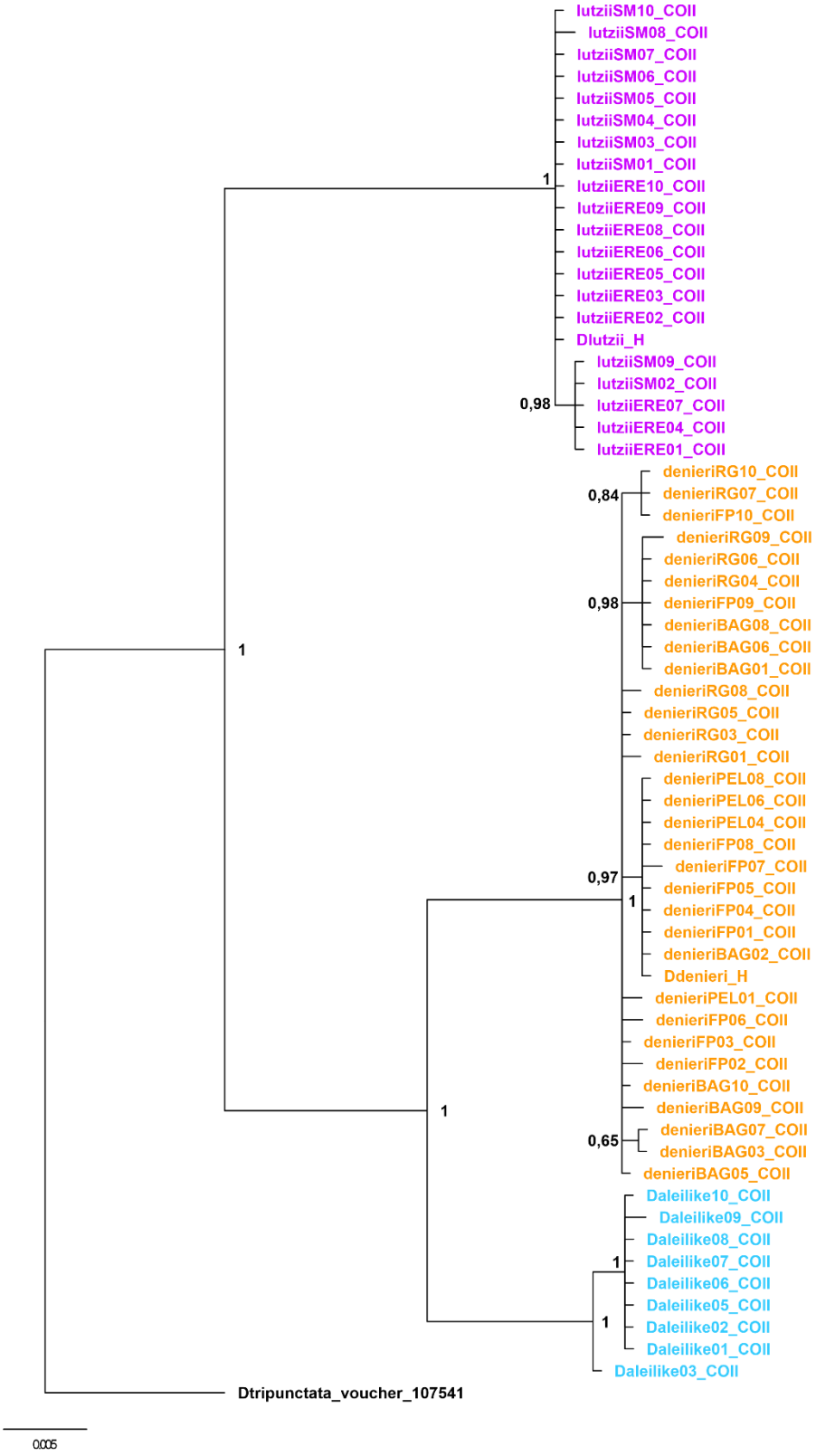


Figura S2. Reconstrução filogenética para o gene COII de *Drosophila alei-like* (azul), *D. denieri* (laranja) e *D. lutzii* (roxo) a partir da análise Bayesiana (AB), adotando o modelo evolutivo GTR+I determinado por meio do software MrModeltest.



2.3 MANUSCRITO 2

ESPECIALIZAÇÃO ECOLÓGICA E DIVERSIDADE GENÉTICA: UM ESTUDO EM DROSOFILÍDEOS ESPECIALISTAS EM FLORES

Resumo

Fatores relacionados à ecologia de cada espécie parecem desempenhar um papel importante nos padrões de distribuição da diversidade genética e na dinâmica das populações. Neste sentido, comparar os padrões de estruturação populacional entre espécies cuja distribuição geográfica se sobrepõe, mas que diferem em algum aspecto ecológico, parece ser uma forma promissora de avaliar o impacto destas diferenças na distribuição da variação genética. Drosofilídeos associados a flores constituem organismos modelo em estudos deste tipo por apresentarem espécies com os mais variados graus de especialização-generalização na utilização de recursos, fornecendo uma grande oportunidade para o entendimento de mecanismos ecológicos e evolutivos que promovem a diferenciação entre populações. Este artigo teve como objetivo inferir a relação entre os níveis de especialização ecológica, diversidade genética e estruturação populacional, usando *flower breeding drosophilids* (FBD) como modelo. Um total de 252 espécimes pertencentes à cinco espécies de FDB com diferentes níveis de especialização-generalização tiveram o marcador mitocondrial *COI* (*citocromo oxidase subunidade I*) caracterizado. A despeito das diferenças em termos de amplitude de especialização, os níveis e padrões de distribuição da diversidade genética não foram significativamente associados as mesmas, ainda que valores positivos de correlação tenham sido encontrados para os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica. Esses resultados sugerem que, possivelmente, a ausência de significância sejam um artefato relacionado ao número reduzido de comparações, e que o aumento no número de espécies consideradas possa nos auxiliar no alcance da significância estatística. No entanto, é notável que os níveis de diversidade genética se mantiveram altos até mesmo para espécies especialistas, e que os maiores níveis de diferenciação populacional tenham sido detectados para espécies generalistas. Isso sugere que outros fatores, históricos ou recorrentes, são tão ou mais importantes quanto as diferenças de amplitude de nicho no estabelecimento dos padrões de distribuição da diversidade genética das espécies.

Palavras-chave: Amplitude de nicho. Estrutura populacional. Especialização ecológica. *Drosophila* sp. Gene COI.

1 Introdução

O estudo da especialização ecológica é um importante componente-chave nos estudos de biogeografia, ecologia evolutiva e genética da conservação (DEVICTOR et al., 2015). Mais especificamente, dentro desta última área, têm se buscado relacionar os padrões de diversidade genética em espécies cuja distribuição geográfica se sobrepõe, mas que diferem em seu nível de especialização ecológica (SAEKI et al., 2011; DELLICOUR et al., 2015b). De fato, enquanto algumas espécies demonstram ampla tolerância e conseguem substituir um recurso escasso por outro com facilidade (generalistas de habitat), outras demonstram tolerâncias ambientais mais específicas e estreitas, e portanto são mais limitadas pela distribuição de seus recursos (especialistas em habitat) (KOLASA & LI, 2003). Assim, não é incomum que espécies especialistas formem populações menores e mais isoladas do que espécies de natureza mais generalista (KELLEY et al., 2000; PACKER et al., 2005; HABEL et al., 2012). Como resultado, é esperado que nestas populações pequenas e isoladas as consequências da deriva local tenham um impacto maior, com potencial redução do fluxo gênico entre as subpopulações, resultando em níveis reduzidos de variação genética (HEDRICK & GILPIN, 1997; WHITLOCK & BARTON, 1997) e níveis elevados de estruturação populacional (ZAYED et al., 2005; GOORT et al., 2011).

Tradicionalmente chamados de “mosca-das-frutas”, os membros da família Drosophilidae apresentam uma ampla diversidade de hábitos ecológicos e amplitudes de distribuição (MARKOW & O’GRADY, 2008). Dentre as espécies de *Drosophila* com diferentes hábitos ecológicos, as espécies de drosofilideos com hábito florívoro estão entre as menos estudadas (BRINCIC, 1983; SCHMITZ & VALENTE, 2018, CORDEIRO et al., em revisão). Estas espécies apresentam uma ampla gama de especializações ecológicas, e variam desde espécies que dependem de plantas para completar o seu ciclo de vida, chamadas de *flower-breeding drosophilids* (FDB *sensu stricto*), até espécies que utilizam flores como sítio de oviposição de forma oportunística, chamadas de antofílicas (*sensu latu*). Além disso, as espécies FDB podem apresentar hábitos mais especialistas, ovipondo em flores de apenas um gênero de plantas, ou uma natureza mais generalista, usando uma grande variedade

de espécies de flores de diferentes famílias de plantas como hospedeiras (CORDEIRO et al., em revisão).

Dentre as espécies FDB Neotropicais, destacam-se aquelas pertencentes ao grupo *flavopilosa* Wheeler, 1962, um complexo de espécies crípticas neotropicais pertencentes ao subgênero *Siphlodora* [sensu Yassin (2013)], cuja ecologia é restrita a flores de *Cestrum* (Solanaceae) (BRNCIC, 1967; ROBE et al., 2013; CENZI DE RÉ et al., 2017). No Brasil, há registro de seis espécies do grupo (GOTTSCHALK et al., 2008), entre as quais *D. incompta* Wheeler (1962) compreende uma das mais estudadas (Robe et al., 2013; CENZI DE RÉ et al., 2017). Em vista da efemeridade e transitoriedade dos recursos explorados, acredita-se que estas espécies estejam sujeitas a frequentes reduções populacionais ocasionadas pelo decréscimo na floração de espécies do gênero *Cestrum* (SEPEL et al., 2000). No entanto, dinâmicas de metapopulações, com frequentes extinções e recolonizações, já foram utilizadas para explicar os altos níveis de variabilidade genética encontrados em suas populações (CENZI DE RÉ et al., 2014).

Diferentemente das espécies do grupo *flavopilosa*, as espécies do grupo *bromeliae* Sturtevant, 1921 (subgênero *Drosophila*) e as espécies do grupo *lutzii* [sensu Yassin (2013), previamente conhecidas como subgênero *Phloridosa* Sturtevant 1942], costumam utilizar uma ampla gama de plantas hospedeiras, e constituem os táxons mais representativos da fauna brasileira de FDB (SCHMITZ & VALENTE, 2018). Atualmente, o grupo *bromeliae* possui duas espécies formalmente descritas de ocorrência no Brasil (BÄCHLI, 2018), embora existam evidências da existência de outros seis morfotipos para o país (tipos III, III', IV, IV', V e VI) (SCHMITZ, 2010, dados não publicados). Diferentemente de *D. bromeliae* e *D. bromelioides,* as duas espécies descritas até então registradas, (VILELA & MORI, 1999; BLAUTH & GOTTSCHALK, 2007; CHAVES & TIDON, 2008; ROQUE & TIDON, 2008) que são tidas como generalistas (CORDEIRO et al., em revisão), alguns destes morfotipos recém descobertos ovipõem exclusivamente em flores do gênero *Solanum* (SCHMITZ & HOFMANN, 2005; SCHMITZ et al., 2007; SCHMITZ & VALENTE, 2018). Já o grupo *lutzii* compreende sete espécies tipicamente generalistas, observadas em diversas famílias de plantas como recurso de oviposição (CORDEIRO et al., em revisão). Destas, *D. alei*, *D. denieri* e *D. lutzii* constituem as únicas espécies do grupo com registro no Brasil (CARVALHO et al., dados não publicados; SCHMITZ & VALENTE, 2018). Filogeneticamente, o grupo *bromeliae* pertence atualmente ao subgênero

Siphlodora, enquanto o grupo *lutzii* pertence ao subgênero *Drosophila* (YASSIN, 2013).

Dada a heterogeneidade nos níveis de especialização ecológica e a sobreposição geográfica apresentada pelas FBD no Neotrópico, em face aos seus diferentes posicionamentos filogenéticos, estas espécies tornam-se excelentes modelos no estudo de associação entre padrões ecológicos e genéticos. Portanto, o presente estudo tem como objetivo inferir a relação entre os níveis de diversidade e estruturação genética e a especialização ecológica em FBD. Para isso, foram avaliados os níveis de diversidade intraespecífica e os padrões de estruturação genética entre populações, bem como as suas correlações com os níveis de especialização. Apesar de esperarmos encontrar uma menor diversidade genética e uma estruturação populacional mais forte para as espécies de natureza especialista, nossos resultados argumentam contra um efeito drástico da especialização sobre a diversidade genética e a estruturação populacional em espécies de drosofilídeos flower-breeding.

2 Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

As coletas objetivaram obter espécies com diferentes graus de especialização-generalização quanto ao uso de flores. Desta forma, foram coletadas espécies especialistas aos gêneros *Cestrum* (grupo *flavopilosa*) e *Solanum* (grupo *bromeliae* sp. V e sp. IV), bem como espécies generalistas (*D. bromeliae*, *D. bromeliodes* e sp. III, do grupo *bromeliae* e *D. denieri* e *D. lutzii*, do grupo *lutzii*). A amostragem se baseou em coleta *ad libidum* de espécies de flores utilizadas por esses drosofilídeos (SCHMITZ & VALENTE, 2018; ROBE et al., 2013) em nove cidades no Sul do Brasil, com no mínimo 60km e no máximo 630km de distância (Figura 1). As flores foram coletadas em antese (autorização Ministério do Meio Ambiente SISBIO35332-1), fotografadas e colocadas em sacos plásticos identificados com data, local e gênero ou espécie de planta. Em laboratório, elas foram transferidas e mantidas em vidros com areia autoclavada em local com temperatura (+-25ºC) e umidade (60%UR) controladas. Os vidros foram identificados e inspecionados diariamente quanto à emergência de drosofilídeos. Os adultos emergidos foram aspirados e armazenados

em microtubos com etanol absoluto, e posteriormente identificados e separados para extração de DNA.

Todos os indivíduos machos foram identificados por meio da morfologia externa e da terminália, preparada conforme Bächli et al. (2004), com consulta em literatura específica de taxonomia de cada espécie (WHEELER et al., 1962; BRNCIC, 1978; VILELA, 1984, 1986; SCHMITZ & VALENTE, 2018; GRIMALDI 2016). As cinco espécies mais frequentemente amostradas (*D. incompta*, do grupo *flavopilosa*), *D. bromeliodes*, *D bromeliae* sp. III e *D. bromeliae* sp. V, do grupo *bromeliae*, e, *D. denieri*, do grupo *lutzii*) foram escolhidas para as avaliações posteriores. Todas as terminálias analisadas dos indivíduos utilizados para extração de DNA estão mantidas em tubos devidamente identificados contendo glicerol, e serão depositados na coleção de Drosophilidae do Museu Carlos Ritter/UFPel.

2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

A extração de DNA de cada indivíduo foi realizada com o *kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen). Um fragmento de 700 pb do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*COI*) de cada indivíduo foi amplificado por PCR utilizando os *primers* TYJ1460 (SIMON et al., 1994) e HCO1490 (FOLMER et al., 1994) e sequenciado na empresa Macrogen. Os contigs foram montados e inspecionados com o uso do pacote Staden 4.11 (STADEN, 1996).

2.3 Análise filogenética

As sequências foram alinhadas por meio do algoritmo ClustalW, no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013), e a monofilia recíproca das espécies, bem como a ausência de maiores subdivisões internas foram testadas através de uma análise filogenética. A análise Bayesiana (AB) foi realizada no programa MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001), adotando o modelo evolutivo SYM+G determinado por meio do teste *Akaike Information Criterion* (AIC) (AKAIKE, 1974) realizado no software MrModeltest (NYLANDER, 2008). Como grupo externo foi utilizado a sequência do gene mitocondrial COI pertencente à espécie *Scaptodrosophila zebrina* (GeneBank MF066980). Esta análise envolveu duas corridas iniciais MCMC, cada qual com 5 milhão de gerações, amostradas a cada 5 mil, e descartando 25% dos resultados iniciais como burn-in.

2.4 Análises de diversidade genética e estruturação populacional

Para as análises de diversidade genética foram calculados, para cada espécie, o número de haplótipos (h), a diversidade haplotípica (Hd) e o índice de diversidade nucleotídica (π) no programa DNAsp (ROZAS & ROZAS, 2003). Para o índice de fixação de alelos (*Fst)*, foram calculados os valores interpopulacionais de cada espécie, bem como o valor médio destas estimativas no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER et al., 2010). Para tanto, cada localidade geográfica foi considerada como uma subpopulação.

2.5 Especialização ecológica

Para analisar a correlação da especialização ecológica com a diversidade genética, as interações entre drosofilídeos e plantas hospedeiras disponíveis na literatura foram plotadas em uma rede de interações, visando demonstrar que a especialização ecológica das espécies FBD está diretamente relacionada ao número de gêneros de plantas hospedeiras utilizadas, e que existe uma grande variabilidade nesta propriedade entre as espécies estudadas. Para tanto, a rede de interações foi construída com base nos dados de gênero das plantas hospedeiras de cada uma das cinco espécies aqui estudadas, utilizando os dados de Cordeiro et al. (em revisão), somados aos dados obtidos neste trabalho (representando os dados totais para o Neotropico). Plantas hospedeiras cujos gêneros não foram identificados foram retiradas desta análise.

Baseado nesses dados, foi construída uma matriz de interação, onde cada linha é um gênero de planta *i*, cada coluna é uma espécie de drosofilídeo *j*, e a interseção a*ij* representa a presença (a*ij*-1) ou ausência (a*ij*=0) de interação entre o par de espécies. A rede de interações foi construída no programa R (R Core Team, 2018), utilizando a função *plotweb*. O índice de especialização (daqui para a frente designado como amplitude de nicho) foi, então, calculado, com base no número de gêneros diferentes utilizado por uma espécie dividido pelo número total de gêneros da rede de interações, segundo os dados Neotropicais totais. Valores próximos a 0 indicam alta especialização, e valores próximos a 1 indicam alta generalização quanto ao uso de flores.

2.6. Correlação entre medidas de diversidade/estruturação genética e os níveis de especialização

Finalmente, a correlação entre os níveis de especialização ecológica e as variáveis genéticas (hd, π, número médio de alelos e *Fst* médio) foi calculada com base no coeficiente de correlação de Sperman utilizando o programa PAST 3.15 (HAMMER et al., 2001).

3 Resultados

3.1 Análise filogenética

Sequências de COI foram obtidas para 252 indivíduos (Tabela 1). A matriz de alinhamento apresenta um tamanho final de 676bp. A reconstrução filogenética utilizando o gene COI suporta a monofila recíproca de todas as espécies, com valor máximo de probabilidade posterior para cada clado (Figura 2). Também foram recuperados, nesta filogenia, os agrupamentos entre as três espécies pertencentes ao grupo *bromeliae* (PP = 0.9) (Figura 2). Por outro lado, as relações internas nos clados são baseadas em politomias, embora para *D. bromelioides* e *D. bromeliae* sp. V tenham sido recuperados alguns agrupamentos populacionais (Figura 2). Nenhum destes, no entanto, apresentou indícios de uma subdivisão compatível com a amostragem de diversidade críptica, uma vez que nenhum dos agrupamentos internos recuperou distâncias superiores à 1% para com os demais.

3.2 Diversidade genética e estruturação populacional

Os valores dos índices de diversidade e *Fst* médios são apresentados na tabela 2. A diversidade haplotípica (hd) diferiu pouco entre as espécies generalistas e especialistas, apresentando valores acima de 0.89 para todas as espécies. O número médio de alelos também variou pouco entre as espécies (de 1.252 a 1.420). A diversidade nucleotídica, por outro lado, apresentou valores que variaram de 0.004 (para *D. incompta*, *D. denieri* e *D. bromeliae* sp. V) a 0.015 (para *D. bromelioides*).

Os índices médios de fixação (Fst) apresentaram grande variação entre as espécies, com valores entre 0.011 (para *D. bromeliae* sp. III) e 0.256 (para *D. bromelioides*) (Tabela 2). Com relação ao *Fst* interpopulacional, foi revelado uma diferenciação genética significativa entre alguns dos pares de populações, tanto nas espécies especialistas [*D. bromeliae* sp. V – *Fst* interpopulacionais variando de -0.09

a 0.35 (Material Suplementar – Tabela 1S); *D. incompta* – *Fst* interpopulacionais variando de -0.01 a 0.35 (Material Suplementar – Tabela 2S)], como nas espécies mais generalistas [*D. bromeliodes* – *Fst* interpopulacionais variando de -0.04 a 0.66; *D. bromeliae* sp. III – *Fst* interpopulacionais variando de -0.05 a 0.12; *D. denieri* - *Fst* interpopulacionais variando de -0.20 a 0.76 (Material Suplementar – Tabelas 3S-5S, respectivamente)].

3.3 Especialização ecológica e correlação com índices de diversidade

A figura 3 apresenta a rede de interações das cinco espécies aqui estudadas, enquanto os índices de especialização são apresentados na tabela 2. *Drosophila bromeliodes* é a espécie que interagiu com mais gêneros (33), seguida de *D. bromeliae* sp. III (seis) e *D. denieri* (seis). *Drosophila bromeliae* sp. V interagiu apenas com *Solanum e D. incompta* apenas com *Cestrum* (Figura 2). Consequentemente, *D. incompta e D. bromeliae* sp V demostraram ser as espécies FDB mais especializadas (amplitude de nicho=0.029). Dentre as mais generalistas, *D. bromeliae* sp. III e *D. denieri* apresentaram valores intermediários (amplitude de nicho = 0.17), enquanto *D. bromeliodes* se apresentou como a espécie mais generalista (amplitude de nicho = 0.97).

Por fim, a correlação entre os níveis de especialização com os valores de diversidade genética (hd, π, número médio de alelos e *Fst* médio) não recuperou valores significativos para nenhuma das variáveis genéticas testadas (Tabela 3). Ainda assim, correlações positivas foram apresentadas para a diversidade haplotípica ($r=0.94$, $p>0.01$), a diversidade nucleotídica ($r=0.82$, $p>0.01$), e até mesmo para o Fst médio ($r=0.31$, $p>0.01$).

4 Discussão

As cinco espécies aqui analisadas são espécies de ecologia restrita que utilizam flores para oviposição, completando assim o seu ciclo de vida. Estas espécies diferem quanto ao número de recursos utilizados, sendo *D. incompta* e *D. bromeliae* sp. V espécies especialistas no uso de flores das espécies de plantas do gênero *Cestrum* (Solanaceae) e *Solanum* (Sonalaceae), respectivamente. Por outro lado, *D. bromeliodes, D. bromeliae* sp. III, *D. denieri* são espécies consideradas generalistas quanto ao uso de flores para oviposição, utilizando flores de diferentes gêneros (33, seis e seis, respectivamente) (Figura 3). Ainda assim, segundo nossos estudos, estas

três espécies diferem amplamente em seus níveis de especialização, com a primeira ocupando o maior ranking de generalização, e as duas últimas ocupando posições intermediárias. Isso demonstra a importância de adotar escalas quantitativas em detrimento de descrições qualitativas na mensuração dos níveis de especialização ecológica. Ressalta-se, entretanto, que os valores aqui obtidos apresentam apenas uma relação de escalonamento das espécies avaliadas perante as amostragens consideradas. Os mesmos não devem, portanto, ser extrapolados para outros estudos.

Segundo De Victor et al. (2015), espécies especialistas, que utilizam menor diversidade de recursos, apresentam maior estruturação populacional e menores índices de diversidade genética, moldados por processos históricos e recorrentes de isolamento por distância ligados a distribuição do seu recurso. Embora nossos resultados não tenham recuperado uma significância estatística, é interessante observar que valores moderados a altos de correlação positiva foram recuperados tanto para a diversidade haplotípica e a diversidade nucleotídica, como também para a estruturação populacional. Em primeiro lugar, é importante considerar que a ausência de significância pode ser um artefato do número limitado de comparações realizadas. De fato, as limitações amostrais podem estar interferindo diretamente em nossos resultados, e estudos comparativos com um número maior de espécies, principalmente com espécies com uma maior amplitude de recursos (como as espécies do gênero *Zygothrica,* por exemplo), e abrangendo uma maior área de distribuição das espécies, podem vir a trazer resultados mais significativos. No entanto, é notável a existência de amplos níveis de diversidade genética em todas as espécies estudadas, e a existência dos maiores sinais de estruturação populacional em *D. bromeliae* sp. V e *D. bromelioides*, que constituem uma das espécies mais especialistas e a espécie mais generalista em nossa amostragem, respectivamente. Isso sugere que outros fatores, históricos ou recorrentes, também estão afetando nossos resultados.

Embora estudos envolvendo espécies com diferentes níveis de especialização suportem valores baixos de diversidade genética para espécies especialistas (PACKER et al., 2005 em abelhas; HABEL et al., 2009 em borboletas; e, KELLEY et al., 2000 em besouros), a alta diversidade genética observada aqui para as espécies dessa natureza ecológica sugere que mesmo que haja um decréscimo em suas populações em função da escassez de seus recursos, seu efeito pode ser limitado.

Essa ideia vai ao encontro da hipótese levantada por De Ré (2014), de que as populações de *D. incompta* estariam agindo como uma metapopulação, persistindo ao longo do tempo em virtude de um equilíbrio entre extinções e recolonizações. Desta forma, a alta taxa de migrantes tende a repor a variabilidade genética perdida dessas espécies após as suas populações experimentarem uma diminuição no seu tamanho em decorrência da diminuição do recurso explorado. O mesmo pode estar acontecendo com a espécie especialista *D. bromeliae* sp. V.

Enquanto que as espécies especialistas respondem principalmente às variações ambientais e a fragmentação de seu habitat, as espécies generalistas são menos influenciadas por estes fatores (ZAYED et al., 2005; GOORT et al., 2011; KOIVULA et al. 2002). Essa previsão resulta do fato de que espécies generalistas conseguem substituir um recurso escasso por outro mais facilmente e, portanto, suas populações encontram-se mais conectadas. Assim, é esperado que espécies generalistas apresentem fraca estruturação populacional, principalmente devido à livre ocorrência do fluxo gênico (BROAUT et al., 2004; ZAYED et al., 2005). O fluxo gênico por sua vez, diminui a variabilidade genética entre as populações locais e aumenta a variabilidade genética na população como um todo (BROAUT et al., 2003). Com relação a estruturação populacional, nossos dados evidenciam padrões de *Fst* bastante semelhantes entre as espécies com diferentes níveis de especialização (como *D. bromelioides* e *D. bromeliae* sp V), ao mesmo tempo em que a correlação encontrada indica que os níveis de estruturação sejam diretamente proporcionais a amplitude de nicho (maiores valores de *Fst* tendem a ser encontrados em espécies mais generalistas, ao contrário do esperado). Isso é, provavelmente, um artefato da grande estruturação populacional evidenciada para *D. bromelioides*, a espécie mais generalista em nosso estudo.

Contudo, os resultados recuperados para a espécie generalista *D. bromeliae* sp. III parecem seguir o padrão esperado para espécies de natureza generalista, com altos valores de diversidade genética e uma menor diferenciação genética entre as populações (BROAUT et al., 2003; PACKER et al., 2005; HUNG et al. 2016). Se esta espécie fosse comparada apenas com *D. incompta*, ou com *D. bromeliae* sp V, a hipótese de menores níveis de diversidade e maiores níveis de estruturação em espécies especialistas seria corroborada. Isso demonstra a importância da realização de comparações envolvendo diversas espécies em um gradiente de especialização-generalização, estratégia diferente daquela tradicionalmente utilizada. De fato, a maior

parte dos trabalhos envolvendo esse assunto trabalham com comparações entre duas espécies, sem a adoção de testes estatísticos para comprovar a significância entre as diferenças ecológicas encontradas (KELLEY et al., 2000; HABEL & SCHMITT, 2009).

Apesar de esperarmos encontrar uma maior estruturação populacional para todas as espécies mais especialistas, é possível que a estrutura populacional geral de cada espécie esteja sendo contrabalanceada por fatores específicos ligados à capacidade de dispersão (DELLICOUR et al., 2015b). Como consequência de uma alta capacidade dispersiva, algumas espécies de drosofilideos *flower-breeding* especialistas podem ser mais resistentes à fragmentação de seus recursos, configurando populações menos heterogêneas. De fato, fortes níveis de diferenciação entre populações continentais de espécies com alta capacidade dispersiva parecem bastante incomuns e são detectadas apenas em casos extremos de fragmentação ou quando as espécies são isoladas em ilhas (ELLIS et al., 2006, GOULSON et al., 2011, LECOCQ et al., 2013). Isso também demonstra a importância da escala dos diferentes estudos, uma vez que, muitas vezes, padrões significativos só emergem em escalas maiores (DELLICOUR et al., 2015a). Além disso, como as espécies analisadas aqui pertencem à grupos independentes filogeneticamente um do outro, outras variáveis relacionadas à história evolutiva de cada espécie podem estar influenciando os padrões de estruturação populacional observados.

Assim, embora alguns estudos forneçam evidências de diferenciação nos padrões de distribuição da variabilidade genética entre espécies generalistas e especialistas, nossos resultados sugerem que a especialização não parece constituir um fator limitante para a manutenção da diversidade genética das espécies. De fato, não foi possível confirmar a existência de uma correlação da diversidade genética e da estrutura populacional com a natureza ecológica de cada espécie. Mesmo que não possamos excluir alguma influência desses fatores, parece que nossos dados argumentam contra um efeito drástico da especialização sobre a diversidade genética em espécies de drosofilideos *flower-breeding*. É possível, pois, que as diferenças nas respostas individuas de cada espécie às oportunidades de dispersão, tanto histórica como contemporânea, sejam as principais responsáveis pelos resultados encontrados em vez de somente o efeito da especialização ecológica.

Referências

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic** Control, v. 19, p. 716–723, 1974.

BÄCHLI, G. TaxoDros — The database on taxonomy of Drosophilidae. Database 2018/03; TaxoDros v1.04, available at http://www.taxodros.uzh.ch/ (acessado em 9 Dezembro de 2018).

BÄCHLI, G.; VILELA, C. R.; ESCHER, S. A.; SAURA, A.. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. **Fauna Entomologica Scandinavica**, v. 39, p. 1-362, 2004.

BLAUTH, M. L.; GOTTSCHALK, M. S. A novel record of Drosophilidae species in the Cerrado biome of the state of Mato Grosso, west-central Brazil. ***Drosophila* Information Service**, v. 90, p. 90-96, 2007.

BRNCIC, D. A note on the flavopilosa group of Drosophila in Rio Grande do Sul, Brazil, with description of two new species (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, p. 647-651, 1978.

BRNCIC, D. Ecological and cytogenetical studies of *Drosophila flavopilosa*, a Neotropical species living in *Cestrum* flowers. **Evolution**, v. 20, n. 1, p. 16-29, 1966.

BRNCIC, D. Ecology of flower breeding *Drosophila*. In: Asburner M.; Carson, H. L.; Thompson, Jr. J. N. The genetics and biology of *Drosophila*. vol 3d. London: Academic press, 1983.

BROAUT, C; SENNEDOT, F.; AUDIOT, P.; LEBLOIS, R.; RASPLUS, Y. Fine-scale genetic structure of two carabid species with contrasted levels of habitat specialization. **Molecular Ecology**, v. 12, p-1731-1745, 2003.

BROUAT, C.; CHEVALLIER, H.; MEUSNIER, S.; NOBLECOURT, T.; RASPLUS, J. Y. Specialization and habitat: special and environmental effects on abundance and genetic diversity of forest generalist and specialist *Carabus* species. **Molecular Ecology**, v. 13, p.1815-1826, 2004.

CENZI DE RÉ, F.; WALLAU, G.L.; ROBE, L.J. & LORETO, E.L.S. Characterization of the complete mitochondrial genome of flower-breeding *Drosophila incompta* (Diptera, Drosophilidae). **Genetica**, v. 142, p. 525-535, 2014.

CENZI DE RÉ, F.; ROBE, L. J.; WALLAU, G. L.; LORETO, E. L. S. Inferring the phylogenetic position of the *Drosophila flavopilosa* group: Incongruence within and

between mitochondrial and nuclear multilocus datasets. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 5, p. 208-221, 2017.

CHAVES, N.B. & TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, p. 340-348, 2008.

CORDEIRO, OLIVEIRA, SCHMITZ, VIZENTIN-BUGONI. (em revisão) Modularity of plant-florivore networks is consistent across scales and reveals drivers of high specialization.

DELLICOUR, S.; MICHEZ, D.; MARDULYN, P. Comparative phylogeography of five bumblebees: impact of range fragmentation, range size and diet specialization. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.116, p. 926-939, 2015a.

DELLICOUR, S.; MICHEZ, D.; RASPLUS, J-Y.; MARDULYN, P. Impact of past climatic changes and resource availability on the population demography of three food-specialist bees. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 1074-1090, 2015b.

DEVICTOR, V. et al. Defining and measuring ecological specialization. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, p. 15-25, 2015.

ELLIS, J.S.; KNIGHT, M.E.; DARVILL, B.; GOULSON, D. Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum* (Hymenoptera: Apidae). **Molecular Ecology**, v. 15, p. 4375-4386, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567. 2010.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol***,* v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

GROOT, A. T. et al. Genetic differentiation across North America in the generalist moth *Heliothis virescens* and the specialist *H. subflexa*. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 2676-2692, 2011.

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

GOULSON, D.; KADEN, J.C.; LEPAIS, O.; LYE, G.C.; DARVILL, B. Population structure, dispersal and colonization history of the garden bumblebee *Bombus hortorum* in the Western Isles of Scotland. **Conservation Genetics,** v. 12, p. 867-879, 2011**.**

GRIMALDI D.A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 197, p. 103-268, 1990.

GRIMALDI, D. A. Revision of the *Drosophila bromeliae* Species Group (Diptera: Drosophilidae): Central American, Caribbean, and Andean Species**. American Musem Novitates**, v. 3859, p. 1-55, 2016.

HABEL, J. C.; MEYER, M.; SCHMITT, T. The burden of genetic diversity. **Biological Conservation**, v. 147, p. 270-274, 2012.

HABEL, J. C.; MEYER, M.; SCHMITT, T. The genetic consequence of differing ecological demands of a generalist and a specialist butterfly species. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 1895-1908, 2009HABEL et al., 2009.

HAMMER, O. et al. PAST: Paleontological statistics software package for
513 education and data analysis. **Palaeontol. Electron**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HEDRICK, P. W.; GILPIN, M. E. **Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution**. San Diego: Academic Press, 1997.

HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

HUNG, C. M.; DROVETSKI, S. V.; ZINK, R. M. The roles of ecology, behavior and effective population size in the evolution of a community. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 14, p. 3775-3784, 2017.

KELLEY, S. T.; FARRELLA, B. D.; MITTON, J. B. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. **Heredity**, v. 84, p. 218-227, 2000.

KOIVULA, M.; KUKKONEN, J.; NIEMALÄ, J. Boreal carabid-beetle (Coleoptera, Carabidae) assemblages along the clear-cut originated sucession gradient. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, p. 1269-1288, 2002.

KOLASA, J.; LI, B. L. Removing the confounding effect of habitat specialization reveals the stabilizing contribution of diversity to species variability. **Proceedings of the Royal Society**, v. 270, p. 198–201, 2003.

LECOCQ, T. et al. Patterns of genetic and reproductive traits differentiation in mainland vs. Corsican populations of bumblebees. **Plos One**, v. 8, e65642, 2013.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Review: Reproductive Ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 22, p. 747-759, 2008.

NYLANDER, J.A.A. (2008) MrModeltest *v2.3*. Program distributed by the author.

PACKER, L.; ZAYED, A.; GRIXTI, J. C.; RUZ, L.; OWEN, R. E.; VIVALLO, F.; TORO, H. Conservation genetics of pontentially endangered mutualism: Reduced levels of genetic variation in specialist vs. generalist bees. **Conservation Biology**, v. 19, p. 195-202, 2005.

ROBE, L. J.; CENZI DE RÉ, F.; LUDWIG, A. LORETO, E. L. S. The *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera: Drosophilidae). **Fly**, v. 7, n. 2, p. 59-69, 2013.

ROQUE, F. & TIDON, R. Eight new records of drosophilids (Insecta; Diptera) in the Brazilian savanna. ***Drosophila* Information Service**, v. 91, p. 94-98, 2008.

ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSP version 4: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, v. 15, p. 174-175, 2003.

SAEKI, I. et al. Comparative phylogeography of red maple (*Acer rubrum* L.) and silver maple (*Acer saccharinum* L.): impacts of habitat specialization, hybridization and glacial history. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 992-1005, 2011.

SCHMITZ, H. J. Genética, **Ecologia e Evolução de drosofilídeos (Insecta, Diptera) associados a flores**. 120f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

SCHMITZ, H. J.; HOFMANN, P. R. P. First record of subgeus *Phloridosa* of *Drosophila* in southern Brazil, with notes on breeding sites. ***Drosophila* Information Service**, v. 88, p. 97-101, 2005.

SCHMITZ, H. J.; VALENTE V. L. S. The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the Brazilian fauna. **bioRxiv 402834** https://doi.org/10.1101/402834, 2018.

SCHMITZ, H. J; VALENTE, V. L. S.; HOFMANN, P. R. P. Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 53-64. 2007.

SEPEL, L. M. N.; GOLOMBIESKI, M.; NAPP, M; LORETO, E. L. S. Seasonal fluctuations of *D. cestri* and *D. incompta*, two species of *flavopilosa* group. ***Drosophila* Information Service**, v. 83, p. 122-126, 2000.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. 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, v. 87**, p. 651–701, 1994.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology***,* v. 5, p. 233–241, 1996.

STURTEVANT, A.H. The North American species of *Drosophila*. **Carnegie Institute of Washington Publication, Washington**, p. 1-150, 1921.

TAMURA, K.; GLEN, S.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

THROCKMORTON, L.H. (1975) The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: King, R.C. (Ed.) *Handbook of Genetics, Volume 3*. Plenum, New York, NY, p. 421–469.

VILELA, C.R. & MORI, L. The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó: further notes. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 43, p. 319-328, 1999.

VILELA, C.R. Notes on the holotypes of four Neotropical species of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) described by A. H. Sturtevant. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 28, p. 245-256, 1984.

VILELA, C.R. The type-series of *Drosophila denieri* Blanchard (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 30, n. 2, p. 223-226, 1986.

WHEELER, M.R. & TAKADA, H. A revision of the American species of Mycodrosophila (Diptera, Drosophilidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 56, p. 392–399, 1962.

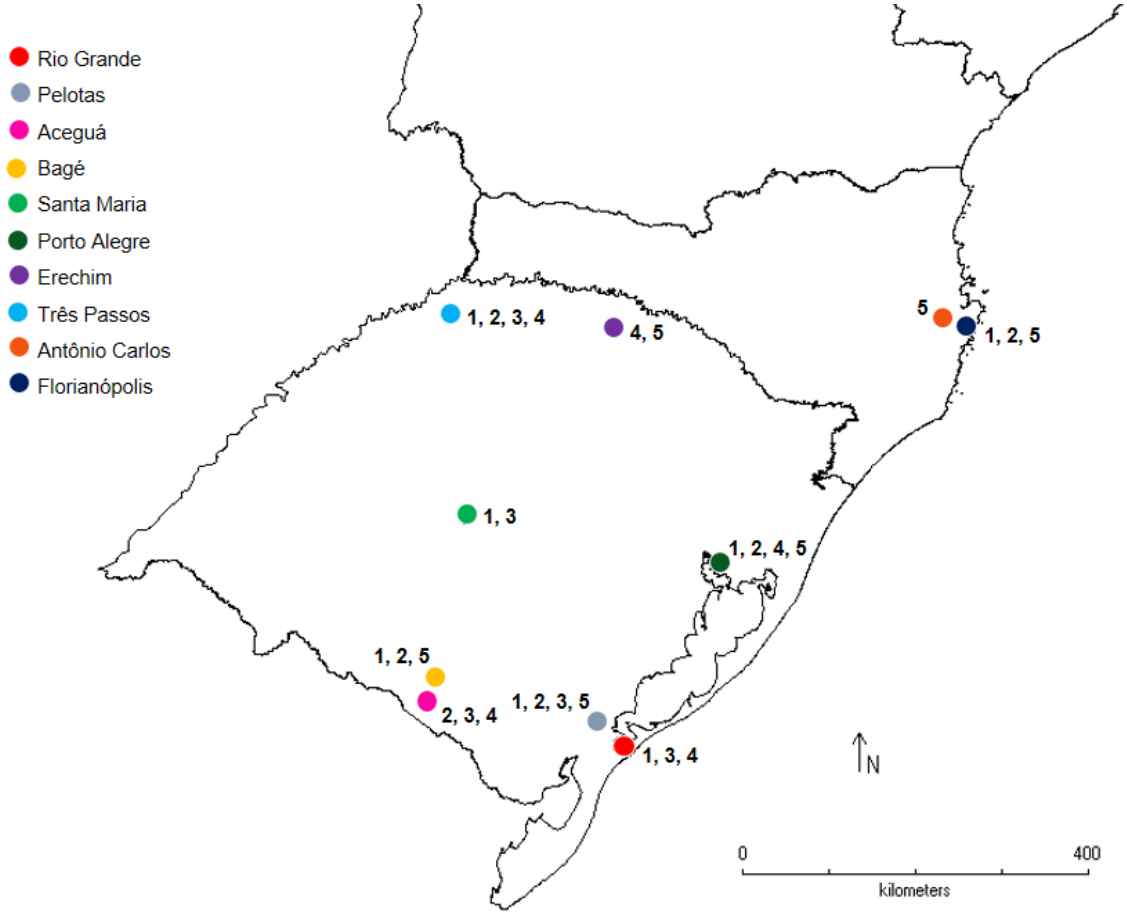
WHITLOCK, M. C.; Barton, N. H. The effective size and subdivided population. **Genetics**, v. 146, p. 427-441, 1997.

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

ZAYED, A.; PACKER, L.; GRIXTI, J. C.; RUZ, L.; OWEN, R. E.; TORO, H. Increased genetic differentiation in a specialist versus a generalista bee: implications for conservation. **Conservation Genetics**, v. 6, p. 1017-1026, 2005.

Figuras

Figura 1. Mapa de coleta na região Sul do Brasil, apresentando as localidades de distribuição das espécies *Drosophila incompta* (1)*, D. bromeliae* sp. III (2), *D. bromeliae* sp. V (3)*, D. bromelioides* (4) e *D denieri* (5).



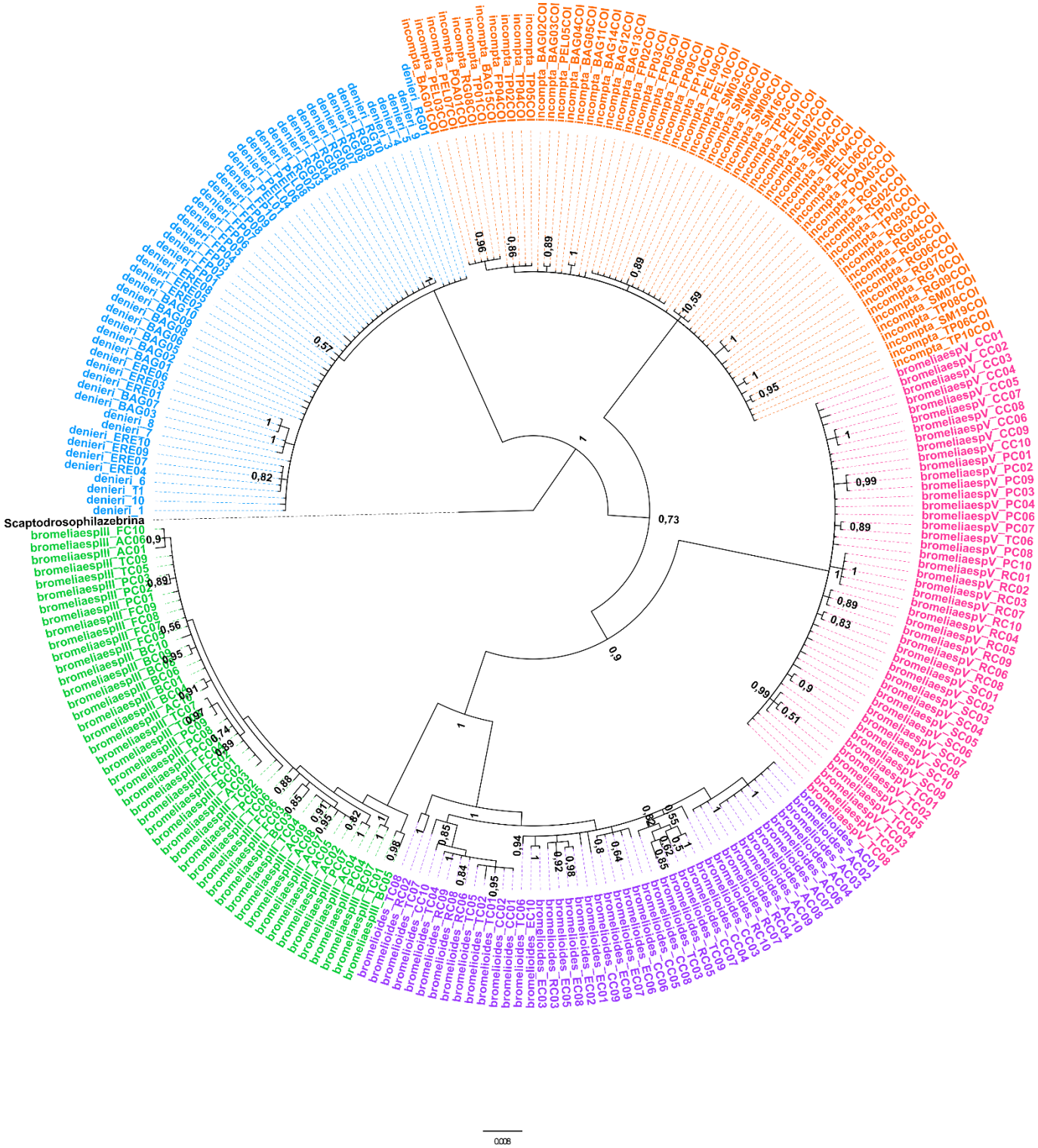


Figura 2. Reconstrução filogenética para o gene COI *de Drosophila incompta* (laranja), *D. bromeliodes* (roxo), *D. bromeliae* sp. III (verde água), *D. bromeliae* sp. V (rosa) e *D. denieri* (azul) a partir da análise Bayesiana (AB), adotando o modelo evolutivo SYM+G determinado por meio do software MrModeltest.

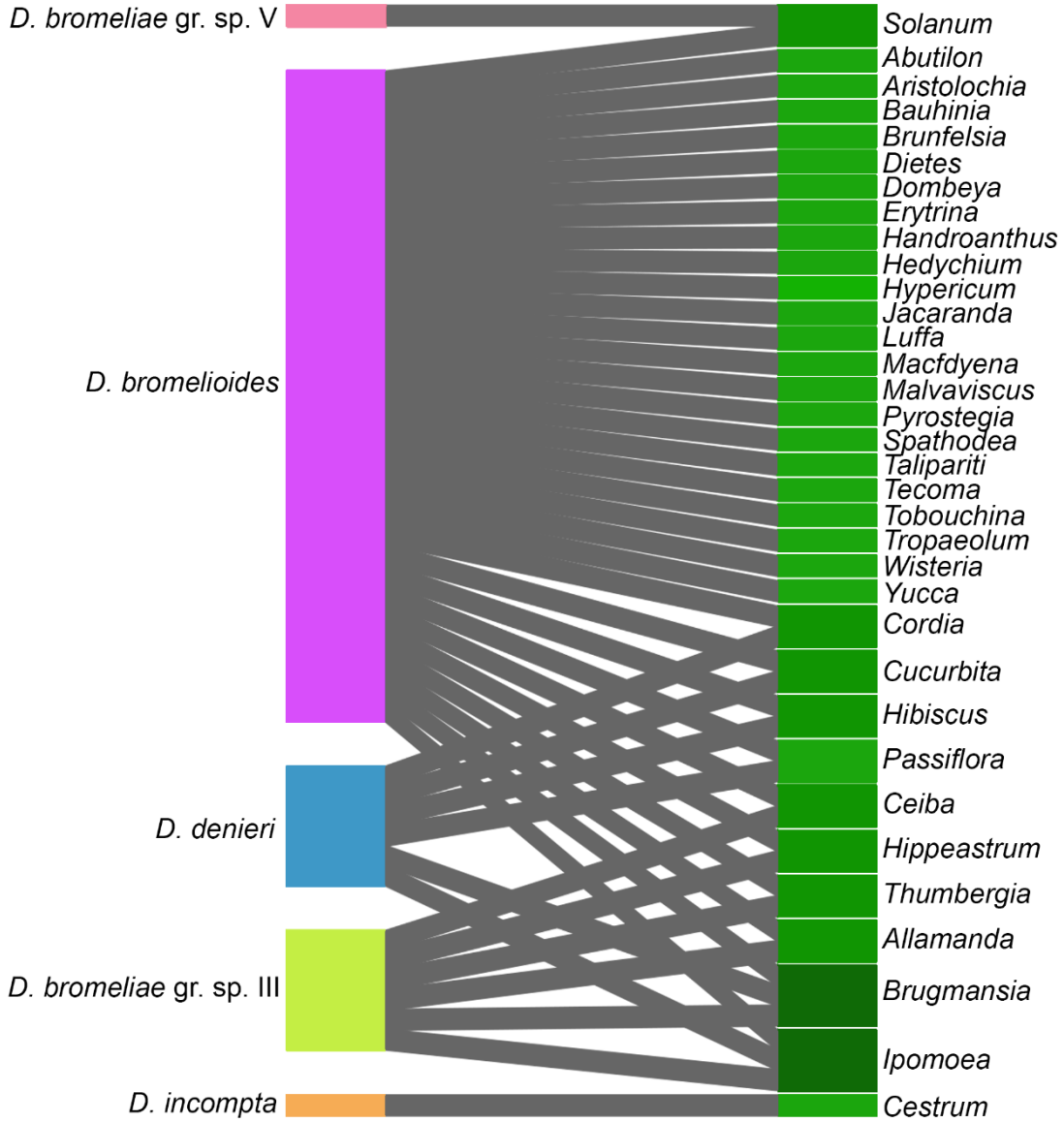


Figura 3. Rede de interaçãoentre as espécies de drosofilideos *flower-breeding* e os gêneros de planta construída no programa R (R Core Team, 2018), utilizando a função plotweb.

Tabelas

Tabela 1. Espécimes de *Drosophila incompta, D. bromeliodes, D. bromeliae* sp. III, *D. bromeliae* sp. V e *D. denieri* usados para as análises genéticas, com suas respectivas identificações (ID) e informações de coleta.

Código	Espécie de drosofilideo	N amostral	Flor hospedeira	Localidade	Latitude_y	Longitude_x
incompta_BAG01-05	*Drosophila incompta*	5	*Cestrum sp.*	Bagé (RS)	31°22'07.4"S	54°01'41.4"W
incompta_BAG11-15	*D. incompta*	5	*Cestrum sp.*	Bagé (RS)	31°22'07.4"S	54°01'41.4"W
incompta_FP02-05, 08-10	*D. incompta*	7	*Cestrum sp.*	Florianópolis (SC)	27°32'13.3"S	48°31'39.3"W
incompta_PEL01-05	*D. incompta*	5	*Cestrum sp.*	Pelotas (RS)	31°46'23.2"S	52°24'58.9"W
incompta_PEL06-07, 09-10	*D. incompta*	4	*Cestrum sp.*	Pelotas (RS)	31°46'23.2"S	52°24'58.9"W
incompta_POA01-03	*D. incompta*	3	*Cestrum sp.*	Porto Alegre (RS)	29°57'12.3"S	51°02'56.5"W
incompta_RG01-05	*D. incompta*	5	*Cestrum parqui*	Rio Grande (RS)	32°04'34.1"S	52°11'21.6"W
incompta_RG06-10	*D. incompta*	5	*Cestrum strigilatum*	Rio Grande (RS)	32°29'51.7"S	52°34'38.9"W
incompta_SM01-05	*D. incompta*	5	*Cestrum strigilatum*	Santa Maria (RS)	29°54'21.6"S	53°43'47.5"W
incompta_SM06-09, 16, 19	*D. incompta*	5	*Cestrum strigilatum*	Santa Maria (RS)	29°54'21.6"S	53°43'47.5"W
incompta_TP01-05	*D. incompta*	5	*Cestrum strigilatum*	Três Passos (RS)	27°26'15.2"S	53°57'41.2"W
incompta_TP06-10	*D. incompta*	5	*Cestrum strigilatum*	Três Passos (RS)	27°26'15.2"S	53°57'41.2"W
bromeliaesplII_BAG01-10	*D. bromeliae sp. III*	10	*Brugmansia suaveolens*	Bagé (RS)	31°17'23.0"S	54°07'42.5"W
bromeliaesplII_FP01-05	*D. bromeliae sp. III*	5	*Brugmansia suaveolens*	Florianópolis (SC)	27°32'13.3"S	48°31'39.3"W
bromeliaesplII_FP06-10	*D. bromeliae sp. III*	5	*Brugmansia suaveolens*	Rio Novo (SC)	27°47'57.9"S	49°00'11.7"W
bromeliaesplII_PEL01-06	*D. bromeliae sp. III*	6	*Brugmansia suaveolens*	Pelotas (RS)	31°48'07.5"S	52°24'59.9"W
bromeliaesplII_PEL07-09	*D. bromeliae sp. III*	3	*Brugmansia suaveolens*	Pelotas (RS)	31°48'53.4"S	52°25'42.3"W
bromeliaesplII_POA01-10	*D. bromeliae sp. III*	10	*Ipomoea indica*	Porto Alegre (RS)	30°04'42.3"S	51°07'53.5"W
bromeliaesplII_TP01-07, 09	*D. bromeliae sp. III*	8	*Brugmansia suaveolens*	Três Passos (RS)	27°27'32.9"S	53°56'38.8"W
bromeliaespV_ACEG01-04	*D. bromeliae sp. V*	4	*Solanum aculeatissimum*	Aceguá (RS)	31°49'07.6"S	54°09'31.4"W
bromeliaespV_ACEG05-10	*D. bromeliae sp. V*	6	*Solanum aculeatissimum*	Aceguá (RS)	31°38'22.4"S	54°07'39.9"W
bromeliaespV_PEL01-04,06-10	*D. bromeliae sp. V*	9	*Solanum sp.*	Pelotas (RS)	31°48'07.5"S	52°24'59.9"W
bromeliaespV_SM01-05	*D. bromeliae sp. V*	5	*Solanum aculeatissimum*	Santa Maria (RS)	29°42'05.3"S	53°47'47.4"W
bromeliaespV_SM06-10	*D. bromeliae sp. V*	5	*Solanum sp.*	Santa Maria (RS)	29°54'21.6"S	53°43'47.5"W
bromeliaespV_RG01-10	*D. bromeliae sp. V*	10	*Solanum aculeatissimum*	Rio Grande (RS)	32°44'01.5"S	52°36'50.0"W
bromeliaespV_TP01-05	*D. bromeliae sp. V*	5	*Solanum aculeatissimum*	Três Passos (RS)	27°26'46.6"S	53°56'32.4"W
bromeliaespV_TP06-08	*D. bromeliae sp. V*	3	*Solanum aculeatissimum*	Três Passos (RS)	27°26'15.2"S	53°57'41.2"W
bromelioides_ACEG01-10	*D. bromeliodes*	10	*Ipomoea sp.*	Aceguá (RS)	31°3054.7"S	54°10'25.7"W
bromelioides_ERE01-03, 05-10	*D. bromeliodes*	9	*Curcubita sp.*	Erechim (RS)	27°35'36.0"S	52°13'45.3"W
bromelioides_POA01-04, 06-10	*D. bromeliodes*	9	*Ipomoea indica*	Porto Alegre (RS)	30°04'42.3"S	51°07'53.5"W
bromelioides_RG02	*D. bromeliodes*	1	*Brugmansia suaveolens*	Rio Grande (RS)	32°02'39.6"S	52°21'56.5"W
bromelioides_RG03-10	*D. bromeliodes*	8	*Ipomoea indica*	Rio Grande (RS)	32°00'23.7"S	52°08'56.9"W
bromelioides_TP01-09	*D. bromeliodes*	9	*Brugmansia suaveolens*	Três Passos (RS)	27°26'46.6"S	53°56'32.4"W
denieri_BAG01-03, 05	*D. denieri*	4	*Ipomoea indica*	Bagé (RS)	54°06'41.3"W	31°20'06.5"S
denieri_BAG06-10	*D. denieri*	5	*Brugmansia suaveolens*	Bagé (RS)	54°06'19.6"W	31°20'08.5"S
denieri_ERE01-10	*D. denieri*	10	*Curcubita maxima*	Erechim (RS)	52°13'45.3"W	27°35'36.0"S
denieri_FP01-10	*D. denieri*	10	*Brugmansia suaveolens*	Rio Novo (SC)	49°00'11.7"W	27°47'57.9"S
denieri_PEL01e04	*D. denieri*	2	*Ipomea alba*	Pelotas (RS)	52°25'05.1"W	31°46'08.4"S
denieri_PEL06	*D. denieri*	1	*Ipomea alba*	Pelotas (RS)	52°25'05.1"W	31°46'08.4"S
denieri_PEL08	*D. denieri*	1	*Brugmansia suaveolens*	Pelotas (RS)	52°25'42.3"W	31°48'53.4"S
denieri_RG01-10	*D. denieri*	10	*Ipomoea indica*	Rio Grande (RS)	52°55'01.2"W	32°06'17.2"S
denieri1,6	*D. denieri*	2		Porto Alegre (RS)	51º07'06.9"W	30°04'12.4"S
denieri3,4,5	*D. denieri*	3		Antônio Carlos (SC)	48º46'18.23"W	27°31'03.373"S
denieri7,8,9,10,11	*D. denieri*	5		Pelotas (RS)	52º23'01.1"W	31°45'18.3"S

Tabela 2. Índices de diversidade genética (Hd, π e número médio de alelos), índice médio de fixação de alelos (*Fst)* e índice de especialização das espécies.

Espécie	N	Hd	Π	Número médio de alelos	Fst Médio	Indice de especialização
Drosophila incompta	59	0.909	0.004	1.420	0.097	0.029
Drosophila bromeliodes	46	0.948	0.015	1.376	0.256	0.971
Drosophila bromeliae sp. III	47	0.939	0.007	1.389	0.011	0.176
Drosophila bromeliae sp. V	47	0.894	0.004	1.252	0.205	0.029
Drosophila denieri	53	0.916	0.004	1.286	0.175	0.176

Tabela 3. Correlação entre os índices de especialização e as variáveis genéticas a partir coeficiente de correlação Sperman-rs utilizando o programa PAST 3.15 (Hammer et al. 2001) ($p<0.01$).

Variável genética	Coeficiente de correlação (Spearmans-rs)
Hd	0.94 ($p>0.01$)
π	0.82 ($p>0.01$)
Número médio de alelos	0 ($p>0.01$)
Fst	0.31 ($p>0.01$)

Material Suplementar

Tabela S1. Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as cinco localidades amostradas para *D. bromeliae* sp. V. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P <0,05).

Groups	Rio Grande	Aceguá	Pelotas	Santa Maria	Três Passos
Rio Grande	0				
Aceguá	*0.2127	0			
Pelotas	*0.32585	*0.18782	0		
Santa Maria	*0.28125	0.09409	*0.13636	0	
Três Passos	*0.34763	0.09392	*0.22376	*0.14604	0

Tabela S2. Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as sete localidades amostradas para *D. incompta*. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P <0,05).

Groups	Pelotas	Rio Grande	Bagé	Porto Alegre	Santa Maria	Três Passos	Florianópolis
Pelotas	0						
Rio Grande	-0.02632	0					
Bagé	0.00522	-0.01784	0				
Porto Alegre	-0.18919	-0.10132	0.01007	0			
Santa Maria	0.05727	0.17275*	0.24634*	0.21342	0		
Três Passos	0.01841	0.00871	0.12545*	-0.13615	0.21263*	0	
Florianópolis	0.13918	0.25702*	0.35455*	0.35403	0.10014	0.23773*	0

Tabela S3. Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as cinco localidades amostradas para *D. bromelioides*. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P <0,05).

Groups	Rio Grande	Ácegua	Erechim	Porto Alegre	Três Passos
Rio Grande	0				
Ácegua	-0.01556	0			
Erechim	0.15341*	0.12633*	0		
Porto Alegre	0.4375*	0.53278*	0.66544*	0	
Três Passos	-0.038	-0.04126	0.2039*	0.53557*	0

Tabela S4. Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as cinco localidades amostradas para *D. bromeliae* sp. III. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P <0,05).

Groups	Bagé	Pelotas	Três Passos	Florianópolis	Porto Alegre
Bagé	0				
Pelotas	-0.02939	0			
Três Passos	-0.05038	-0.04791	0		
Florianópolis	-0.00677	-0.01278	0.00209	0	
Porto Alegre	0.06229	0.06299	0.00686	0.12216*	0

Tabela S5. Índices de fixação de alelos (*Fst*) para o gene COI entre as sete localidades amostradas para *D. denieri*. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P <0,05).

Groups	Antônio Carlos	Bage	Erechim	Florianopolis	Pelotas	PortoAlegre	RioGrande
Antônio Carlos	0						
Bage	0.55*	0					
Erechim	0.4166*	0.12575	0				
Florianopolis	0.61743*	0.1452*	0.16291*	0			
Pelotas	0.49469*	-0.01374	0.08274	0.09091	0		
PortoAlegre	0.76923*	-0.0102	-0.20116	0.09836	-0.14658	0	
RioGrande	0.4742*	0.01852	0.11616	0.0681	-0.07379	-0.10245	0

CAPÍTULO 3 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

3.1 DISCUSSÃO GERAL

Drosofilídeos de ecologia restrita à flores, que apresentam amplo gradiente de especialização-generalização, fornecem um bom modelo para compreender os mecanismos ecológicos e evolutivos que promovem a diferenciação entre as espécies e suas populações. Esta dissertação obteve dados interessantes sobre esses drosofilídeos, onde no manuscrito I documentamos a ampliação da ocorrência de *D. alei* para o sul do Brasil e a importância de técnicas moleculares associados ao DNA-Barcode na detecção de diversidade críptica; e no manuscrito II identificamos que a variabilidade genética tem um comportamento que não é fortemente limitado pelo grau de especialização nesses insetos.

A ampliação da ocorrência geográfica de uma espécie demonstra que o conhecimento taxonômico acerca dos drosofilídeos especialista em flores é bastante incipiente. Isto é suportado pelos achados de Schmitz e Valente (2018), que identificaram quatro novas espécies de FBD e ampliaram a ocorrência geográfica de várias outras espécies. Este grupo de moscas apresenta uma alta diversidade críptica. Como demonstrado pelos nossos dados, *D. alei* e *D. denieri* são bastante similares morfologicamente, o que, combinado com o fato de, muitas vezes, compartilharem recursos, torna bastante difícil distinguir tais espécies.

As espécies do grupo *lutzii* parecem ter surgido no período Neogeno, corroborando com dados preliminares para a família Drosophilidae, onde a maioria das especiações teriam ocorrido entre as épocas do Oligoceno tardio ao Plioceno (TROCKMORTON, 1975; ROBE et al., 2010; IZUMITANI et al., 2018). Já os resultados da Modelagem de Nicho mostraram que, possivelmente, *D. alei* expandiu sua distribuição recentemente para o sul do Brasil, de forma que a atual simpatria reflete um contato secundário entre as três espécies analisadas. Ainda que os resultados da análise de EcoSim indiquem que a competição não parece ter levado ao um maior particionamento de recursos ao longo da história evolutiva das espécies, o compartilhamento de recurso observado para as três espécies em nossas coletadas para *D. alei e D. denieri* (e em estudos prévios para *D. denieri* e *D. lutzii)*, sugerem que a segregação espaço-temporal deve fornecer a estratégia necessária para permitir a coexistência atual. No entanto, resta avaliar se já houve tempo hábil desde o contato secundário das espécies para o surgimento destas adaptações.

Ao estudar fatores ecológicos que levam a padrões genéticos, esta dissertação buscou fornecer *insights* significativos sobre de que forma a especialização ecológica, e consequentemente a amplitude de recurso disponível, pode vir a interferir nos padrões observados. Existem evidências de que espécies de comportamento especialista apresentam menor variabilidade genética quando comparadas com espécies de comportamento generalista. Entretanto, nossos resultados não recuperam uma correlação da diversidade genética e da estrutura populacional com a natureza ecológica de cada espécie. Apesar disso, é importante considerar que a ausência de significância pode ser um artefato do número limitado de comparações realizadas. Assim, a inclusão de novas espécies dentro deste gradiente de especialização/generalização no uso de recursos, pode vir a trazer resultados mais significativos.

Ainda assim, a alta diversidade genética detectada nas espécies de ecologia especialista (*D. incompta* e *D. bromeliae* sp. V) em nossa área de estudo parece garantir a sobrevivência a longo prazo dessas espécies de drosofilideos associados à flores. No entanto, o grau de conectividade de habitat necessário para manter a existência do fluxo gênico entre as subpopulações dessas espécies é completamente desconhecido. Além disso, se a sobrevivência de *D. incompta e D. bromeliae* sp. V e a manutenção de suas populações depende da disponibilidade de recurso utilizado, é possível que fatores ligados à capacidade de dispersão dessas espécies sejam uma forma de driblar à ausência temporária de seus recurso, e consequentemente à perda das suas diversidades genéticas.

Apesar disso, como o esperado para espécies de natureza generalista, nossos estudos recuperaram altos valores de diversidade genética para *D. bromelioides, D. bromeliae* sp. III e *D. denieri,* além de uma baixa estruturação populacional para *D. bromeliae* sp. III. Contudo, também foram recuperados valores altos de *Fst* em *D. bromelioides e D. denieri*. Como essas espécies possuem uma maior disponibilidade de recurso, é provável que as suas populações não precisem dispersar longas distâncias como as espécies de natureza mais especialista. Como consequência, há uma baixa troca de material genético (ou fluxo gênico) entre as suas subpopulações, resultando em maiores níveis de estruturação populacional. Além disso, esses resultados podem estar ligados tanto à fatores ecológicos, como à capacidade de dispersão e/ou competição, ou à fatores ligados à história evolutiva dessas espécies.

Contudo, devido à ausência de informações acerca da ecologia desses organismos, é difícil extrapolar para maiores questões que venham a responder os padrões observados.

3.2 CONCLUSÕES

Ao final desta dissertação, podemos concluir que:

- Drosofilideos associados à flores compõe uma parcela frequentemente negligenciada e subestimada da biodiversidade de drosofilideos;
- A técnica de DNA Barcode é especialmente eficaz na identificação e na delimitação de espécies crípticas de drosofilideos flower-breeding;
- O nível de especialização ecológica não parece ser o único fator determinante na dinâmica populacional de drosofilideos associados à flores;
- Fatores ligados à biologia e/ou a história evolutiva podem estar influenciando os padrões observados.

Com isso, tem-se como perspectivas para continuidade deste trabalho:

- Para o manuscrito 1, a realização de análises de microestruturas morfológicas, e a obtenção de fotografias de alta resolução, mediante o uso de microscopia confocal;

- Para o manuscrito 2, o refinamento das análises, a ampliação do número de espécies no gradiente de especialização-generalização, e o acréscimo de um gene nuclear (a qual já vem sendo amplificado), para a confirmação ou não dos resultados recuperados pelo gene mitocondrial.

5 REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. S.; BOLNICK, D. I; LAYMAN, C. A. The ecological causes of individual specialization. **Ecology Letters**, v. 14, p. 948-958, 2011.

ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON JR., J. N. **The Genetics and Biology of *Drosophila***. vol. 3b. London: Academic Press, 1982

BÄCHLI, G. **Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae**, 2018. Version 1.04. Available at http://www.taxodros.uzh.ch/. Acessado em 2018.

BARTON, N. H.; CHARLESWORTH, B. Genetic revolutions, founder effects, and speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 133-164, 1984.

BLAUTH, M. L.; GOTTSCHALK, M. S. A novel record of Drosophilidae species in the Cerrado biome of the state of Mato Grosso, west-central Brazil. ***Drosophila* Information Service**, v. 90, p. 90-96, 2007.

BRNCIC, D. A note on the flavopilosa group of Drosophila in Rio Grande do Sul, Brazil, with description of two new species (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, p. 647-651, 1978.

BRNCIC, D. Ecological and cytogenetical studies of *Drosophila flavopilosa*, a Neotropical species living in *Cestrum* flowers. **Evolution**, v. 20, n. 1, p. 16-29, 1966.

BRNCIC, D. Ecology of flower breeding *Drosophila*. In: Asburner M.; Carson, H. L.; Thompson, Jr. J. N. The genetics and biology of *Drosophila*. vol 3d. London: Academic press, 1983.

BROAUT, C; SENNEDOT, F.; AUDIOT, P.; LEBLOIS, R.; RASPLUS, Y. Fine-scale genetic structure of two carabid species with contrasted levels of habitat specialization. **Molecular Ecology**, v. 12, p-1731-1745, 2003.

BROUAT, C.; CHEVALLIER, H.; MEUSNIER, S.; NOBLECOURT, T.; RASPLUS, J. Y. Specialization and habitat: special and environmental effects on abundance and genetic diversity of forest generalist and specialist *Carabus* species. **Molecular Ecology**, v. 13, p.1815-1826, 2004.

BUSH, G. L. Modes of animal speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 6, p. 339-364, 1975.

CARSON, H. L. The ecology of *Drosophila* breeding sites. Harold L. Lyon Arboretum Lecture 2. University of Hawaii, 1971.

CENZI DE RÉ, F.; GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; LORETO, E. L. S.; ROBE, L. J. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera: Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion

after the Last Glacial Maximum. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 112, p. 55–66, 2014.

CENZI DE RÉ, F.; ROBE, L. J.; WALLAU, G. L.; LORETO, E. L. S. Inferring the phylogenetic position of the *Drosophila flavopilosa* group: Incongruence within and between mitochondrial and nuclear multilocus datasets. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 5, p. 208-221, 2017.

CORDEIRO, J.; OLIVEIRA, J.; SCHMITZ, H. J; VIZENTIN-BUGONI, J. (em revisão) Modularity of plant-florivore networks is consistent across scales and reveals drivers of high specialization.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.

DE BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatti*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 161-171, 2002.

DELLICOUR, S.; MICHEZ, D.; MARDULYN, P. Comparative phylogeography of five bumblebees: impact of range fragmentation, range size and diet specialization. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.116, p. 926-939, 2015a.

DELLICOUR, S.; MICHEZ, D.; RASPLUS, J-Y.; MARDULYN, P. Impact of past climatic changes and resource availability on the population demography of three food-specialist bees. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 1074-1090, 2015b.

DUDA, O. Die südamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter Berücksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen Arten. **Archiv fur Naturgeschichte***,* v. 91, p. 1-228, 1927.

FANARA, J. J.; HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. **Evolution**, v. 55, p. 2615-2619, 2001.

FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 142-154, 2013.

FRANCO, F. F.; SENE, F. M.; MANFRIN. M. H. Low satellite DNA variability in natural populations of *Drosophila antonietae* involved in different evolutionary events. **Journal of Heredity**, v. 5, p. 650-656, 2010.

GOÑI, B.; MARTINEZ, M. E.; VALENTE, V. L. S.; VILELA, C. R. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 42, p. 131-140, 1998.

GOTTSCHALK, M.S.; HOFMANN, P.R.P. & VALENTE, V.L.S. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Checklist**, v. 4, n. 4, p. 485-518, 2008.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 760 p.

GRIMALDI, D. A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History***,* v. 197, p. 103-268, 1990.

GRIMALDI, D. A. Revision of the *Drosophila bromeliae* Species Group (Diptera: Drosophilidae): Central American, Caribbean, and Andean Species**. American Musem Novitates**, v. 3859, p. 1-55, 2016.

GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; SANTOS, M. H.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Demographic Strucuture and Evolutionary History of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from Atlantic Forest of Southern Brazil. **Zoological Society of Japan**, v. 32, p. 141-150, 2015.

HABEL, J. C.; MEYER, M.; SCHMITT, T. The genetic consequence of differing ecological demands of a generalist and a specialist butterfly species. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 1895-1908, 2009.

HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 451-476, 1997.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HEDRICK, P. W.; GILPIN, M. E. **Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution**. San Diego: Academic Press, 1997.

HOFMANN, P. R. P.; NAPP, M. Genetic-environmental relationship in *Drosophila incompta*, a species of restricted ecology. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21-39, 1984.

HUTCHISON, D. W.; TEMPLETON, A. R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution**, v. 53, n. 6, p. 1898-1914, 1999.

KELLEY, S. T.; FARRELLA, B. D.; MITTON, J. B. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. **Heredity**, v. 84, p. 218-227, 2000.
KOLASA, J.; LI, B. L. 2003. Removing the confounding effect of habitat specialization reveals the stabilizing contribution of diversity to species variability. **Proceedings of the Royal Society**, v. 270, p. 198–201, 2003.

LI, S., JOVELIN, R.; YOSHIGA, T.; RYUSEI, T.; CUTTER, A. D. Specialist versus generalist life histories and nucleotide diversity in *Caenorhabditis* nematodes. **Proceedings of the Royal Society**, v. 281, p. 1-10, 2013.

LUDWIG, A. et al. *Drosophila incompta* develoment without flowers. **Drosoph Inf Serv**, v. 85, p. 40-1, 2002.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Review: Reproductive Ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 22, p. 747-759, 2008.

MORAES, E. M. et al. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136-2147, 2009.

NOSSIL, P. Transition rates between specialization and generalization in phytophagous insects. **Evolution**, v. 8, p. 1701-1706, 2002.

O'GRADY, P. M.; MARKOW, T. A. Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. **Fly**, v. 3, p. 4-10, 2009.

OLIVEIRA, G. F. et al. Contributions of dryland forest (caatinga) to species composition, richness and diversity of Drosophilidae. **Neotropical Entomology**, v. 45, p. 537-547, 2016.

PACKER, L.; ZAYED, A.; GRIXTI, J. C.; RUZ, L.; OWEN, R. E.; VIVALLO, F.; TORO, H. Conservation genetics of pontentially endangered mutualism: Reduced levels of genetic variation in specialist vs. generalist bees. **Conservation Biology**, v. 19, p. 195-202, 2005.

PANDIT, S. N.; KOLASA, J.; COTTENIE K. Contrasts between habitat generalists and speciealists an empirical extension to the basic metacommunity framework. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2253-2269, 2009.

PAVAN, A. C.; MARTINS, F. M.; SANTOS, F. R.; DITCHFIELD, A; REDONDO, R. A. F. Patterns of diversification in two species of shorttailed bats (Carollia Gray 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. Biological Journal of the Linnean Society, v. 102, p. 527-539, 2011.

PERES, E. A.; SILVA, M. J.; SOLFERINI, V. N. Phylogeography of the spider Araneus venatrix (Araneidae) suggests past connections between Amazon and Atlantic rainforests. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 121, p. 771-785, 2017.

POPPE, J. L.; VALENTE V. L. S.; SCHMITZ, H. J. Population dynamics of drosophilids in the Pampa biome in response to temperature. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 269-255, 2013.

QUATTROCCHIO, M. E.; VOLKHEIMER, W.; BORROMEI, A. M.; MARTÍNEZ, M. A. Changes of the palynobiotas in the Mesozoic and Cenozoic of Patagonia: a review. **Biological Journal of Linnean Society**, v. 103, p. 380-396, 2011.

ROBE et al. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. **Mol. Phylogenet. Evol**. v. 36, p. 623-640, 2005.

ROBE, L. J. et al. The *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera: Drosophilidae).**Fly**, v. 7, n. 2, p. 59-69, 2013.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the *Drosophila* subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **Journal Zoological Systematics Evolutionary Research**, v. 48, n. 4, p. 310-321, 2010.

RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2722-2729, 2008.

RUSSO, C. A. M.; MELLO, B.; FRAZÃO, A.; VOLOCH, C. M. Phylogenetic analysis and a time tree for a large drosophilid data set (Diptera: Drosophilidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 765-775, 2013

SAEKI, I. et al. Comparative phylogeography of red maple (*Acer rubrum* L.) and silver maple (*Acer saccharinum* L.): impacts of habitat specialization, hybridization and glacial history. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 992-1005, 2011.

SANTOS LEAL, B. S.; PALMA DA SILVA, C.; PINHEIRO, F. Phylogeography Studies Depict the Role of Space and Time Scales of Plant Speciation in a Highly Diverse Neotropical Region. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, p. 215-230, 2016.

SCHMITZ, H. J. Genética, **Ecologia e Evolução de drosofilídeos (Insecta, Diptera) associados a flores**. 120f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

SCHMITZ, H. J.; HOFMANN, P. R. P. First record of subgeus *Phloridosa* of *Drosophila* in southern Brazil, with notes on breeding sites. **Drosoph Inf Serv**, v. 88, p. 97-101, 2005.

SCHMITZ, H. J.; VALENTE V. L. S. The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the Brazilian fauna. **bioRxiv 402834** https://doi.org/10.1101/402834, 2018.

SCHMITZ, H. J; VALENTE, V. L. S.; HOFMANN, P. R. P. Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 53-64. 2007.

SEPEL, L. M. N. et al. Seasonal fluctuations of *D. cestri* and *D. incompta*, two species of *flavopilosa* group. ***Drosophila* Information Service**, v. 83, p. 122-126, 2000.

SEXTON, J. P.; HANGARTNER, S. B.; HOFFMAN, A. A. Genetic Isolation by Enviroment or Distance: Which Pattern of Gene Flow is Most Common? **Evolution**, v. 68, n. 1, p. 1-15. 2014.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787–792, 1987.

STURTEVANT, A. H. The North American species of *Drosophila*. **Carnegie Institute of Washington Publication, Washington**, p. 1-150, 1921.

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. 1. ed. Ribeirão Preto: SBG, 2011. 705 p.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. **Handb Genet**, v. 3, p. 421-469, 1975.

TOSI, D. et al. On a new cave-dwelling species of bat-guano-breeding *Drosophila* closely related to *D. repleta* Wollaston (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, p. 19-31, 1990.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolution process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 1193-1213, 2013.

VILELA, C. R. Notes on the holotypes of four Neotropical species of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) described by A. H. Sturtevant. **Revista Brasileira de Entolomogia***,* v. 28, p. 245-256, 1984.

VILELA, C. R. The type-series of *Drosophila denieri* Blanchard (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia,** v. 2, p. 223-226, 1986.

VILELA, C. R.; PIETRO, D. A new Costa Rican species of *Drosophila* visiting inflorescences of the hemi-epiphytic climber *Monstera lentii* (Araceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, p. 225-231, 2018.

VILELA, C.R. & BÄCHLI, G. Two new North American *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 75, p. 211-221, 2002.

WANG, I. J.; BRADBURD, G. S. Isolation by environment. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 5649-5662, 2014

WHEELER, M. R.; Takada, H.; Brncic, D. The *flavopilosa* species group of *Drosophila*. **Studies in Genetic II. Univ Texas Publ**, v. 205, p. 394-412, 1962.

WHITLOCK, M. C.; BARTON, N. H. The effective size and subdivided population. **Genetics**, v. 146, p. 427-441, 1997.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.

YANNIC, G. et al. Genetic diversity in caribou linked to past and future climate change. **Nature climate change**, v. 4, p. 132-137, 2014.

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

ZAYED, A.; PACKER, L.; GRIXTI, J. C.; RUZ, L.; OWEN, R. E.; TORO, H. Increased genetic differentiation in a specialist versus a generalista bee: implications for conservation. **Conservation Genetics**, v. 6, p.