

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

**DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS  
DE *Hirtodrosophila* E *Mycodrosophila* (DIPTERA,  
DROSOPHILIDAE) BASEADA EM DADOS  
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**João Pedro Junges dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

**DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE**  
*Hirtodrosophila* E *Mycodrosophila* (DIPTERA,  
**DROSOPHILIDAE) BASEADA EM DADOS MORFOLÓGICOS**  
**E MOLECULARES**

**João Pedro Junges dos Santos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas, Biodiversidade Animal.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lizandra Jaqueline Robe**  
**Coorientador: Prof<sup>º</sup>. Dr. Marco Silva Gottschalk**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

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

Santos, João Pedro Junges dos  
Descrição de novas espécies neotropicais de  
hirtodrosophila e mycodrosophila (diptera,  
drosophilidae) baseada em dados morfológicos e  
moleculares / João Pedro Junges dos Santos.-2013.  
85 f.; 30cm

Orientadora: Lizandra Jaqueline Robe  
Coorientador: Marco Silva Gottschalk  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2013

1. Crise de Biodiversidade 2. Evolução. Micofagia 3.  
Biologia Molecular 4. Morfometria de Asa 5. Taxonomia-  
alfa. I. Robe , Lizandra Jaqueline II. Gottschalk, Marco  
Silva III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**

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

**DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE  
*Hirtodrosophila* E *Mycodrosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)  
BASEADA EM DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

elaborada por  
**João Pedro Junges dos Santos**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



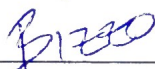
---

**Lizandra Jaqueline Robe, Dra.**  
(Presidente/Orientador)



---

**Fernando Faria Franco, Dr. (UFSCar)**



---

**Luís Eduardo Maestrelli Bizzo, Dr. (UFSC)**

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2013.

## DEDICATÓRIA

*A Marcielly,*

*Teu amor na treva é - um astro  
No silêncio uma canção  
É brisa - nas calmarias  
É abrigo - no tufão*

*Castro Alves,  
Gondoleiro do Amor*

*Aos velhos, novos e eternos parceiros,*

*Quando a gente sabe que é feliz?  
Quando tem amigos!*

*A minha família,*

*Nunca um “faça bonito” fará tanto sentido. E o que dizer do “Amo você” nas  
madrugadas? Por onde andará o “velho” Gordo perdido e a minha Neguinha e  
seu sorriso que não tarda?  
Estão comigo, a cada passo, a cada jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer nominalmente a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação e que me presentearam com sua ajuda e parceria. Porém na iminência de esquecer alguém espero que saiba...

Mesmo se seu nome não esteja listado no papel você certamente está no meu coração.

Agradeço a Lizandra que me abraçou como um filho, mesmo vindo do canto do Brasil e quase falando outra língua. Obrigado Liz principalmente pelo seu sorriso, que sempre me deixou clara a certeza de que você estava lá e que confiava em mim, me dando a liberdade de errar, superar e crescer em um universo de descobertas sem fim.

Quero agradecer ao Chefe, Marco Silva Gottschalk. Se a humildade e a parceria movem o mundo, eis aqui uma fonte de energia eterna. Grande amigo e mestre me fez descrever tantas espécies já descritas que eu acabei ficando de teimoso. Obrigado por acreditar em mim!

Ao professor Élgion que me permitiu fazer parte da família LabDros compartilhando suas experiências e conhecimento através da gigantesca paixão por ensinar Ciência.

Aos companheiros de LabDros, do mate toda tarde e do trabalho, é claro... Camila, Francine, Gabriel, Geovani, José, Larissa, Marcos, Mauro, Paloma, Pedro, Ronaldo, Sinara, Stela e Valéria, que estão listados por ordem alfabética para que a coisa esteja organizada e o Ronaldo não mande email reclamando.

A galera da FURG e UFPel, Lucas, Maurício, Marcel e Felipe que representam, sob o comando da Liz, da Monica e do Marco o futuro dos Drosophilistas mais ao sul com sua parceria e vontade de aprender e ensinar.

A Bruna companheira fiel apesar do pouco tempo que passamos juntos.

Ao Leandro e ao pessoal do Hotel de Trânsito da FURG, parceiro que sempre arrumavam um cantinho onde eu pudesse dormir.

Agradeço especialmente ao Pedro, a Stela e a Francine, filhos de mesma mãe que como tal nos fizemos família.

Ao Gabriel Wallau e ao Daniel Graichen grandes exemplos, que mesmo sendo especiais e singulares ainda me permitiram aprender e curtir os bons momentos de discussão que tivemos.

Ao Jonas, a Geruza e ao Franchesco, companheiros de coleta com os quais vivi histórias que levarei para toda vida e com quem aprendi muito sobre saídas de campo.

Ao Ptolomeu por ser um Professor no sentido literal, professando a paixão por ensinar em todas as suas aulas e por me acolher como um irmão, me oportunizando a liberdade de aprender sem limites.

Gostaria de agradecer a Paloma, ao Pedro e a Mariana por me acolherem em suas casas tantas e tantas vezes e pelos momentos de diversão que tivemos.

Ao Pedro pelo companheirismo e transparência, mesmo quando tentava me enganar dizendo que estava chegando.

A Paloma Rubin que me lembra todos os dias de que ser feliz é o que importa no resto a gente dá um jeito.

Aos meus amigos/irmãos Bruna, Fernanda, Juniano, Edilaine, Adenir Junior e Robson que me ligavam perguntando como as coisas iam, e que me faziam assim ser mais feliz com a certeza de nossa amizade eterna.

Ao vô Ego e a vó Ondina que mesmo estando longe estavam aqui falando comigo toda semana, com saudade.

A vó Lu que me ensinou que o carinho é capaz de mudar o mundo.

A Monica Blauth, minha primeira chefe, que me ensinou junto com o chefe os primeiros passos num “laboratório de *Drosophila*” e continua sorrindo todas as vezes que eu invado sua casa.

Ao Sandro que emprestou a Liz e fez coletas onde quer que eles fossem.

A todos os funcionários dos parques e estações públicas e aos proprietários de sítios e fazendas onde realizamos coletas, pela ajuda na escolha dos caminhos e pela oportunidade de acesso.

Aos órgãos de gerenciamento das Unidades de Conservação, pelo cumprimento do dever com prontidão e eficiência.

Ao Maragato veículo bagual que não arregou qualquer que fosse o solo ou a intempere.

A Meg que me recebia em casa com a felicidade em seu estado puro, genuíno e sem pedir nada em troca a não ser um afago.

A Marcielly, meu anjo, meu amor que madrugou, escreveu listas, corrigiu referências, cozinhou e me abraçou antes que eu caísse.

Aos meus irmãos Paulo e Luciana que trilhando seu caminho me fazem um orgulhoso e feliz irmão mais velho.

E aos meus pais Paulo Lima dos Santos e Odeth Junges dos Santos que sempre me pediram apenas uma coisa todas as vezes que eu saí de casa: Faça o que fizer, Faça Bonito!

“As coisas são semelhantes:  
isto faz a Ciência possível;  
as coisas são diferentes:  
isto faz a Ciência necessária.”  
(Levins e Lewontin, 1985)

“Se procurar bem você acaba encontrando.  
Não há explicação (duvidosa) da vida,  
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

(Carlos Drummond de Andrade)



## RESUMO

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

### **DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE *Hirtodrosophila* E *Mycodrosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE) BASEADA EM DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

AUTOR: JOÃO PEDRO JUNGES DOS SANTOS  
ORIENTADORA: LIZANDRA JAQUELINE ROBE  
CO-ORIENTADOR: MARCO SILVA GOTTSCHALK  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2013.

A família Drosophilidae é composta por moscas que apresentam vários hábitos alimentares. As espécies mais estudadas estão associadas as leveduras que se desenvolvem durante a decomposição de substratos vegetais como cactos, flores e frutos. Contudo, algumas espécies com hábitos mais restritos, como espécies predadoras, da subfamília Steganinae ou as espécies micófagas, permanecem ainda pouco conhecidas. Em gêneros como *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* as informações a cerca de aspectos ecológicos ainda são escassas e pontuais, principalmente na região Neotropical, isso faz com que sejam levantadas várias incertezas quanto a sistemática e taxonomia das espécies destes gêneros. Elucidar algumas destas questões pode ser primordial para o avanço em face à crise de biodiversidade que parece se estabelecer, e a descrição de novas espécies é um passo necessário neste intuito. Assim, o objetivo desta dissertação foi auxiliar na resolução de questões associadas à taxonomia de espécies Neotropicais de *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). Seis novas espécies são descritas, quatro pertencentes ao gênero *Hirtodrosophila* e duas ao gênero *Mycodrosophila*. Aquelas pertencentes a *Hirtodrosophila* são enquadradas no grupo *H. hirticornis*, três delas crípticas entre si, coocorrem em dois pontos de coletas no bioma Amazônico e uma quarta muito similar a *H. morgani* comum no Pampa e em zonas de transição entre o Pampa e a Floresta Atlântica. As novas espécies de *Mycodrosophila* apresentam similaridade com *M. neoprojectans* e *M. projectans* e têm distribuição ao norte do Brasil, ocorrendo no bioma Amazônico, e no bioma Pampa e zona de transição entre Pampa e Floresta Atlântica respectivamente. Para as descrições utilizou-se uma abordagem integrativa entre a escola taxonômica clássica e a análise molecular e morfométrica, cuja aplicação mostrou-se especialmente promissora na busca por suporte à descoberta de novas espécies e sua concomitante descrição.

**Palavras-chave:** Crise de Biodiversidade. Evolução. Micofagia. Biologia Molecular. Morfometria de asa. Taxonomia-alfa.

## ABSTRACT

Master Course Dissertation  
Graduation Program in Animal Biodiversity  
Universidade Federal de Santa Maria

### DESCRIPTION OF NEW NEOTROPICAL SPECIES OF *Hirtodrosophila* AND *Mycodrosophila* BASED ON MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DATA

AUTHOR: JOÃO PEDRO JUNGES DOS SANTOS  
ADVISOR: LIZANDRA JAQUELINE ROBE  
CO-ADVISOR: MARCO SILVA GOTTSCHALK  
Defense Place and Date: Santa Maria, February 26<sup>th</sup>, 2013.

The Drosophilidae family is composed by flies displaying different alimentary habits. The most studied species are associated with yeasts that develop during decomposition of plant substrates such as cacti, flowers and fruits. However, some species with more restrict habits as the predatory species in the subfamily Steganinae or the mycophagous species in different evolutionary lineages in the family, are poorly known. In genera as *Hirtodrosophila* and *Mycodrosophila* the information about ecological aspects is scarce and sporadic, particularly in the Neotropics, this scarcity leaves some appearance of several uncertainties about the systematics and taxonomy from the species of these genera. Clarifying some of these issues may be essential to provide a progress in face of the biodiversity crisis that seems to establish and the description of new species is a necessary step in this way. Therefore, the aim of this dissertation is to help in the resolution of taxonomic questions related to the Neotropical *Hirtodrosophila* and *Mycodrosophila* species (Diptera, Drosophilidae). Six new species are described, four belonging to *Hirtodrosophila* and two to *Mycodrosophila* genera. Those belonging to *Hirtodrosophila* are included into the *H. hirticornis* group, three cryptic species occurring together in the Amazon biome and a fourth species similar to *H. morgani* and common in the Pampa and in the transition between the Pampa and Atlantic Forest biomes. The new *Mycodrosophila* species have similarities with *M. neoprojectans* and *M. projectans* and are distributed in Amazon biome, and in the Pampa biome and in the transition between the Pampa and Atlantic Forest biomes, respectively. For the descriptions we used an integrative approach between the classical taxonomic school and molecular and morphometric analysis, which revealed especially promising in the search for support to the discovery of new species and its concomitant description.

**Keywords:** Biodiversity Crisis. Evolution. Molecular Biology. Mycophagy. Taxonomy. Wing.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 A família Drosophilidae.....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Sistemática de drosophilidae .....	10
1.1.2 Os gêneros <i>Hirtodrosophila</i> e <i>Mycodrosophila</i> .....	12
<b>1.2 Descrição de espécies e DNA Barcode.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Morfometria geométrica: análise de deformações .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 2- ARTIGO I.....</b>	<b>21</b>
<b>Four new Neotropical species from the cryptic group <i>Hirtodrosophila</i></b>	
<b><i>hirticornis</i> (Diptera, Drosophilidae).....</b>	<b>21</b>
Abstract.....	22
1 Introduction .....	23
2 Material and Methods .....	24
2.1 Morphological descriptions .....	24
2.2 DNA manipulation and phenetic/phylogenetic analysis.....	24
2.3 Morphometrics analysis.....	30
3 Results .....	31
3.1 Morphological descriptions .....	31
3.1 Phylogenetic and Morphometric Analysis.....	42
4 Discussion.....	46
4.1 Descriptions .....	46
4.2 Phylogenetic and Morphometric Analysis .....	47
5 Acknowledgments .....	48
6 References .....	48
<b>CAPÍTULO 3 – ARTIGO II.....</b>	<b>52</b>
<b>Two new Neotropical species of <i>Mycodrosophila</i> (Diptera, Drosophilidae)</b>	
<b>proposed by molecular and morphological approaches.....</b>	<b>52</b>
Abstract.....	53
1 Introduction .....	54
2. Material and Methods.....	55
2.1 Collections and Descriptions .....	55
2.2 DNA manipulation and analyses .....	56
3 Results .....	60
3.1 Descriptions .....	60
3.2 Phylogenetic Analysis .....	68
4. Discussion.....	70
4.1 Descriptions .....	70
4.2 Phenetic and Phylogenetic Analysis .....	73
5. Conclusion.....	74
6. Acknowledgements.....	74
7 References .....	74
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>78</b>
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

# CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 A família Drosophilidae

A família Drosophilidae é composta por moscas com os mais variados hábitos alimentares. As espécies melhor estudadas estão relacionadas, preferencialmente, às leveduras que se desenvolvem em substratos vegetais em decomposição, havendo registros de drosofilídeos associados a cactos, flores e frutos (Heed 1977; Hunter 1992; Pitnick e Heed 1994; McEvey e Barker 2001; Grimaldi et al. 2003; Tidon et al. 2005; Raga et al. 2006). Espécies com hábitos mais restritos, como algumas espécies da subfamília Steganinae predadoras de outros insetos (Costa Lima 1937; Culik e Ventura 2009), são menos conhecidas.

Outro hábito alimentar apresentado por diversas espécies de Drosophilidae é a micofagia. Derivado provavelmente do aspecto detritívoro da biologia alimentar do grupo, este hábito pode ser uma característica ancestral ou pode ter surgido várias vezes em sua história evolutiva e em diferentes linhagens, como por exemplo, nos gêneros *Leucophenga* e *Mycodrosophila*, que pertencem a subfamílias diferentes (Throckmorton 1975, Courtney et al. 1990).

Além da diversidade de espécies de drosofilídeos que apresentam o hábito micófago, muitas moscas utilizam as frutificações dos fungos macroscópicos como principal recurso para oviposição e alimentação de suas larvas (Courtney et al. 1990). Porém, essas não são as únicas formas de utilização destas estruturas: os machos de algumas espécies de *Zygothrica*, por exemplo, utilizam fungos como arenas de combate por domínio de território e fêmeas, e apresentam, inclusive, polimorfismos relacionados a este comportamento (Grimaldi 1987). Para este gênero, apenas uma parte das espécies parece utilizar os fungos como recursos para oviposição e alimentação (Courtney et al. 1990). Sugere-se, pois, o uso do termo “micofilia” para descrever esta relação de diferentes espécies de Drosophilidae com fungos com propósitos diferentes e/ou não determinados.

Observada as peculiaridades evolutivas e ecológicas do hábito micofílico em diversas linhagens de drosofilídeos e a quantidade de espécies que apresentam esta característica, cabe ressaltar que os estudos relacionados a estas espécies em algumas regiões biogeográficas, como a região Neotropical, aparecem na literatura de maneira pontual, isolada e descontínua, muitas vezes com outros objetivos que não acessar a biologia associada à micofilia (Frota-

Pessoa 1945, Cordeiro 1952, Burla 1856). Mesmo para o gênero *Drosophila*, a região Neotropical tem poucos estudos diretamente ligados às espécies micofílicas (Roque et al. 2006, Gottschalk et al. 2009)

Algumas descrições pontuais de *Hirtodrosophila*, como as de Frota-Pessoa (1945 e 1951) e Cordeiro (1952), antecedem um dos primeiros trabalhos com a descrição de um grande número de espécies micófagas para a região Neotropical: Burla (1956) apresenta descrições de várias espécies para os gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* em coletas realizadas no Rio de Janeiro. Passados cerca de 30 anos, Grimaldi (1987) traz uma revisão de *Zygothrica* com descrições de novas espécies Neotropicais e de aspectos da sua morfologia, do seu comportamento e do seu relacionamento filogenético, e Courtney et al. (1990) apresentam um trabalho observando vários aspectos ecológicos gerais da micofagia em Drosophilidae.

Estudos recentes têm trazido contribuições ao entendimento da ecologia dos drosophilídeos micófagos para algumas áreas da região Neotropical (Gottschalk et al. 2009). Entretanto várias lacunas taxonômicas ainda precisam ser preenchidas em função do grande número de espécies estimadas que permanecem desconhecidas para a ciência. Grimaldi (1987) avalia que ainda restavam por descrever metade das espécies de *Zygothrica*, que na época possuía 114 espécies e hoje apresenta apenas 10 espécies a mais. *Mycodrosophila*, por sua vez, em 1963 apresentava 40 espécies descritas para todo o mundo e nove para região Neotropical (Wheeler e Takada 1963). Hoje, este gênero possui cerca de 130 espécies em todo mundo (Bächli 2013), mas ainda apresenta as mesmas nove espécies Neotropicais. E quando tratamos de outros gêneros micofílicos, como *Hirtodrosophila*, *Paramycodrosophila* e *Paraliiodrosophila*, o número de espécies e os seus aspectos ecológicos e evolutivos se apresentam ainda mais nebulosos.

### 1.1.1 Sistemática de drosophilidae

Durante boa parte do século 20, alguns trabalhos utilizando caracteres morfológicos em diferentes estágios de desenvolvimento e/ou aspectos reprodutivos tentaram recuperar as relações filogenéticas dentro da família Drosophilidae (Throckmorton 1966 e 1975). Contudo, boa parte dos trabalhos neste período se concentrou em descrições de aspectos taxonômicos, sem inferências a respeito das relações evolutivas entre as espécies (Sturtevant 1921, Duda 1925, Dobzhansky e Pavan 1943, Hsu 1949, Mourão et al. 1965, Kaneshiro 1969). Já no final da década de 1980, trabalhos como os de Okada (1989) e Grimaldi (1987 e 1990) trouxeram

um panorama diferente ao inserir análises filogenéticas em suas inferências e apresentar topologias com suportes para seus ramos. No que tange aos resultados assim apresentados, esses trabalhos ratificaram alguns grupos anteriormente sugeridos, mas também propuseram novos clados.

Outra revolução nas abordagens sobre as relações evolutivas dentro de Drosophilidae ocorreu com a incorporação de ferramentas moleculares para a obtenção de novos marcadores e com o aumento da capacidade de processamento de dados nos computadores. Esta abordagem ganhou força nos últimos 20 anos, com várias contribuições importantes à sistemática de Drosophilidae. A utilização de ferramentas moleculares trouxe contribuições principalmente por possibilitar a utilização de um novo conjunto de análises estatísticas, que permitiram agregar maior confiabilidade às relações propostas (Russo et al. 1995) e avaliar um conjunto de aspectos que dificilmente podiam ser avaliados para os caracteres até então utilizados nas inferências filogenéticas, como a forma de herança, tempos de divergência e padrões de evolução molecular (DeSalle e Grimaldi 1991).

Com todos os avanços alcançados entre as várias abordagens, uma das principais inferências sobre as relações filogenéticas em Drosophilidae dizem respeito ao estabelecimento do monofiletismo da família bem como das suas duas subfamílias, Steganinae e Drosophilinae (Okada 1989, Grimaldi 1990, DeSalle e Grimaldi 1991). Entretanto, um grande número de conflitos surgiu a partir destas abordagens, como por exemplo, a parafilia do gênero *Drosophila*, que apesar de ser abordada por vários autores ao longo do tempo ainda permanece controversa (Throckmorton 1975, Grimaldi 1990, Remsen e O'Grady 2002). Recentemente, a provável parafilia de *Drosophila* gerou uma série de discussões no Boletim de Nomenclatura Zoológica, que envolveram sugestões de alterações na hierarquia taxonômica de subgêneros de *Drosophila* ou de gêneros a ele relacionados. Inclusive é sugerida a mudança da espécie tipo do gênero *Drosophila* em função da possibilidade de elevação do subgênero *Sophophora* a categoria de gênero, com implicação da mudança do nome da espécie modelo *Drosophila melanogaster* (van der Linde et al. 2007, O'Grady et al 2008, Sidorenko 2008, Yassin 2008).

Também existem discussões sobre posicionamento de outros gêneros dentro de Drosophilidae, como é o caso do grupo genérico *Zygothrica*, onde estão inseridos *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila*, *Paramycodrosophila* e *Zygothrica*. Este grupo apresenta como principais sinapomorfias, a esclerotização da região posterior do cibarium, a presença de apenas um ramo ventral na arista e de uma placa hipoproctal na região medial ventral dos cercos (Grimaldi 1990). O autor ainda sugere que o grupo

*Zygothrica* é proximamente relacionado aos drosofilídeos havaianos, compondo com estes um clado basal dentro de Drosophilinae ainda que com divergência posterior a de *Chymomyza* e *Scaptodrosophila*. Contudo vários trabalhos inserem os gêneros deste grupo em ramos internos do subgênero *Drosophila* (DeSalle e Grimaldi 1991, Kwiatowski e Ayala 1999, Remnsen e Ogrady 2002, Da Lage et al. 2007, van der Linde e Houle 2008, van der Linde et al. 2010), e no caso de *Hirtodrosophila* algumas vezes são ressaltadas incertezas inclusive sobre sua monofilia (van der Linde et al. 2010).

O posicionamento do grupo de gêneros *Zygothrica* é uma das incertezas que os recentes estudos renovam para Drosophilidae, visto que este grupo já havia sido inserido em *Drosophila* por Throckmorton (1975), mesmo sem a utilização de um grande número de marcadores ou métodos sofisticados de estatística. Neste sentido, é interessante observar que o estudo mais recente sobre a sistemática de Drosophilidae (Yassin, 2013) também apresenta as espécies de *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* em um mesmo clado dentro do gênero *Drosophila*, ressaltando a parafilia deste último, embora o autor evite sugerir modificações taxonômicas para não afetar os nomes das espécies modelo.

### 1.1.2 Os gêneros *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila*

As moscas destes gêneros normalmente são coletadas junto a espécimes pertencentes aos demais gêneros do grupo genérico *Zygothrica*, em função de sua biologia associada a estruturas de frutificação de fungos macroscópicos, por exemplo, dos gêneros *Auricularia* e *Polyporus* (Burla 1956, Wheeler e Takada 1963). Atualmente, das 160 espécies de *Hirtodrosophila*, 28 apresentam distribuição para a Região Neotropical e, destas, 16 tem registros no Brasil (Vilela e Bächli 2004, Gottschalk et al. 2008). Já o gênero *Mycodrosophila* tem cerca de 80% das suas 127 (Bächli, 2013) espécies distribuídas nas regiões Afrotropical, Australasiana e Oriental e apenas seis espécies com registros para o Neotrópico (Wheeler e Takada 1963, McEvey 2005). Além do pequeno número de espécies, os registros destes gêneros na região Neotropical também são escassos (Gottschalk 2009).

Segundo Frota-Pessoa (1951), o baixo número de registros de *Hirtodrosophila* na região Neotropical está relacionado à concentração das pesquisas em drosofilídeos frugívoros e na utilização de armadilhas com iscas de banana fermentada nas coletas, o que apenas eventualmente atrai as espécies destes gêneros. Este argumento certamente também pode ser estendido a *Mycodrosophila*. Neste sentido, diversos trabalhos sugerem que existam várias espécies de drosofilídeos ainda não descritas no Brasil em função da escassez de estudos

sobre alguns ambientes e hábitos (Medeiros e Klaczko 2004, Gottschalk et al. 2008, Hochmüller et al. 2010, Bolzan 2011). É, pois, compreensível que a escassez de coletas direcionadas à amostragem de drosofilídeos micófagos leve a um baixo conhecimento de suas características, sejam elas ecológicas ou até mesmo evolutivas e isto pode estar refletido no controverso posicionamento filogenético destes gêneros dentro de Drosophilidae (Robe et al. 2010a).

O primeiro estudo que aborda as relações filogenéticas de *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* com os demais drosofilídeos, realizado por Throckmorton (1975), trata Drosophilidae como um táxon monofilético, com várias radiações que se originaram quase que simultaneamente há cerca de 50 milhões de anos, e insere o então subgênero *Hirtodrosophila* e o gênero *Mycodrosophila* na radiação *immigrans-Hirtodrosophila* da radiação *Drosophila* (Fig. 1). Ainda segundo o autor, *immigrans-Hirtodrosophila* divergiu no Velho Mundo e alcançou o Novo Mundo através das radiações *tripunctata* e *Hirtodrosophila*, esta última dando origem também aos gêneros *Zygothrica*, *Paramycodrosophila*, *Scaptomyza*, ao subgênero *Dorsilopha* e aos drosofilídeos havaianos.

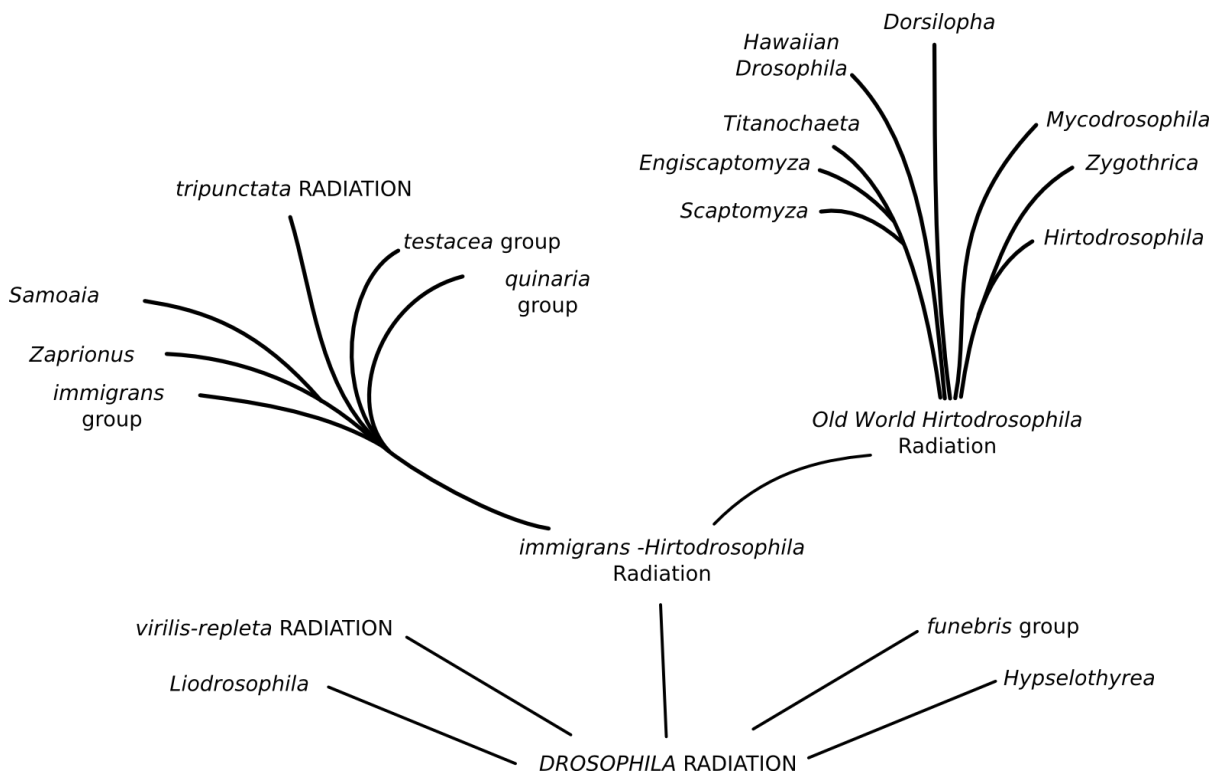


Figura 1. Parte do esquema das relações filogenéticas de Drosophilidae proposto por Throckmorton (1975), inserindo os gêneros do grupo *Zygothrica* dentro radiação *Drosophila*. (Baseado em Markow e O'grady, 2006)



Apesar das contribuições apresentadas, Throckmorton (1975) não apresenta nenhuma análise filogenética em seu trabalho, baseando-se apenas em comparações morfológicas relacionadas aos caracteres reprodutivos internos para estimar as relações entre os diferentes táxons. Grimaldi (1990) faz uma análise filogenética utilizando características morfológicas adultas dos principais grupos taxonômicos de Drosophilidae e propõe uma atualização na sua classificação, sugerindo algumas mudanças taxonômicas como, por exemplo, a elevação dos subgêneros *Hirtodrosophila*, *Scaptodrosophila*, *Antopocerus*, *Engiscaptomyza* e *Lordiphosa* ao nível de gênero e o agrupamento de *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* no grupo de gêneros *Zygothrica*.

Alguns trabalhos reforçam os resultados anteriores quanto a afinidade evolutiva de *Hirtodrosophila*, *Zygothrica* e *Mycodrosophila* (Remsen e O'Grady 2002, Da Lage et al. 2007, van der Linde 2010), mas consideram duas possibilidades distintas de relação com os demais gêneros de Drosophilinae: DeSalle e Grimaldi (1991) e Remsen e O'Grady (2002) posicionam *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* junto a base desta subfamília [concordando com Grimaldi (1990) ] (Fig. 2), enquanto Kwiatowsky e Ayala (1999) (apenas para *Hirtodrosophila*), e Da Lage et al. (2007) (para os dois gêneros) relacionam os mesmos diretamente ao subgênero *Drosophila* [concordando com Throckmorton (1975)]. Okada (1989), no entanto, insere *Mycodrosophila* dentro da tribo Dettopsomyini, que apesar de contar também com *Paramycodrosophila*, é apresentada como grupo irmão da tribo Drosophilini, onde está inserido, junto a muitos outros, o gênero *Zygothrica*, afastando a ideia de um grupo monofilético contendo *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Em geral, entretanto, a literatura apresentando evidências que suportam a proximidade evolutiva entre *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* é vasta (Throckmorton 1975, Grimaldi 1990, DeSalle e Grimaldi 1991, Da Lage et al. 2007, van der Linde et al. 2010 e Yassin 2013). Contudo, vários destes trabalhos destacam novamente a inserção dos gêneros do grupo *Zygothrica*, bem como de *Liodrosophila*, *Scaptomyza* e *Zaprionus*, dentro do subgênero *Drosophila* (Da Lage et al. 2007, van der Linde et al. 2010 e Yassin 2013).

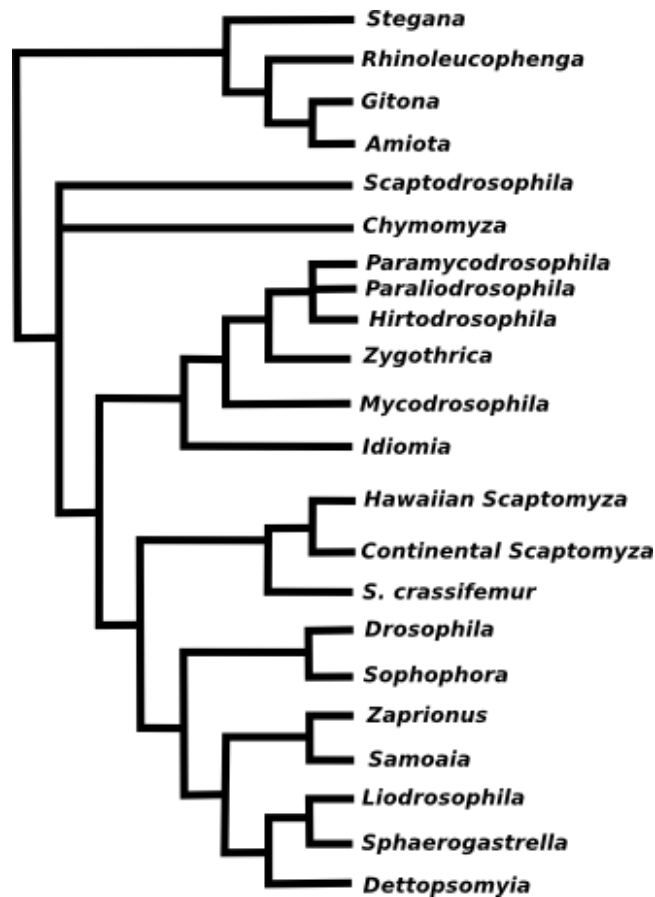


Figura 2. Relações filogenéticas de Drosophilidae propostas por Grimaldi (1990), inserindo os gêneros do grupo *Zygothrica* em uma posição basal ao gênero *Drosophila*. (Baseado em Remsen e O'grady, 2002)

No que se refere às relações intragenéricas, o próprio Throckmorton (1975) já sugere que *Hirtodrosophila* possa ser um agrupamento artificial, apresentando diferentes ramificações para cada um dos seus grupos de espécies. Posteriormente, tanto Da Lage et al. (2007) quanto van der Linde et al. (2010) apresentam *Hirtodrosophila* como um táxon polifilético. Este último é, inclusive, o único estudo filogenético anterior a 2013 utilizando mais de duas espécies do gênero, e apresenta *H. duncani* como grupo-irmão do clado formado pelos grupos de *D. saltans* e *D. willistoni*, enquanto o clado formado por *H. pictiventris* e *H. thoracis* é posicionado basalmente em relação à radiação *immigrans-tripunctata*. *Hirtodrosophila duncani* também foi apresentada por Throckmorton (1975) como a espécie mais primitiva dentro do então subgênero *Hirtodrosophila*. Mesmo sem utilizar *H. duncani*, Yassin (2013) também apresentou indícios da ausência de monofilia para *Hirtodrosophila*: dentre as seis espécies pertencentes ao gênero por ele amostradas, cinco formaram um agrupamento parafilético com relação a *Zygothrica dispar*, e a sexta, *H. actinia*, agrupou junto ao clado majoritariamente composto por espécies de *Scaptodrosophila*.

*Mycodrosophila*, porém, não apresenta nenhum estudo tratando especialmente de suas relações evolutivas e é apenas assumido como sendo um agrupamento monofilético. Neste sentido, a maioria dos trabalhos onde este gênero é inserido em análises filogenéticas, apenas uma única espécie é utilizada (Grimaldi 1990, DeSalle e Grimaldi 1991, Da Lage et al. 2007), à exceção do estudo recente de Yassin (2013), onde duas espécies são inseridas na análise. Assim, embora *M. duncani* e *M. poecilogastra* tenham sido agrupadas com suporte razoável neste último estudo, muitas espécies permanecem por ser incluídas em estudos como este antes que conclusões mais realistas acerca da monofilia/merofilia do gênero possam ser tomadas.

Mesmo a taxonomia de ambos os gêneros ainda permanece pouco conhecida (Okada 1986, Vilela e Bächli 2004). Neste aspecto, *Hirtodrosophila* apresenta 111 espécies distribuídas em 10 grupos sendo o grupo *H. hirticornis* o mais rico, com 65 espécies. Entretanto, o gênero ainda possui 49 espécies não agrupadas, perfazendo um total de 160 espécies (Bächli 2013). Vilela e Bächli (2004) redescrevem nove espécies Neotropicais de *Hirtodrosophila*, sendo quatro pertencentes ao grupo *H. hirticornis*, mas ressaltam que as espécies Neotropicais deste grupo apresentam diferenças com relação às demais que poderiam inseri-las em um subgrupo independente ou mesmo em um novo grupo de espécies. Entretanto, os autores não fazem qualquer proposta mais efetiva quanto a hierarquia taxonômica destas espécies em função da ausência de análises filogenéticas para grupo.

Em *Mycodrosophila*, dois subgêneros são atualmente aceitos: *Mycodrosophila* Oldenberg 1914, com 75 espécies, baseado principalmente na presença de um *lappet* bem desenvolvido e de uma mancha sob a segunda quebra da nervura costal; e *Promycodrosophila* Okada 1986, com 14 espécies, cuja diagnose se apóia na ausência das características que sustentam o outro subgênero. Além destas, existem 38 espécies que não estão inseridas em nenhum dos subgêneros. Okada (1986) destaca que algumas espécies podem variar e apresentar características diferentes da diagnose. Contudo, a classificação dos dois subgêneros é utilizada em vários trabalhos posteriores para descrever novas espécies de *Mycodrosophila* (Wynn e Toda 1990, Tsacas e Chassagnard 1991, Chassagnard e Lachaise 2000, McEvey e Polak 2005).

## 1.2 Descrição de espécies e DNA Barcode

A tecnologia do DNA Barcode proposta por Hebert et al. (2003) a partir da utilização de uma sequência de 648 pares de base do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I

(*COI*) apresenta dois objetivos claros: (1) tornar possível a identificação de espécimes que não podem ser identificados por uma abordagem tradicional e (2) tornar possível a descoberta de novas espécies, quando a cripticidade entre os organismos tornar complexa sua correta identificação e separação.

Esta abordagem parece simples e traz esperanças de resolução para alguns problemas dentro da taxonomia como, por exemplo, a dificuldade de classificação de fêmeas, organismos juvenis e espécies crípticas, como ocorre com vários grupos de insetos (Thierry-Vaglia et al. 2008, Burns et al. 2010, Hernandez-Traiana et al. 2012). Contudo, alguns requisitos são indispensáveis para que esta metodologia seja aplicável, como a criação de um banco de dados onde sequências de *COI* confiáveis possam ser armazenadas e a determinação do limiar de distância para que sejam diferenciadas as espécies (Hebert et al. 2003, Yassin et al. 2010).

Desde sua proposta, a tecnologia DNA Barcode vem sendo aplicada em trabalhos com vários grupos animais. Em uma revisão sobre o progresso desta tecnologia, Jinbo et al. (2011) apresentam que cerca de 79.320 espécies, considerando apenas a classe Insecta, já possuem sequências de referência disponíveis no website do projeto *Barcode of Life Data System* (BOLD) desenvolvido por Ratnasingham e Hebert (2007). Além disso, uma nova iniciativa, nomeada *International Barcode of Life*, desenvolvida a partir de 2010 por colaboração entre 26 países, tem como um de seus objetivos criar um banco de dados para 500.000 espécies já nos seus primeiros cinco anos de implantação.

Com a adesão de um grande número de pesquisadores e com a ampliação dos bancos de dados e estudos relacionados, a tecnologia do DNA Barcode começa a ser explorada também durante as descrições de novas espécies (Smith et al. 2008, Cabezas et al. 2009, Jinbo et al. 2011). Contudo, como já é ressaltado durante a própria proposta da metodologia por Hebert et al. (2003) e novamente por Jinbo et al. (2011), apenas uma sequência de um único gene (ou mesmo de mais genes) não é suficiente para caracterizar uma espécie, assim como características morfológicas exclusivamente também não o são. Além disso, Goldenstein e DeSalle (2010) defendem que embora a ferramenta do DNA Barcoding apresente um considerável potencial para a identificação e criação de hipóteses de novas espécies, esse potencial é multiplicado ao reconhecermos suas limitações.

Porém, apesar das contribuições reais ou potenciais que a tecnologia do DNA Barcode apresenta na resolução de diferentes problemas associados à prática taxonômica, ela não alcançou um consenso junto a comunidade científica. Desde sua proposta, várias discussões comparando e, muitas vezes, confrontando metodologias moleculares e morfológicas e suas

aplicações para a taxonomia surgiram (Holynski 2009, Cook et al 2010, Ebach 2011). Estes trabalhos vêm ressaltando os benefícios de uma metodologia em detrimento da outra, embora algumas vezes abordagens mais integrativas sejam defendidas (Dayrat 2005, Goldenstein e DeSalle 2010). A discussão proposta por Page e Hughes (2011), no entanto, apresenta um contexto que revisa a “óbvia utilidade” das duas metodologias e destaca que, apesar de que ambas sejam capazes de fornecer contribuições importantes, as análises morfológicas e moleculares não esgotam todas as características para definir um organismo vivo. Assim, apesar de algumas vezes ser uma tarefa difícil, uma abordagem integrativa pode ser possível (Smith et al. 2008) e parece ser o melhor caminho.

Avaliando as abordagens dentro da sistemática de *Drosophilidae*, como já representado anteriormente, temos uma série de estudos utilizando caracteres morfológicos e moleculares e analisando os contrastes e concordâncias destes quanto às relações filogenéticas suportadas. Entretanto, a descrição de novas espécies sugeridas a partir de uma abordagem molecular e depois corroboradas por uma avaliação taxonômica tradicional (ou vice-versa) ainda aparecem como uma novidade, apesar de existirem estudos nesta linha com outros grupos de artrópodes e insetos (Földvári et al. 2007, Smith et al. 2008 e Cabezas et al. 2009).

Recentemente, Bolzan (2011) analisou a eficiência da tecnologia do DNA Barcode na correta identificação de espécies para quatro membros do grupo genérico *Zygothrica*: *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Paraliodrosophila* e *Zygothrica*. Utilizando sequências dos genes mitocondriais *COI* (citocromo oxidase c subunidade I) e *COII* (citocromo oxidase c subunidade II) a autora conseguiu associar as espécies moleculares às respectivas espécies morfológicas e também sugerir a existência de espécies novas, que foram previamente tratadas como espécies descritas na avaliação morfológica, mas revelaram-se linhagens independentes na análise molecular. Assim, através de suas análises, Bolzan (2011) constatou a existência de uma fauna críptica associada às espécies já descritas.

### **1.3 Morfometria geométrica: análise de deformações**

A morfometria geométrica, tal como a conhecemos hoje, surgiu a partir do conceito de morfometria tradicional, em que análises estatísticas multivariadas eram aplicadas a um conjunto de dados como medidas, razões e ângulos, obtidos a partir de um conjunto de marcos anatômicos (Rohlf e Marcus 1993). Contudo a abordagem da morfometria tradicional apresentava alguns problemas, como por exemplo, a obtenção de medidas de forma com o efeito do tamanho, a obtenção de medidas a partir de estruturas homólogas, e a dificuldade

gráfica de apresentar as variações de forma (Rohlf e Marcus 1993, Rohlf 2002, Adams 2004).

Neste contexto, os avanços apresentados pela morfometria geométrica com relação à abordagem tradicional foram: o desenvolvimento das análises estatísticas envolvendo a forma das estruturas mensuradas; e as novas técnicas para a representação gráfica dos resultados, para que pudessem ser estudadas as propriedades do espaço multidimensional, onde as distâncias entre amostras estão inseridas (Rohlf 2002). Desta maneira, através da definição dos marcos anatômicos, os efeitos de tamanho, orientação e localização puderam ser retirados, de maneira que apenas a forma fosse comparada (Kendall 1977, Rohlf 2002).

O método mais utilizado para a realização das transformações de tamanho, orientação e localização é a superimposição ortogonal pelos quadrados mínimos, que superpõe as configurações dos marcos anatômicos a uma configuração de referência, que pode ser baseada em um espécime preestabelecido ou mesmo sobre a média de uma amostra. Esta metodologia tenta relacionar a posição dos marcos de maneira que a soma dos quadrados das distâncias entre marcos correspondentes seja a menor possível (Monteiro e Reis 1999).

Para realizar a transformação de maneira a retirar o efeito da localização, deve ser realizada a translação das configurações que ocorre primeiro a partir do cálculo do centróide (centro de massa de uma configuração) e então da subtração das coordenadas de cada marco das coordenadas do centróide. Para a padronização do tamanho, as distâncias entre os marcos e o centróide são obtidas, e o vetor formado por estas distâncias, chamado de vetor do centróide, passa a representar o tamanho padrão da configuração.

A última transformação, a rotação tem por objetivo aproximar os marcos homólogos o máximo possível, para retirar o efeito da orientação das figuras a serem comparadas. Este procedimento ocorre a partir da redução de distâncias entre os marcos através do cálculo do ângulo ótimo de rotação. Com o cálculo do ângulo ótimo, as novas coordenadas são designadas e as figuras são rotacionadas de maneira a aproximar os pontos correspondentes.

A morfometria geométrica utilizando a análise de marcos anatômicos para a obtenção de dados comparativos de forma aparece em muitos estudos com insetos, aplicada, por exemplo, a comparação entre estruturas do tórax [como em Garnier et al. (2005)], da genitália masculina [em Franco et al. (2005)] ou das asas [em Francoy et al. (2011)]. Esta ferramenta é utilizada também em estudos com diferentes objetivos, como comparações entre populações, estudos taxonômicos e até mesmo filogenéticos (Sadeghi 2009, Klingenberg e Gidaszewski 2010, Irati 2011 e Francoy et al 2011).

Em estudos com *Drosophilidae*, esta metodologia tem sido aplicada a trabalhos relacionados, principalmente: (1) à interação entre o genótipo e o ambiente e as possíveis

alterações no formato das asas (Hatadani e Klaczko 2008), (2) à tentativa de recuperação de sinal filogenético utilizando marcos anatômicos homólogos em asas (Klingenberg e Gidaszewski 2010), (3) à determinação e identificação de características diagnósticas na estrutura da genitália masculina para separar espécies crípticas (Franco et al. 2006). Neste último aspecto, em particular, análises morfométricas aplicadas à análise da forma da genitália masculina ou mesmo das asas podem, pois, se revelar ferramentas úteis também na descoberta de espécies novas e/ou na sua descrição.

#### **1.4 Objetivos**

O objetivo deste estudo foi auxiliar na resolução de questões associadas à taxonomia de espécies Neotropicais de *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae) através das seguintes etapas, tratadas como objetivos específicos:

- Descrever novas espécies pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila*;
- Avaliar o potencial de metodologias clássicas, moleculares e morfométricas no suporte a essas descrições.

## CAPÍTULO 2- ARTIGO I

### **Four new Neotropical species from the cryptic group *Hirtodrosophila hirticornis* (Diptera, Drosophilidae)**

João Junges<sup>1</sup>, Lizandra Jaqueline Robe<sup>1,2</sup>, Elgion Lucio da Silva Loreto<sup>1</sup> and Marco Silva  
Gottschalk<sup>3</sup>

- 1 - Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria,  
Santa Maria, RS, Brasil.
- 2 - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.
- 3 - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.



## Abstract

*Hirtodrosophila* Duda 1923 is a world-widely distributed genus associated with fungus. This genus encompasses about 30 Neotropical species, which are subdivided in two principal groups: *H. thoracis* Grimaldi 1987 and *H. hirticornis* Burla 1956, although some species remain as yet ungrouped. The Neotropical species of *H. hirticornis* group are a set of four sibling yellow flies, which are very difficult to identify based only on external morphology, a fact that partially explains the knowledge gap regarding ecology, biology and evolution of the group. The male terminalia is usually employed in species determinations, but illustrations in some original descriptions had turned it hard to provide accurate identifications. The Neotropical species of the *H. hirticornis* group were recently revisited and the male terminalia reillustrated permitting a correct identification for male specimens, although females remain simply unrecognizable. We describe here four new species from the Neotropical *H. hirticornis* group, using an integrative approach of both molecular and morphological data and present some discussions among the new and the already described species.

Key words: Cytochrome Oxidase subunit I, DNA Barcoding, Male terminalia, Sibling species, Morphometry.

## 1 Introduction

For several groups of Drosophilidae Rondani 1856, as well as for most insects, sibling species identification based only on external morphology is a hard task, and the male terminalia has provided an useful tool to solve this problem (Sturtevanti 1921, Hsu 1949, Vilela and Bächli 1990). Nevertheless, some species remain difficult to distinguish even using this approach, and females remain unknown for most species in the family.

Some studies regarding sibling species and populations have tried to investigate the potential of different strategies based on morphological and molecular characters for taxon recognition and segregation (Franco et al. 2006, Sadeghi et al. 2009, Irati 2011). Analyses like these can not only help on species identification, but also enhance description of new species by making the process faster, a real need in face of the biodiversity crisis and the delay in species descriptions (Fontaine et al. 2012).

DNA Barcoding technology was created in order to link molecular sequences from the *COI* (*cytochrome oxidase subunit I*) gene to the respective Linnean species (Hebert et al. 2003). This seems to be a good tool to solve problems with cryptic organisms and species description, because it works with the union among phenetic and phylogenetic approaches. This methodology allows to access biodiversity variation in a way that is difficult to envision based on traditional means (Hebert et al. 2003, Cabezas et al. 2009). Nevertheless, several authors emphasize the need of an integrative approach attempting to reconcile molecular information with other sources of characters (DeSalle et al, 2005 Smith et al. 2005, Goldenstein and De Salle 2011), in order to obtain a better picture of the real situation, since either methodology has its own pitfalls (Morits and Cicero 2004, Hurst and Jiggins 2005, Page and Hughes 2011).

*Hirtodrosophila* was proposed as a new genus by Duda (1923) and later considered a subgenus of *Drosophila* Fallen 1823 in Duda (1924). Later, it was elevated once more to the generic status by Grimaldi (1990), although its monophyly (van der Linde 2010, Yassin 2013) and its phylogenetic position within Drosophilidae remain open questions (Vilela and Bächli 2004, Da Lage et al. 2007, Yassin 2013). The 28 *Hirtodrosophila* species as yet recorded for the Neotropical region (Vilela and Bächli 2004) are often alluded only for their original descriptions, which frequently is insufficient to identify the species due to the lack of adequate illustrations (Vilela and Bächli 2004). These Neotropical *Hirtodrosophila* species are subdivided in two principal groups: *H. thoracis* and *H. hirticornis*, although some species remain as yet ungrouped (Bächli 2013).

The world-widely distributed *H. hirticornis* group (Burla 1956) encompasses 65 species as a

whole, and is represented in the Neotropical region by flies with a yellow body, a strip from below the wing base to the postpronotum and diffuse marginal bands in the abdominal tergites (Vilela and Bächli 2004). The four Neotropical species *H. gilva* Burla 1956, *H. mendeli* Mourão, Gallo and Bicudo 1965, *H. morgani* Mourão, Gallo and Bicudo 1967 and *H. subgilva* Burla 1956 were described from punctual collections, and their biology and ecology are poorly known. These species are cryptic with *H. minuscula* Vilela and Bächli 2005 and *H. gavea* Vilela and Bächli 2005 in terms of external morphology, and are hardly distinguished even through their male terminalia. Comparing Neotropical species from *H. hirticornis* group through a molecular analysis of the *COI* gene, a morphometric analysis from the wings and illustrations from male terminalia we provided evidences that there are four additional *H. hirticornis* species, which are here described.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Morphological descriptions

The new species described were collected in Amazon and Pampa biomes (Fig. 1). The flies were caught flying over fungi fructification bodies of *Auricularia* Bull. ex Juss. 1789 (Auriculariales, Auriculariaceae) (Fig. 2) using a manual modified entomological aspirator. Collections were carried out during the summer and the autumn seasons of 2011 and 2012 (in November, 14th 2011, January, 12th 2012 and May, 20th 2012), in three areas in the Amazon biome, two in forest fragments and one in the Caxiuanã National Forest and one forest fragment in the Pampa biome.

The 15 flies used to descriptions were stored in microtubes with 100% alcohol and had their post abdomen dissected and their terminalia fixed in slides with Canada balsam. Measurements and body descriptions were performed following the methodology described by Bächli et al. (2004) and Vilela et al. (2004). Index average followed by the range (in brackets) is presented whenever more than one specimen was analyzed. Male terminalia were drawn using a *camera lucida* attached to an optical microscope (Olympus BX40) with a 40x objective lens and a 10x ocular lens.

### 2.2 DNA manipulation and phenetic/phylogenetic analysis

For the DNA extractions were used 25 *Hirtodrosophila* flies from six species which were collected flying over *Auricularia* body fructifications and stored in alcohol 100%. Each specimen had its post abdomen dissected and stored, while the rest of the body structure was destined for genomic DNA extraction using NucleoSpin Tissue XS kit (MACHEREY-NAGEL). A fragment of the mitochondrial *COI* gene was then amplified using the TYJ1460 and C1N2329 primers (Simon et al. 1994). PCR products were purified with PEG 13% (Polyethylene glycol) and NaCl 1,6M and

directly sequenced with a MegaBace 500 automatic sequencer, using a DYEnamic ET® Sequencing Kit (Amersham) and the same pair of primers as in PCR.

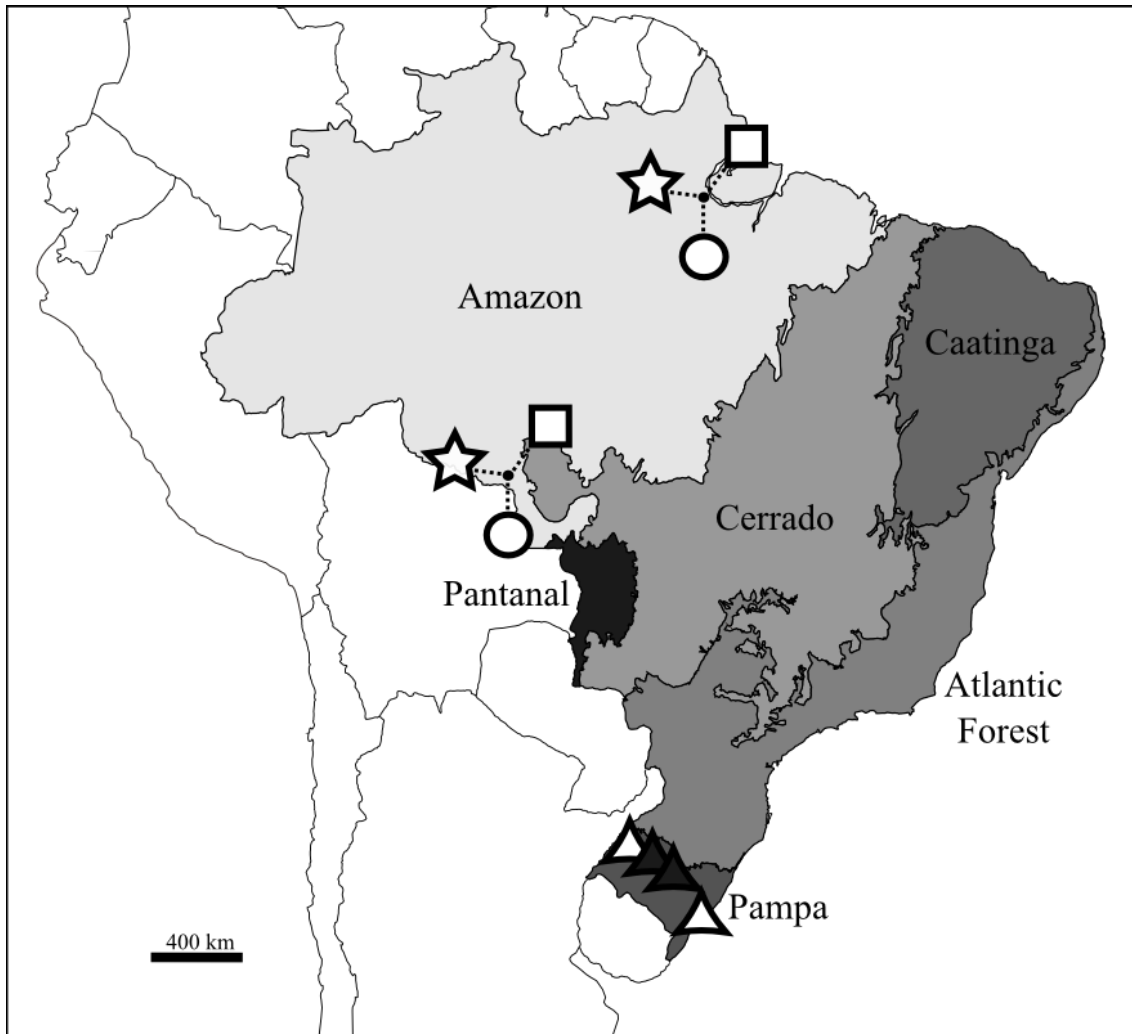


Figure 1. Brazilian Biomes according to IBGE (2013) and the occurrence records from *Hirtodrosophila* sp1 (square), *Hirtodrosophila* sp2(stars), *Hirtodrosophila* sp3 (circles) and *Hirtodrosophila* sp4 (triangles). The white filled symbols represent the location from the type series of each species.



Figure 2. Collection site from *Hirtodrosophila* species, *Auricularia* sp. fructification bodies.

To the phylogenetic analyses, 25 sequences from *Hirtodrosophila* flies (Table 1) were assembled and edited in Gap 4 software of Staden package (Staden 1996). Twelve other sequences, five from *Hirtodrosophila* and seven from *Acletoxenus*, *Amiota*, *Ceratitis* (Tephritidae) and *Leucophenga* were downloaded from GenBank (Table 1) and aligned with ours using the Clustaw W algorithm, as implemented in the MEGA 5.0 software (Tamura et al. 2007). *Acletoxenus*, *Amiota*, *Ceratitis* and *Leucophenga* were used as outgroups, since they belong to a different *Drosophilidae* subfamily or even to a different *Diptera* family.

First, intra and interspecific distances were estimated through the use of the Kimura 2-Parameters evolutionary model (Kimura 1980), as originally proposed for the DNA Barcoding approach (Hebert et al. 2003). Then, phylogenetic analyses were executed with the use of four different methodologies. A Bayesian analysis (BA) was performed in MrBayes 3.2.1 (Ronquist et al. 2012) using 2,000,000 of generations of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) search, sampling every 200 generations and burn-in the initial 25% of the results. The maximum likelihood analysis (ML) was carried out in the PhyML software (Guindon and Gascuel 2003) using an optimized

starting tree obtained through a Neighbor-Joining search (NJ). Both the BA and ML analyses were performed with the GTR+G+I model, as selected by the AIC criteria performed by MrModelTest 2.3 (Nylander 2004) and Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 1998), respectively. A Maximum Parsimony analysis (MP) was executed using Paup 4.0b10 (Swofford 2003) by heuristic search with Tree Bisection and Reconnection branch swapping in a group of 100 random stepwise addition starting trees. At last, a NJ analysis was performed in Mega 5.0 using the Tamura-Nei model (Tamura and Nei 1993) with a Gamma correction, with an alpha estimate of 0.15, as indicate in ModelTest results. In this case, GTR couldn't be accordingly employed due to Mega's NJ model availability constraints, and TN was chosen due to its similarity with the first. Bootstrap tests with 1,000 replications were used to measure node supports for ML, MP and NJ analyses, and the posterior probability of each clade was calculated for BA.

Table 1. Taxonomic position, geographical origin and COI gene sequences GenBank Accession numbers for *Hirtodrosophila* species and outgroups.

Family	Subfamily	Species	Locarion	Accession Number*
Drosophilidae Rondani 1856	Drosophilinae Rondani 1856	<i>Hirtodrosophila</i> sp4 1-2	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Hirtodrosophila</i> sp4 3-5	Pelotas, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. gilva</i> 1-2	Diamante do Norte, PR, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. levigata</i> 1-4	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. levigata</i> 5	Tuneiras do Oeste, PR, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. mendeli</i> 1-3	Santiago, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. mendeli</i> 4-5	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. morgani</i> 1-2	Diamante do Norte, PR, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. morgani</i> 3-4	São Luiz Gonzaga, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. morgani</i> 5	Colorado do Oeste, RO, Brazil	<u>Still unavailable</u>

Table 1 continued

Family	Subfamily	Species	Locarion	Accession Number*
		<i>H. subgilva</i> 1-2	Florianópolis, SC, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. subgilva</i> 3	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>H. duncani</i> (Sturtevant 1918)	-	GU597473
		<i>H. thoracis</i> (Williston 1896)	-	GU597474
		<i>H. trilineata</i> (Chung 1960)	-	EU126511
		<i>H. histrioides</i> (Okada and Kurokawa 1957)	-	AF519387
		<i>Hirtodrosophila</i> sp.		GU597472
	Steganinae Hendel 1917	<i>Acletoxenus indicus</i> (Loew 1864)	Hainan, Qionghai, China	HQ701131
		<i>Amiota setigera</i> Malloch 1924	-	EU493568
		<i>Leucophenga albofasciata</i> (Macquart 1851)	-	EU493569
		<i>L. angusta</i> Okada 1956	Hachioji, Tokyo, Japan	HQ842780
		<i>L. quadripunctata</i> (de Meijere 1908)	Hachioji, Tokyo, Japan	HQ842781
		<i>L. varia</i> (Walker 1849)	Florida, Leon Co., USA	GU597446
Tephritidae Widemann	Dacinae Drew 1989	<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedmann 1824)	-	NC_000857



### 2.3 Morphometrics analysis

Through TPSdig2 software (Rohlf 2006) eleven landmarks on wings venation representing intersections and tips of veins (Fig. 3) had their coordinates collected from 78 specimens of eight *Hirtodrosophila* species, ten landmarks were chosen according to Hatadani et al 2008 and one (n° 7) was chosen to represent the intersection between the anal and cubito anal (CuA) veins. Partial and relative warps, centroid size and weight matrix were calculated through the TPSRelw (Rohlf 2007), where the graphic representation from the shape variation in the wings was also obtained.

A canonical variate analysis (CVA) was implemented in the PAST package (Hammer and Harper 2007) with the partial warps values only for 72 specimens (Tab. 2) which have more than six specimens evaluated, in order to compare and determine if the different species present distinguished wing shapes.

Table 2. Species used in the morphometric analysis, with their respective number of specimens and origin.

Species	Location	Number of specimens
<i>Hirtodrosophila mendeli</i>	Pelotas, RS, Brazil	19
<i>Hirtodrosophila morgani</i>	São Luiz Gonzaga, RS, Brazil	9
<i>Hirtodrosophila levigata</i>	Pelotas, RS, Brazil	19
<i>Hirtodrosophila</i> sp1*	Colorado do Oeste, RO, Brazil	6
<i>Hirtodrosophila</i> sp4*	Pelotas, RS, Brazil	19

\* Specimens from type series

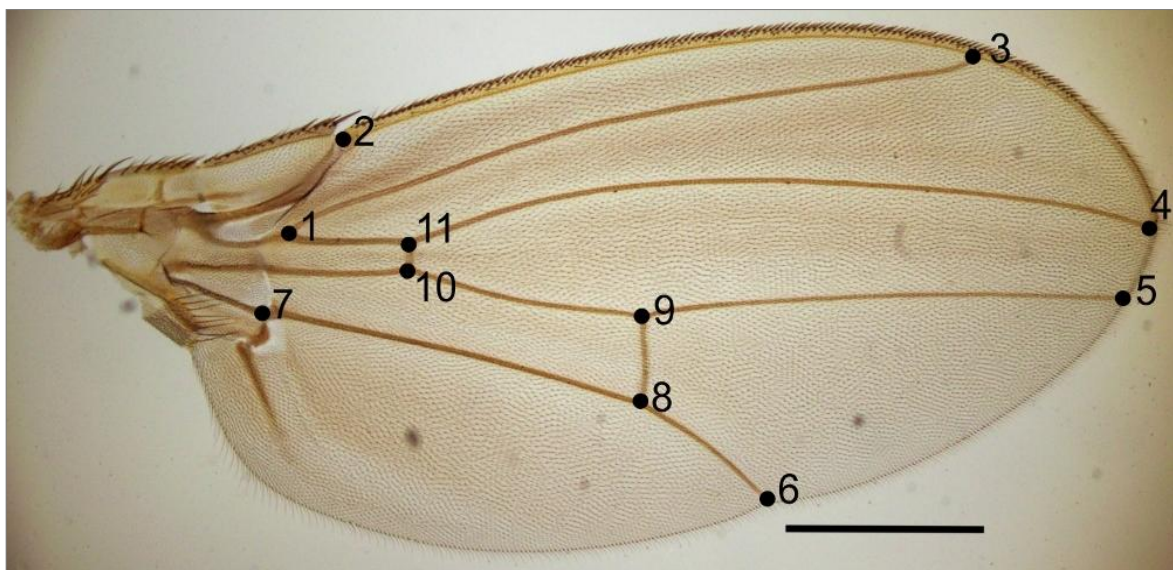


Figure 3. Wing of *Hirtodrosophila* sp4 with the landmarks used in the morphometric analysis. Bar = 0.5 mm.

### 3 Results

#### 3.1 Morphological descriptions

*Hirtodrosophila* Duda, 1923

*Hirtodrosophila hirticornis* species group Burla, 1956

*Hirtodrosophila* sp1

(Figs. 4-10)

Type material. Holotype ♂, labeled “Brasil, RO. Colorado do Oeste. Haras Poco Sul, 03°6'21.36"S, 60°34'38.06"W, João Junges col. 12.I.2012 / *Hirtodrosophila* sp1 Junges, Robe, Loreto e Gottschalk ♂ Holótipo”. Paratypes: 2 ♂ labeled: “Brasil, RO. Colorado do Oeste. Haras Poco Sul, 3°6'21.36"S, 60°34'38.06"W, João Junges col. 12.I.2012 / *Hirtodrosophila* sp1 Junges, Robe, Loreto e Gottschalk ♂ Parátipo” and 1 ♂ labeled “ Brasil. PA. Melgaço. Flona de Caxiuanã, 1° 44' 14" S, 51° 27' 25"W, Stela Machado col. 20.V.2012. *Hirtodrosophila* sp1 Junges, Robe, Loreto e Gottschalk ♂, Parátipo”. All the specimens (holotype and paratypes) had their post-abdomen dissected. The terminalia and wings are stored in slides.

Type locality: Haras Poco Sul, municipality of Colorado do Oeste, Rondonia state, Brazil (03°06'21.36"S, 60°34'38.06"W).

Diagnosis: Yellow flies, pleurae yellow without a strip below the postpronotum or the wing base. Abdominal tergites II-V with posterior marginal bands fainted brown that do not reach the lateral area. Epandrium with 15 large setae in the ventral lobes and surstyli with four peg-like prenisetae and a crescent process preceding the dorsalmost prenisetae. Aedeagus bearing a remarkable lump structure in the middle when in ventral view, and a membranous tissue on the tip.

Description:

Male

Head: Yellow. Frons and face yellowish, frontorbital plates indistinct with the same color of the frons. Frontal length= 0.18 mm (0.12-0.23 mm); frontal index= 0.75 (0.63-0.81); frontal tapering ratio= 1.09 (1.00-1.17), length ratio of orbital setae: or2/or1= 0.41 (0.30-0.50), or1/or3= 1.21 (1.11-1.28), or2/or3= 0.54 (0.37-0.66), vt index = 1.08 (0.91–1.25), ocellar triangle yellowish about 36% (27-60%) of frontal length. Facial carina not prominent with the same color of the frons. Antennae yellowish with flagelomeres slightly grey, aristae with 4-5 dorsal, one ventral and

4-5 internal branches, flagellomere I width to length ratio= 0.48 (0.43-0.53). Palpi yellowish with an apical setae and two or three smaller preapical setae. Red eyes with short pile. Gena yellowish, vibrissal index= 0.25 (0.23–0.27); cheek index= 4.96 (4.2-6.2); eye index= 1.05 (1.00-1.15).

Thorax: Main color yellowish. Length: 0.73mm (0.64-0.80mm), width: 0.56mm (0.51-0.66mm). Six irregular rows of acrostichal setulae, Transverse distance of dorsocentral setae= 323% (266-400%) of the longitudinal distance, no prescutellar setae. Scutellum yellowish. Basal scutellar setae convergent. Dc index= 0.54 (0.46-0.60); scut index= 0.59 (0.59-0.60); scut position index= 0.76 (0.63-0.91). Two prominent katepisternal setae and a row of setulae between them. Sterno index= 0.55 (0.46-0.64). Pleurae and legs yellowish.

Wings: Yellowish with tan veins. Length= 1.48mm (1.35-1.65mm). Indices: wing index= 2.06 (1.96-2.16); C= 1.47 (1.29-1.59); Ac= 3.58 (2.85-4.00); 4v= 2.09 (1.41-2.52); 5x= 2.27 (1.80-2.57); 4c= 1.38 (1.00-1.65); M= 0.66 (0.43-0.78); hb= 1.85 (1.66–2.00); prox. X= 0.45 (0.36-0.52).

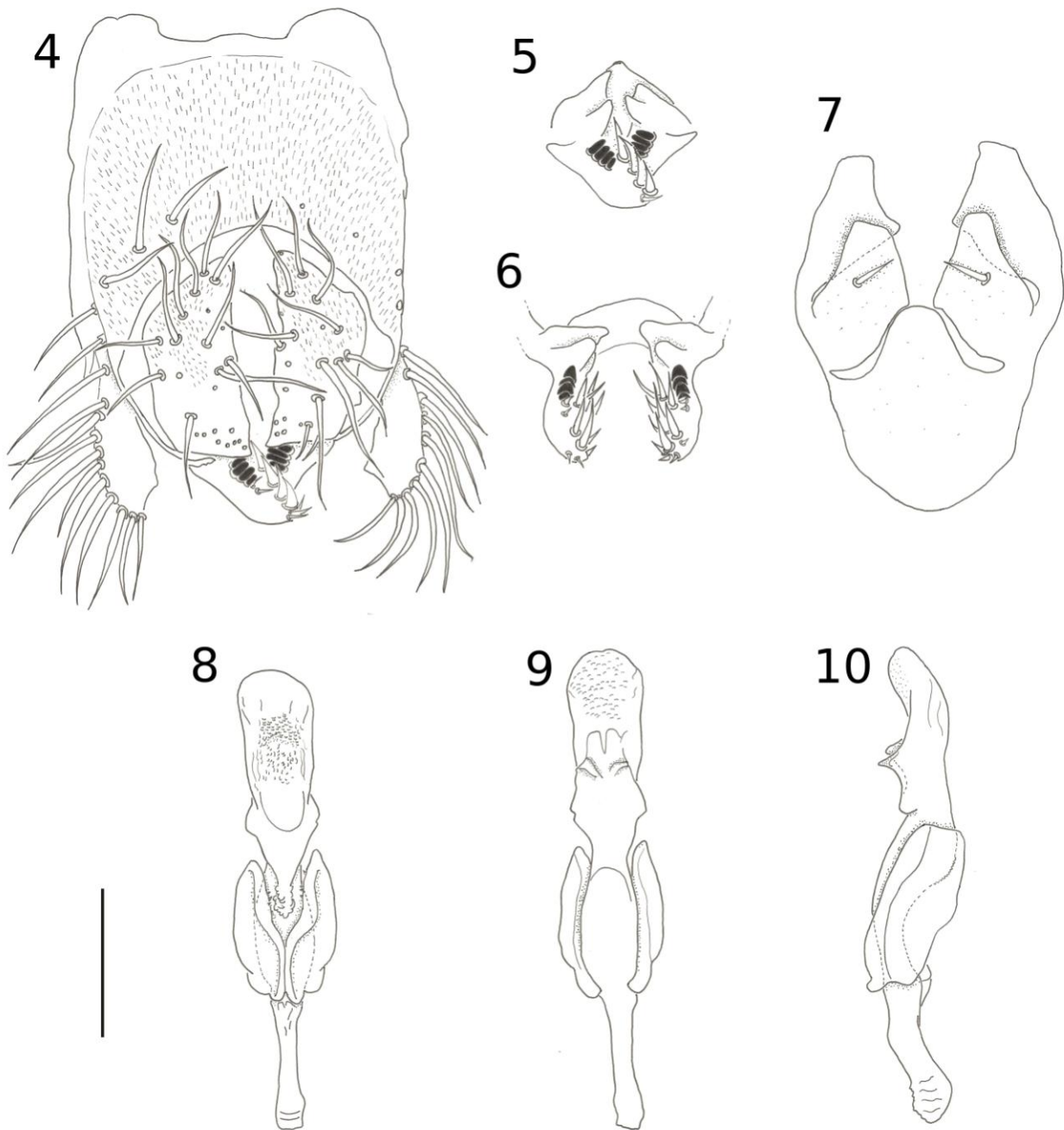
Abdomen: Main color yellowish. Tergites II-V with posterior marginal bands faded brown that do not reach the lateral area.

Body length: 1.55mm (1.35 - 1.70mm).

Terminalia (Figs. 4-10): Epandrium microtrichose with about six upper setae; ventral lobe with about 15 large setae, not covering the surstyli. Cerci microtrichose, not fused with epandrium. Surstyli not microtrichose with 4 peg-like prenisetae, two smaller setulae following the prenisetae line and about 13 inner and no outer setae. Decasternum as in Figs. 6-7 Hypandrium tapered and rounded anteriorly with a slight hypandrial process, fused with gonopods. Gonopods containing one setae, linked with paraphysis by a membranous tissue. Paraphysis with three upper and two median tiny setulae. Aedeagus with apex rounded and membranous, facing backwards; subapical region with tiny scales in the anterior and posterior views; laterally bearing small structures similar to outwards spurs in *H. subgilva*. Aedeagus with a remarkable lumpy mark in the middle of the anterior region. Aedeagal apodeme concave, fused with and shorter than aedeagus.

Female: unknown.

Geographic distribution: This species is known only to the type locality.



Figures 4-10. Male terminalia of holotype and paratype of *Hirtodrosophila* sp1. 4. Epandrium, cerci and surstyli (holotype), posterior view; 5. Surstyli and decasternum (holotype), posterior view; 6. Surstyli and decasternum (paratype), posterior view; 7. Hypandrium and gonopods (holotype), posterior view; 8-10. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses (holotype). 8. Ventral, 9. Dorsal and 10. Left lateral view. Bar = 0.1 mm.

*Hirtodrosophila* sp2  
(Figs. 11-16)

Type material: Holotype ♂ labeled “Brasil. PA. Melgaço. Flona de Caxiuanã, 1°44'14"S, 51°27'25"W, Stela Machado col. 20.V.2012. *Hirtodrosophila* sp2 Junges, Robe, Loreto e Gottschalk ♂ Holótipo”. Paratypes: 1 ♂ labeled “Brasil. PA. Melgaço. Flona de Caxiuanã, 1°44'14"S, 51°27'25"W, Stela Machado col. 20.V.2012. *Hirtodrosophila* sp2 Junges, Robe, Loreto e Gottschalk ♂, Parátipo” and 1 ♂ labeled “Brasil, RO. Colorado do Oeste. Haras Poco Sul, 3°6'21.36"S, 60°34'38.06"W, João Junges col. 12.I.2012/ *Hirtodrosophila* sp2 Junges, Robe, Loreto e Gottschalk ♂, Parátipo”. All the specimens (holotype and paratypes) had their post-abdomen dissected. The terminalia and wings are stored in slides.

Type locality: Caxiuanã National Forest, municipality of Melgaço, Pará State, Brazil (01°44'14"S, 51°27'25"W).

Diagnosis: Yellow flies, pleurae yellowish without a strip below the postpronotum and wing base. Abdominal tergites II-V with posterior marginal bands fainted brown that do not reach the lateral area. Epandrium with large setulae in the ventral lobe and surstili with 5 peg-like prensisetae and a crescent process preceding the dorsalmost prensisetae. Hypandrium with the posterior margin more squared than in *Hirtodrosophila* sp1. Aedeagus arrow-shaped with tip membranous and bearing two subapical lateral spurs, with three overlapping bends apically.

Description:

Male

Hsp2

Head: Yellow. Frons and face yellowish, frontorbital plates indistinct with the same color of the frons. Frontal length= 0.21 mm (0.19-0.23 mm); frontal index= 0.77 (0.65-0.95); frontal tapering ratio= 1.10 (1.04-1.20), length ratio of orbital setae: or2/or1= 0.42 (0.33-0.50), or1/or3= 0.95 (0.78-1.12), or2/or3= 0.45 (0.33-0.56), vt index = 1.20, ocellar triangle yellowish, about 35% (26-44%) of frontal length. Facial carina not prominent with the same color of the frons. Antennae yellowish with flagelomeres slightly grey, arista with 4-5 dorsal, one ventral and four internal branches, flagellomere I width to length ratio= 0.49 (0.47-0.53). Palpi yellowish with an apical setae and two or three smaller preapical setae. Red eyes with short pile. Gena yellowish, vibrissal index= 0.17 (0.16–0.18); cheek index= 5.82 (4.83-7.25); eye index= 1.13 (1.11-1.16).

Thorax: Yellow. Length= 0.65mm (0.60-0.68mm), width= 0.52mm (0.50-0.53mm). Six

irregular rows of acrostichals setulae, transverse distance of dorsocentral setae= 339% (285-400%) of the longitudinal distance, no prescutellar setae. Scutellum yellowish. Basal scutellar setae convergent. Dc index= 0.44; scut index= 0.53 (0.50-0.57); scut position index= 0.73 (0.70-0.80). Two prominent katepisternal setae and a row of setulae between them. Sterno index= 0.51 (0.38-0.54). Pleurae and legs yellow.

Wings: Yellowish with tan veins . Length= 1.25 mm (1.04-1.37 mm). Indices: wing index= 1.99 (1.54-2.29); C= 1.52 (1.33-1.75); Ac= 3.08 (2.66-3.60); 4v= 1.67 (1.50-1.92); 5x= 2.50 (2.00-3.00); 4c= 1.26 (1.12-1.38); M= 0.63 (0.56-0.72); hb= 2.03 (1.80–2.28); prox. X= 0.41 (0.37-0.46).

Abdomen: Main color yellowish. Tergites II-V with posterior marginal bands faded brown that do not reach the lateral area.

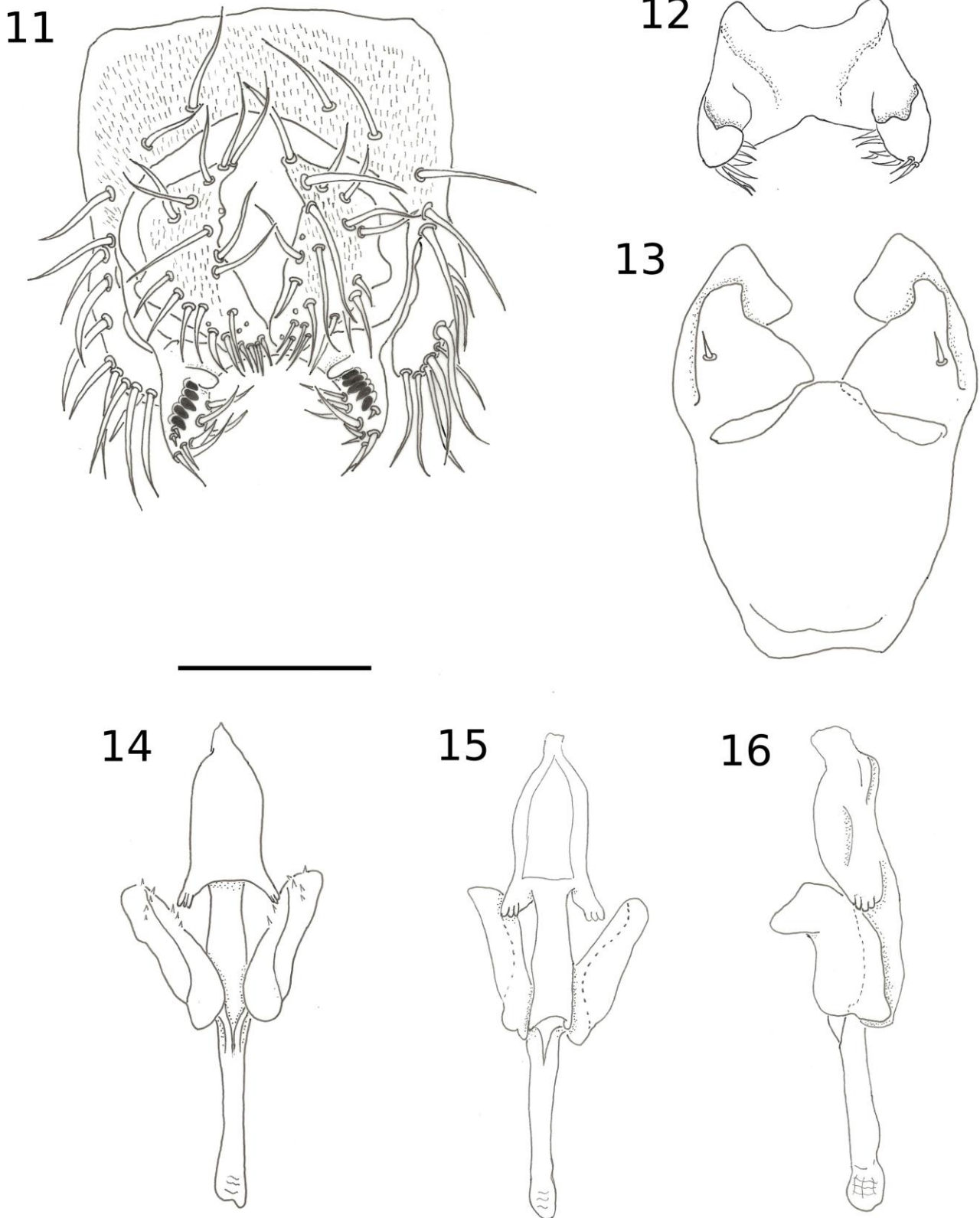
Body length: 1.38mm (1.27-1.52mm).

Terminalia (Fig. 11-16): Epandrium microtrichose, with four upper and, 14 lower setae, 11 of them located in ventral lobe. Cerci microtrichoses, not fused with epandrium. Surstyli not microtrichose with five peg-like prensisetae, two smaller setulae following the prensisetae line, about 10 inner and no outer setae. Surstyli not covered by ventral lobe of epandrium. Decasternum as in Fig. 12. Hypandrium longer than epandrium with a slight hipandrial process, gonopods fused with hypandrium and bearing one seta near the outside margin Paraphysis with five upper and three medians tiny setulae in the internal margin. Aedeagus arrowed-shape with a membranous tip, subapical region convex in lateral view. Lateral outwards spurs (as in *H. subgilva*) with three small overlapping bends (Fig. 14-15). Aedeagal apodeme fused with and shorter than aedeagus

Female: unknown.

Geographic distribution: *Hirtodrosophila* sp2 was collected in two areas from Brazilian Amazon biome: in Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço city, Pará (PA) (1°47'32.3"S; 1°26'2.5"W) and in Colorado do Oeste city, Rondônia (RO) (13°00'37.7"S; 60°35'24.9"W) (Fig. 1).

The type series includes only specimens from RO.



Figures 11-16. Male terminalia of holotype of *Hirtodrosophila* sp2. 11. Epandrium, cerci and surstyli, posterior view; 12. Surstyli and deca sternum, ventral view; 13. Hypandrium and gonopods, posterior view; 14-16. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses. 14. Ventral, 15. Dorsal and 16. Right lateral view. Bar = 0.1 mm.

*Hirtodrosophila* sp3

(Figs. 17-22)

Type material. Holotype ♂, labeled “Brasil, RO. Colorado do Oeste. Haras Poco Sul, 3°6'21.36"S, 60°34'38.06"W, João Junges col. 12.I.2012 / *Hirtodrosophila* sp3 Junges, Gottschalk, Loreto e Robe ♂ Holótipo”. Paratypes: 1 ♂ labeled “ Brasil. PA. Melgaço. Flona de Caxiuanã, 1° 44' 14"S, 51° 27' 25"W, Stela Machado col. 20.V.2012. *Hirtodrosophila* sp3 Junges, Gottschalk, Loreto e Robe ♂ Parátipo”. All the specimens (holotype and paratypes) had their post-abdomen dissected. The terminalia and wings are stored in slides

Type locality: Haras Poco Sul, municipality of Colorado do Oeste, Rondonia state, Brazil (03°06'21.36"S, 60°34'38.06"W)

Diagnosis. Yellow flies, pleurae yellowish and without a strip below the postpronotum and wing base. Abdominal tergites II-V with posterior marginal bands fainted brown that do not reach the lateral area. Epandrium with few large setae in a small square ventral lobe. Surstili bearing six peg-like prenisetae, without a crescent process above them. Aedeagus bearing tiny scales when in lateral and dorsal views. Apex of aedeagus ventrally projected.

## Description:

## Male

Head: Yellow. Frons and face yellowish, frontorbital plates indistinct with the same color of the frons. Frontal length= 0.26 mm (0.25-0.26 mm); frontal index= 1.26 (0.95-1.57); frontal tapering ratio= 1.12 (1.07-1.18), length ratio of orbital setae: or2/or1= 0.30 (0.27-0.33), or1/or3= 1.06 (1.00-1.12), or2/or3= 0.32 (0.27-0.37), vt index= 0.90 (0.80-1.00), ocellar triangle yellowish, about 25% (22-28%) of frontal length. Facial carina not prominent with the same color of the frons. Antennae yellowish with flagelomeres slightly grey, arista with 4-5 dorsal, one ventral and five internal branches, flagellomere I width to length ratio= 0.47 (0.43-0.50). Palpi yellowish with an apical setae and two or three smaller preapical setae. Red eyes with short pile. Gena yellowish, vibrissal index= 0.26 (0.25–0.27); cheek index= 4.50 (4.16-4.80); eye index= 1.02 (1.00-1.03).

Thorax: Yellow. Length= 0.63mm (0.56-0.70 mm), width= 0.46 mm (0.44-0.48 mm). Six irregular rows of acrostichals setulae, transverse distance of dorsocentral setae= 247% (244-250%) of the longitudinal distance, no prescutellar setae. Scutellum yellowish. Basal scutellar setae convergent. Dc index= 0.5 (0.45-0.55); scut index= 0.46; scut position index= 0.67 (0.63-0.70). Two prominent katapisternal setae and a row of setulae between them. Sterno index= 0.37 (0.33-



0.41). Pleurae and legs yellow.

Wings: Yellowish with tan veins. Length= 1.25 mm (1.14-1.42 mm). Indices: wing index= 2.04 (1.90-2.19); C= 1.38 (1.32-1.43); Ac= 3.92 (3.63-4.20); 4v= 1.83 (1.73-1.93); 5x= 2.58 (2.50-2.66); 4c= 1.36 (1.33-1.40); M= 0.60 (0.53-0.66); hb= 1.75 (1.60-1.90); prox. X= 0.33 (0.33 -0.33).

Abdomen: Main color yellowish. Tergites II-V with posterior marginal bands fainted brown that do not reach the lateral area.

Body length: 1.50 mm

Terminalia (Fig. 17-22). Epandrium microtrichose, with six upper and ten lower setae; four of them located in ventral lobe. Ventral lobe squared and not microtrichose, not covering the surstyli. Cerci not fused with epandrium, microtrichose. Surstyli not microtrichose, with six peg-like prenisetae, about five inner and no outer setae. Decasternum as in Fig. 18. Hypandrium longer than epandrium without a posterior hypandrial process, gonopod fused to hypandrium and bearing one setae. Paraphysis micritrichoses, with two tiny setulae. Aedeagus bearing tiny scales dorsally and laterally, apical region with a projection easier to recognize in lateral view, when in ventral view the lateral margin presents a serrated aspect.. Aedeagal apodeme fused with and longer than aedeagus.

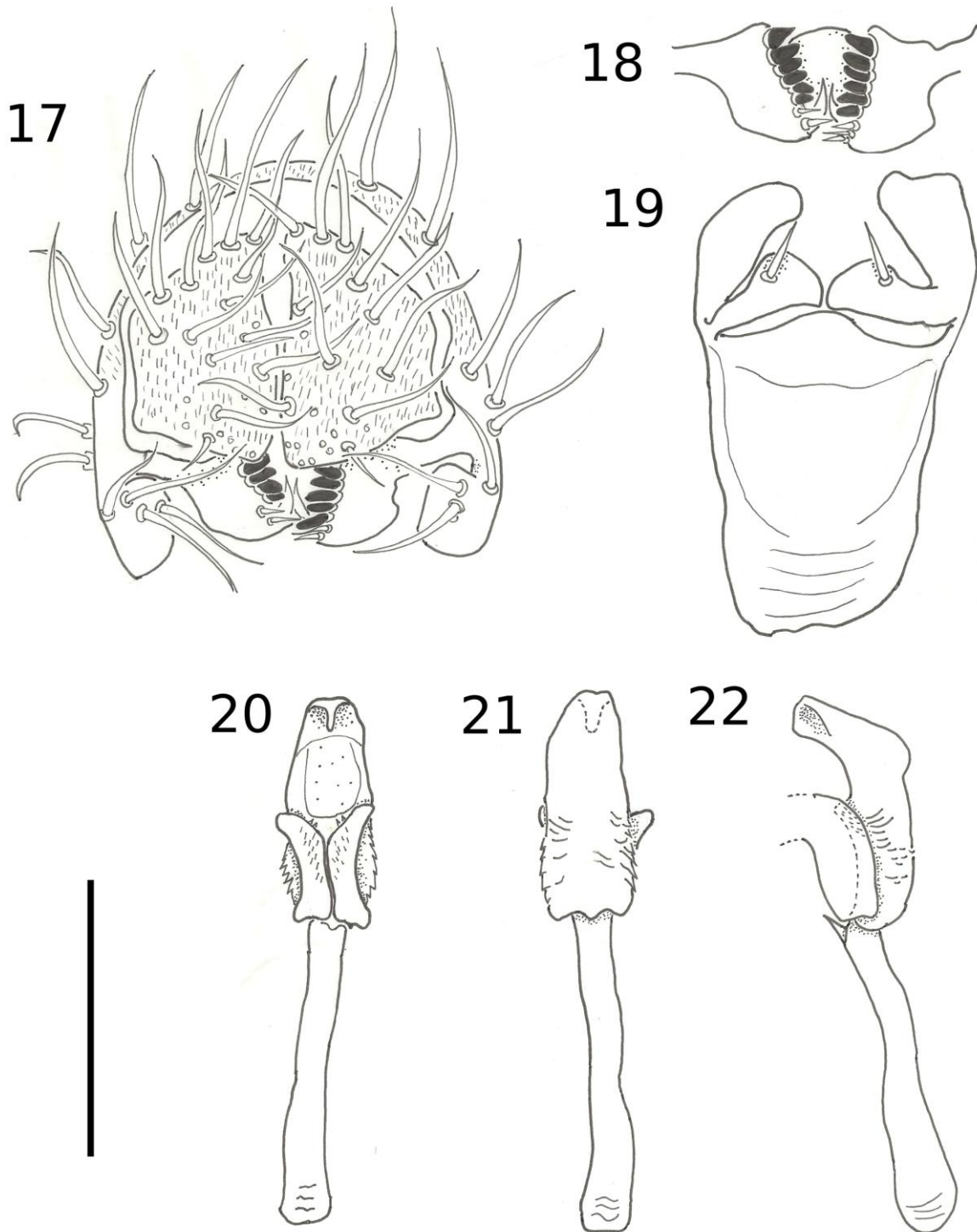
Female: unknown.

Geographic distribution: *Hirtodrosophila* sp3 was collected in the same areas as *Hirtodrosophila* sp2: Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço city, Pará (PA) (1°47'32.3"S; 1°26'2.5"W) and Colorado do Oeste city, Rondônia (RO) (13°00'37.7"S; 60°35'24.9"W) (Fig. 2).

#### *Hirtodrosophila* sp4

(Figs. 23-28)

Type material. Holotype ♂, labeled “Brasil, RS. São Luiz Gonzaga. Fragmento Florestal, 28°31'32.21"S, 54°58'58.41"W, Stela Machado col., 20.V.2012/ *Hirtodrosophila* sp4 Junges, Gottschalk, Loreto e Robe ♂ Holótipo”. Paratypes: 4♂ labeled “Brasil, RS. São Luiz Gonzaga. Fragmento Florestal, 28°31' 32.21"S, 54°58'58.41"W, Stela Machado col., 20.V.2012/ *Hirtodrosophila* sp4 Junges, Gottschalk, Loreto e Robe, ♂ Parátipo” and 1 ♂ labeled “Brasil, RS. Pelotas. Horto Botânico-UFPel, 31°46'02.05"S 52°26'55.34, Felipe B. Valer and Monica L. Blauth col., 27.V.2011/ *Hirtodrosophila* sp4 Junges, Gottschalk, Loreto e Robe ♂ Parátipo.” All the specimens (holotype and paratypes) had their post-abdomen dissected. The terminalia and wings are stored in slides



Figures 17-22. Male terminalia of holotype of *Hirtodrosophila* sp3. 17. Epandrium, cerci and surstyli, posterior view; 18. Surstyli and decasternum, ventral view; 19. Hypandrium and gonopods, posterior view; 20-22. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses. 20. Ventral, 21. Dorsal and 22. Right lateral view. Bar = 0.1 mm.

Type locality: Municipality of São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul State, Brazil (28°31' 32.21"S, 54°58'58.41"W).

Diagnosis: Yellow flies, notum dark-yellow with a grey aspect and pleura bearing a strip from below the postpronotum to below wing base. Difuse abdominal bands, although more distinct

than in the other species in the tergites II-V. Aedeagus with a rounded apex in ventral and dorsal views and flattened in lateral view, with tiny scales laterally.

Description:

Male

Head: Yellow. Frons and face yellowish, frontorbital plates indistinct with the same color of the frons. Frontal length= 0.41 mm (0.37-0.45 mm); frontal index= 0.99 (0.94-1.00); frontal tapering ratio= 1.07 (1.00-1.16), length ratio of orbital setae: or2/or1= 0.42 (0.33-0.50), or1/or3= 0.91 (0.75-1.16), or2/or3= 0.36 (0.25-0.50), vt index= 1.14 (1.00-1.25), ocellar triangle yellowish, about 29% (22-37%) of frontal length. Facial carina not prominent with the same color of the frons. Antennae yellowish with flagelomeres greyish yellow, aristae with 5 dorsal, one ventral and 4-6 internal branches, flagellomere I width to length ratio= 0.48 (0.40-0.56). Palpi greyish yellow with an apical seta and 6 smaller preapical setae. Red eyes with short pile. Gena brownish yellow with a dark diffuse band below the eye, vibrissal index= 0.24 (0.11-0.38); cheek index= 5.51 (4.40-6.57); eye index= 1.21 (1.11-1.31).

Thorax: Main color yellow, sometimes the notum presents an aspect greyish yellow. Length= 1.15 mm (1.05-1.27 mm), width= 0.90 mm (0.82-0.97 mm). Ten irregular rows of acrostichal setulae, transverse distance of dorsocentral setae= 298% (212-400%) of the longitudinal distance, no prescutellar setae. Scutellum yellowish. Basal scutellar setae convergent. Dc index= 0.67 (0.53-0.71); scut index= 0.79 (0.74-0.86); scut position index= 1.16 (0.93-1.50). Two prominent katapisternal setae and a row of setulae between them. Sterno index= 0.46 (0.33-0.54). Pleurae yellowish with a diffuse horizontal stripe extending from the below of the postpronotum to the wings base, legs yellow.

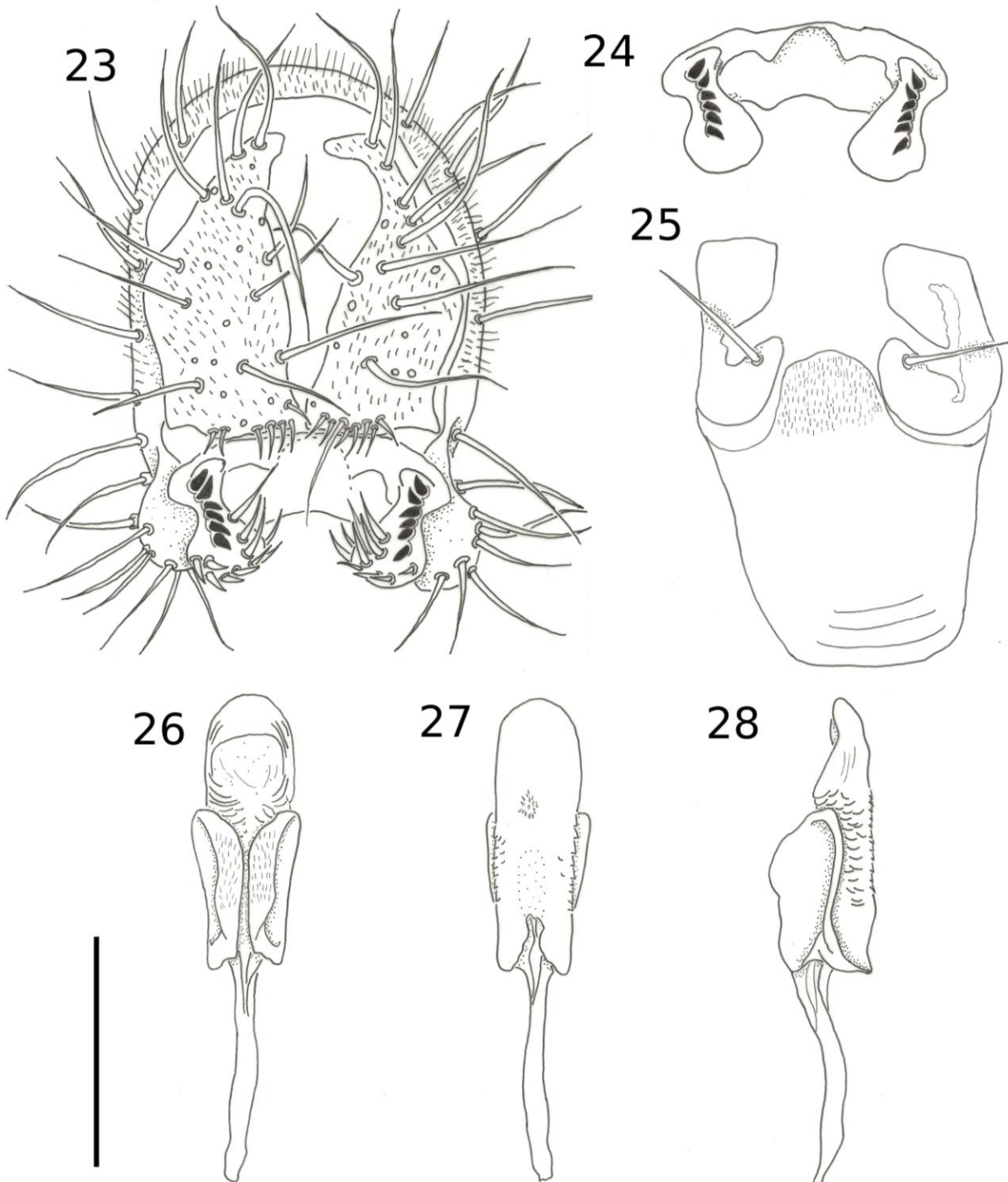
Wings: Dark yellow with veins dark yellow. Length= 2.49 mm (2.40-2.46 mm). Indices: wing index= 2.28 (2.17-2.51); C= 2.86 (2.64-3.17); Ac= 3.38 (3.14-3.83); 4v= 2.10 (1.96-2.17); 5x= 1.98 (1.76-2.13); 4c= 0.97 (0.86-1.08); M= 0.68 (0.64-0.75); hb= 1.91 (1.15-2.44); prox. X= 0.47 (0.41-0.56).

Abdomen: Main color yellow. Tergites II-V with posterior marginal bands faint brown that do not reach the lateral area..

Body length: 2.00mm (2.03-2.43mm) (This measurement was realized from the head to the tergite IV in dissected specimens).

Terminalia (Fig. 23-28): Epandrium microtrichose, with four upper and 18 lower setae; eight of them located in ventral lobe. Ventral lobe not microtrichose, not covering surstylus. Cerci not fused with epandrium. Surstyli not microtrichose with six peg-like prenisetae, about 15 inner and no outer setae. Decasternum as in Fig. 24. Hypandrium longer than wide, rectangular-shaped.

Gonopods partially fused to the hypandrium, bearing one seta. Paraphysis highly microtrichose and the tiny setulae, if they are present, were not sighted. Aedeagus with a rounded apex bearing tiny scales laterally. Apical region of aedeagus flattened in lateral view. Aedeagal apodeme fused with and shorter than aedeagus.



Figures 23-28. Male terminalia *Hirtodrosophila* sp4. Holotype ♂. 23. Epandrium, posterior view; 24. Surstylus, posterior view; 25. Hypandrium, posterior view; 26-28. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses. 26. Ventral, 27. Dorsal and 28. Right lateral view. Bar = 0.1 mm.

Female unknown.

Geographic distribution: *Hirtodrosophila* sp4 was collected in areas from the Pampa and Atlantic Forest Brazilian biomes, in the Rio Grande do Sul (RS) state, in the cities of Pelotas (31°46'02.05"S 52°26'55.34W), São Luiz Gonzaga (28°31' 32.21"S, 54°58'58.41"W), Santa Maria (29°37'95"S, 53°36'01"W) and Santiago (29°12'51"S, 54°51'27") (Fig. 2). The type series includes specimens from São Luiz Gonzaga and Pelotas.

Ecological notes: *Hirtodrosophila* species described in this study were collected flying over fructification bodies of fungi from *Auricularia* genus. *Hirtodrosophila* sp1, *Hirtodrosophila* sp2 and *Hirtodrosophila* sp3 were found flying over the same *Auricularia* fungus in two Brazilian states Rondônia and Pará, suggesting a large distribution in the Amazon biome for these two species, although we prefer to avoid more conclusions as the samples are restricted to two locations. *Hirtodrosophila* sp4 is a largely-distributed species around the transition between the Pampa and Atlantic Forest biomes, it was frequently collected in association with *H. morgani* and *H. mendeli*, flying over *Auricularia* fructification bodies, being even recorded emerging from the same genus of fungus.

### 3.1 Phylogenetic and Morphometric Analysis

#### *COI* distance and Phylogenies

On the phenetic / phylogenetic analyses we worked with 37 sequences spanning 790 base pairs. The 30 *Hirtodrosophila* sequences presented 219 variable sites, of which 192 were parsimoniously informative. In this matrix, the mean frequencies of each nucleotide was A=29.4, C=15.7, G=16.8 and T=38.2 and the mean transition/transversion ratio was 0.88. Among the four new species above described, only *Hirtodrosophila* sp4 was analyzed in the molecular approach, since we were as yet unable to obtain confident sequences for the other three new taxa.

Table 3 presents the minimum, maximum and mean values of *COI* intraspecific distances for each studied *Hirtodrosophila* species, whereas Table 4 presents the mean *COI* K2P interspecific distance between species of the *H. hirticornis* group. As can be seen, intraspecific distances range between 0.000 and 0.050 whereas the minimum interspecific distance is much higher, spanning around 10% divergence values, as in on the comparisons between *H. mendeli* and *H. subgilva* or *H. mendeli* and *H. gilva*.

The majority-rule consensus tree recovered through the BA is shown in Figure 29, together with the respective values of BA posterior probability, and the ML, MP and NJ bootstrap support presented for each clade. As we can see, all *H. hirticornis* group species are reciprocally monophyletic in regard to each other. The high support presented for the intraspecific clusterings in all the performed analyses, combined with the sharp different ranges encompassing inter and intraspecific distances for the genus suggest that *COI* may be a good marker to recognize already

described species and also to link them to the sequences in order to use as a DNA Barcoding tool.

**Table 3.** Intraspecific distances from *Hirtodrosophila* sp4 and other species of *H. hirticornis* group

Species	Intraspecific distance values		
	Minimum	Average	Maximum
<i>Hirtodrosophila</i> sp4	0.000±0.000	0.001±0.001	0.001±0.001
<i>H. gilva</i>	-	0.000±0.000	-
<i>H. levigata</i>	0.000±0.000	0.007±0.003	0.013±0.004
<i>H. mendeli</i>	0.000±0.000	0.004±0.002	0.008±0.003
<i>H. morgani</i>	0.000±0.000	0.019±0.004	0.032±0.004
<i>H. subgilva</i>	0.007±0.003	0.034±0.006	0.050±0.008

It is interesting to note the clustering of *Hirtodrosophila* sp4 with *H. duncani*, *H. histrioides* and *H. morgani*, which agrees with the above pointed male terminalia similarities, despite its low support value (PP = 0.64) . Other two species with similar terminalia patterns, *H. gilva* and *H. mendeli*, were also grouped in the same clade, but now with a higher support value (PP = 0.91).

**Table 4.** Mean of COI K2P interspecific distance between species of the *H. hirticornis* group

Species	Interspecific distance values		
	Minimum	Average	Maximum
<i>H. sp4</i> X <i>H. gilva</i>	0.144±0.015	0.145±0.015	0.150±0.014
<i>H. sp4</i> X <i>H. mendeli</i>	0.134±0.013	0.137±0.013	0.143±0.014
<i>H. sp4</i> X <i>H. morgani</i>	0.126±0.013	0.131±0.014	0.134±0.014
<i>H. sp4</i> X <i>H. subgilva</i>	0.130±0.013	0.132±0.014	0.133±0.014
<i>H. gilva</i> X <i>H. mendeli</i>	0.101±0.013	0.107±0.013	0.116±0.013
<i>H. gilva</i> X <i>H. morgani</i>	0.128±0.016	0.133±0.016	0.141±0.016
<i>H. gilva</i> X <i>H. subgilva</i>	0.118±0.014	0.121±0.013	0.123±0.013
<i>H. mendeli</i> X <i>H. morgani</i>	0.125±0.014	0.133±0.015	0.145±0.015
<i>H. mendeli</i> X <i>H. subgilva</i>	0.099±0.011	0.101±0.011	0.106±0.011
<i>H. morgani</i> X <i>H. subgilva</i>	0.137±0.014	0.140±0.015	0.145±0.015

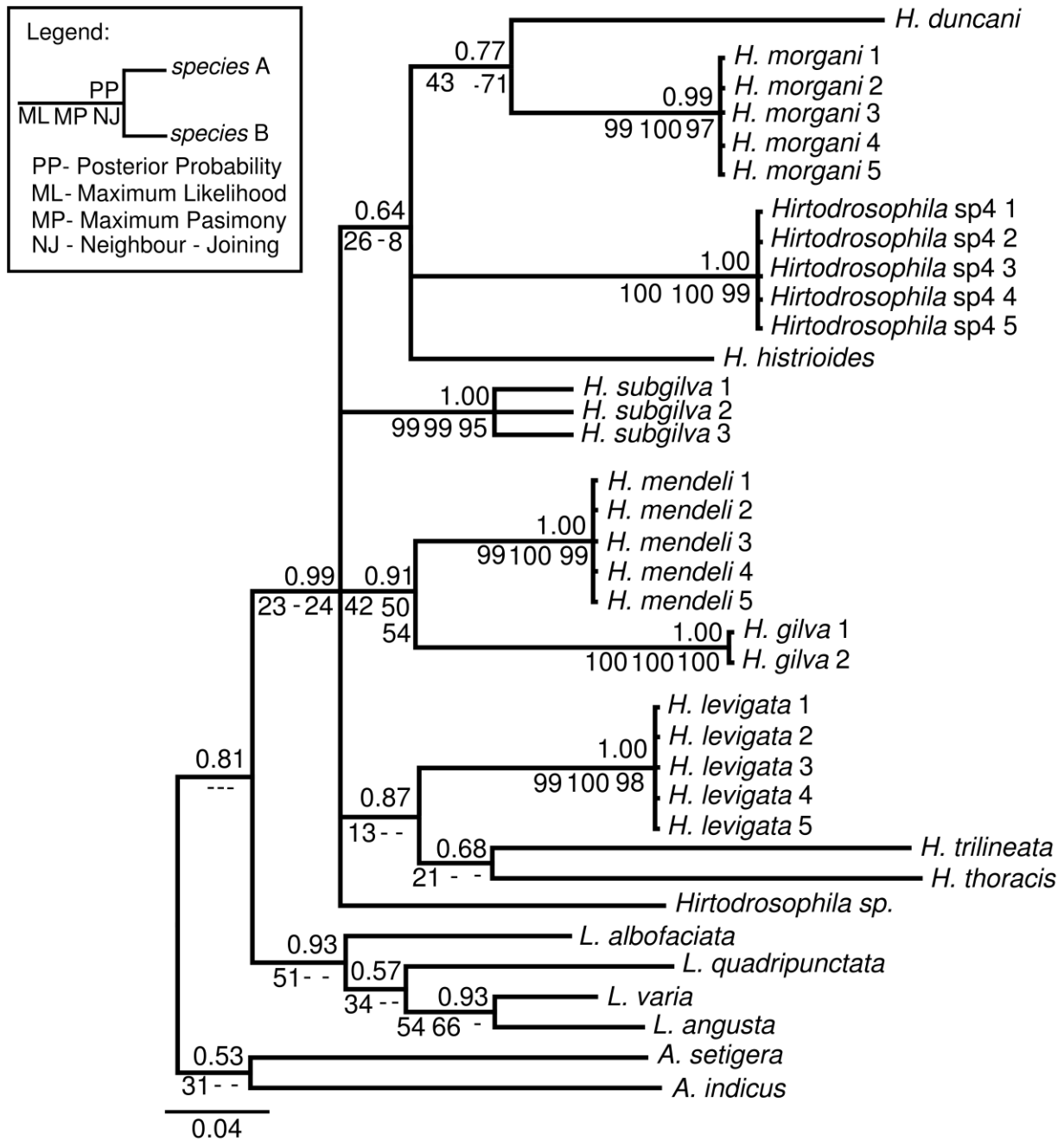


Figure 29. Majority-rule consensus Bayesian tree recovered for 30 *Hirtodrosophila* COI sequences, rooted with *Ceratitis capitata* (not shown) plus other three Steganinae genera. Values above the branches are the posterior probability of each clade, whereas those values below the branches denote their bootstrap support as recovered through the ML, MP and NJ analyses, respectively.

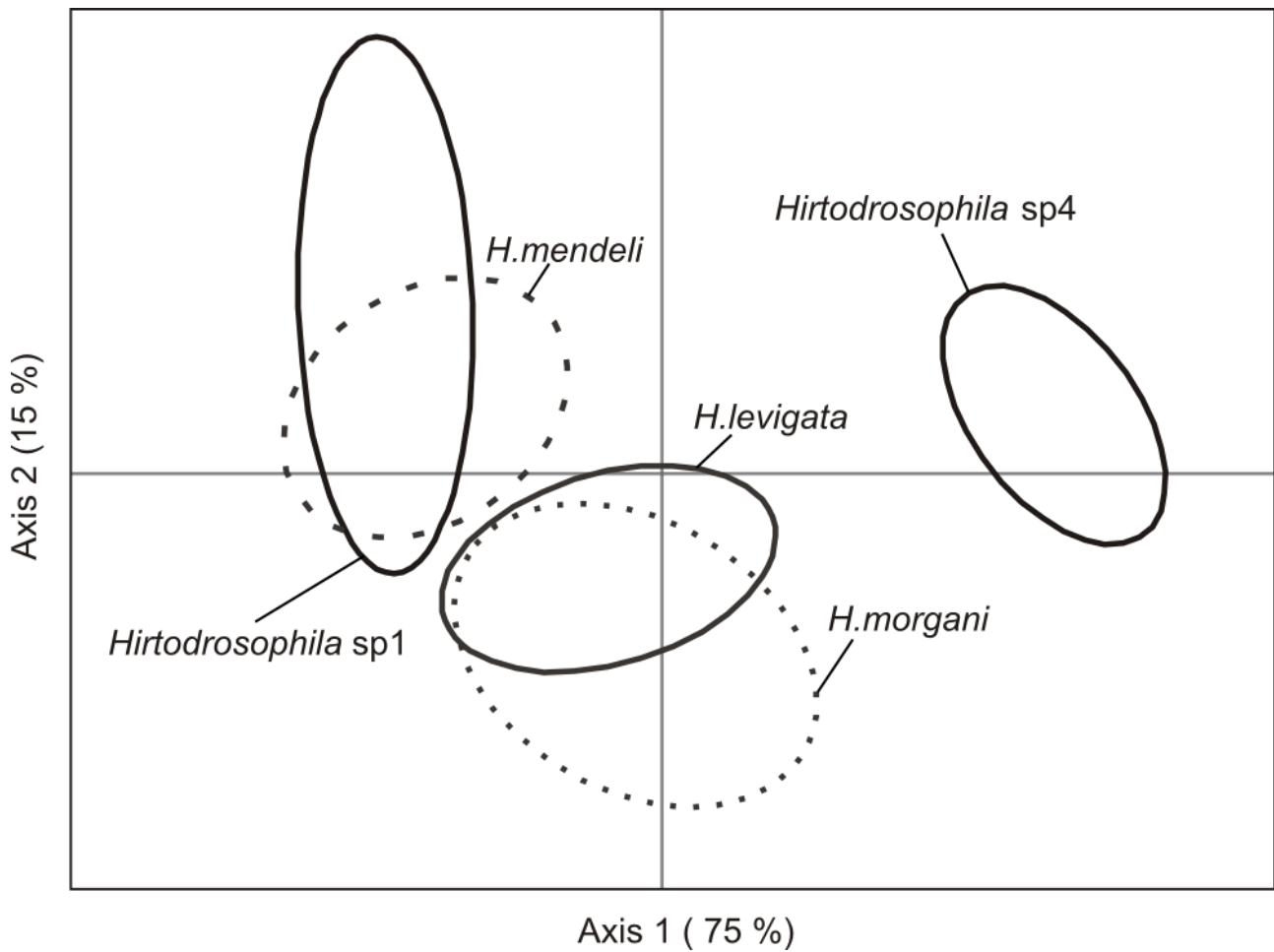


Figure 30. Canonical variate analysis plot from wings relative warps in five *Hirtodrosophila* species, with 95% confidence ellipses.

#### Wings morphometry

A covariate analysis for the partial warps of wings morphometry was performed for five *Hirtodrosophila* species (Table 2): two of the new species described above (*Hirtodrosophila sp1*, and *Hirtodrosophila sp4*), *H. levigata*, *H. mendeli* and *H. morgani*. The new species *Hirtodrosophila sp2* and *Hirtodrosophila sp3* were excluded because they are represented for a few number of especimens. The results of this analysis (Fig. 30), revealed a wide overlap of wing shape between some species, as observed for *Hirtodrosophila sp1* and *H. mendeli* or for *H. levigata* and *H. morgani*. A peculiar exception to this pattern was encountered for *Hirtodrosophila sp4*, which formed a separated group even with the construction of the 95% confidence ellipses (Fig. 30), showing that this species can be differentiated from the other by the wing shape, at least as compared with the other analyzed Neotropical *Hirtodrosophila* species.



## 4 Discussion

### 4.1 Descriptions

Neotropical species of the *H. hirticornis* group are very different in terms of male terminalia in regard to the other species of the group, so that Vilela and Bächli (2004) stated they could be inserted in a new subgroup or even in a new species group. The Neotropical species of this group encompass yellow flies bearing marginal bands in tergites II-V and an arrow-shaped aedeagus, as found in *H. gilva*, *H. subgilva* and *H. mendeli*, or an aedeagus tubular with tiny scales, as found in *H. morgani*. Differences in external morphology are difficult to diagnose and the male terminalia is still the best feature for recognizing these species.

The new species, *Hirtodrosophila* sp1, *Hirtodrosophila* sp2, *Hirtodrosophila* sp3 and *Hirtodrosophila* sp4, are inserted in the *H. hirticornis* species group (1) due to their external body morphology (yellow flies bearing bands in the margin of the tergites II-V), (2) due to similarities concerning wing shape (as evidenced in the morphometric analysis), and (3) due to some features in the male terminalia (as the arrow-shaped aedeagus in *Hirtodrosophila* sp1 and *Hirtodrosophila* sp2 or the tubular aedeagus with tiny scales in *Hirtodrosophila* sp3 and *Hirtodrosophila* sp4. Other characteristic shared among this species group is the crescent process in the surstylus, which is encountered in *H. mendeli*, *H. gilva*, *H. morgani*, *Hirtodrosophila* sp1, *Hirtodrosophila* sp2, and *Hirtodrosophila* sp4 with the exception of *H. subgilva* and *Hirtodrosophila* sp3. A stripe extending from below the postpronotum to below the wings base is, otherwise, a characteristic shared among the already described Neotropical *H. hirticornis* flies and *Hirtodrosophila* sp3, all of which were collected in the Atlantic Forest and Pampa biomes. Nevertheless, the new species *Hirtodrosophila* sp1, *Hirtodrosophila* sp2 and *Hirtodrosophila* sp3, which were assembled in Amazon biome, have pleura devoid of this trait.

The other ungrouped species, *H. gavea* and *H. minuscula*, are similar to *H. gilva* in terms of external morphology (Vilela and Bächli 2005), however they have a set of differences from the new species regarding their male terminalia. *Hirtodrosophila gavea* has a tubular aedeagus superficially similar to *Hirtodrosophila* sp3 and *Hirtodrosophila* sp4 as concerns the shape and the presence of tiny scales, but differing from these two new species in having a flattened aedeagus tip, contrasted to the rounded tip encountered in *Hirtodrosophila* sp4 and the frontally projected tip in *Hirtodrosophila* sp3. Moreover, both *H. gavea* and *H. minuscula* differ from the four new species by their huge ventralmost peg-like prensisetae in the surstylus, while the new species present equal length prensisetae.

## 4.2 Phylogenetic and Morphometric Analysis

It was not possible to use all the species in both molecular and morphometric analyses. Nevertheless, based on comparison among the morphological aspects of the male terminalia, which is a recognized methodology to differentiate and identify species and groups in Drosophilidae (Hsu 1949, Vilela and Bächli 1990, Franco et al. 2006, Döge et al. 2011, Yassin 2013), it is possible to suggest a subdivision of the Neotropical *H. hirticornis* species in two subgroups: one with arrow-shaped aedeagus and other with the tubular aedeagus bearing tiny scales.

*H. mendeli* and *Hirtodrosophila* sp1, two representatives of the arrow-shaped subgroup, remained associated in the wing morphometric analysis. Moreover, these species were also distinguished in this analysis from *H. morgani* and *Hirtodrosophila* sp4, although these two species did not present overlapping wing morphometry patterns. In fact, *H. morgani* was allocated more close to *H. levigata*, a fly from the *H. glabrifrons* species group, whereas *Hirtodrosophila* sp4 formed an independent ellipse. So, despite our low sample size and the eventual overlap in wing shape, this trait seems to be a good tool to differentiate these cryptic *Hirtodrosophila* species, which is in agreement with other studies (Bubliy et al. 2007, Irati et al. 2010).

Distance analysis showed a gap between inter and intraspecific *COI* differentiation, which supports the already described species as well as one of the new species, *Hirtodrosophila* sp4. This species is very similar to *H. morgani* regarding its tubular aedeagus morphology. Even so, it was recovered as a monophyletic species, which was separated from its siblings with support values higher than 99 in bootstrap tests and than 0.99 for the posterior probability, which is considered a strong support in other molecular and morphologic descriptions and in phylogenetic studies (Földvári et al. 2007, Cabezas et al 2008, Robe et al. 2010, Yassin 2013). Moreover, the two sibling Neotropical species, *Hirtodrosophila* sp4 and *H. morgani* differed by a minimum of 12.6% *COI* K2P distance, which suggests their status of independent species. The use of the threshold of 3% for distinguishing intra and interspecific comparisons proposed by Hebert et al. (2003) leave us, nevertheless, with two putatively new species, one cryptic to *H. morgani* and the other cryptic to *H. subgilva*, two questions that deserve further evaluations.

Differences in color patterns in Drosophilidae can be explained by several ecological and genetic factors, as shown by Wittkopp et al. (2003) and Brisson et al. (2006). So, it is usually difficult to correctly ascertain a cause. As mentioned above, the as yet known Atlantic Forest *Hirtodrosophila* species present a stripe extending from below the postpronotum to below the wings base, a pattern not encountered in the Amazonian species. Ascertain a geographical or ecological explanation for these differences remains, nevertheless, essentially elusive. All these species have quite similar biological properties, being mycophagous flies closely associated with *Auricularia* fungal species (Vilela and Bächli 2004, Gottschalk et al. 2009). Thus, only the

achievement of new ecological/genetic studies specifically designed to study this question can help to understand this intriguing property of the group.

In general, morphological, morphometric and molecular approaches were employed here in order to give more complete information about the taxonomic status of the Neotropical *Hirtodrosophila* species. This integrative approach is by far more informative than a simple morphological description or an isolated molecular analysis, and this focus is in agreement with recent discussions regarding the use of integrated methodologies for taxonomy (Goldenstein and DeSalle 2010, Page and Hughes 2011, Yassin 2013). Here, the integrative approach not only supported the independent taxonomic status of the four described new species as for some already described *Hirtodrosophila*. These results can be in the future used to recognizing *Hirtodrosophila* species in other studies and also to begin identify females and immature stages, which will certainly enhance new studies for the group.

## 5 Acknowledgments

We are grateful to Paulo Lima dos Santos for the assistance in the collections, to Ronaldo Golombiesky for the sequencing reactions, to Francine Cenzi de Ré, Pedro Mesquita Fonseca and Stela Machado for helping with collections and DNA manipulation procedures, to Felipe Berti Valer and Monica Laner Blatuh to kindly provide some specimens of *Hirtodrosophila* sp4 for the descriptions and morphometric analysis, to Eduardo Bernardi for the fungi identifications and to the Brazilian Funding Agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

## 6 References

- Bächli G, Vilela CR, Escher SA, Saura A. 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. **Fauna Entomologica Scandinavica**. v. 39, p. 1-362.
- Bächli, G. 2013. **TaxoDros: The database on Taxonomy of Drosophilidae**. Version 2010/12. Electronic Database accessible at <http://www.taxodros.unizh.ch>. Captured on February 2013.
- Brisson JA, Wilder J, Hollocher H.. Phylogenetic Analysis of the cardini Group of *Drosophila* with Respect to Changes in Pigmentation. **Evolution**. v. 60, p. 1228 - 1241.
- Bubliy OA, Tcheslavskaja KS, Kulikov AM, Lazebny OE, Mitrofanov VG. 2007. Variation of wing shape in the *Drosophila virilis* species group (Diptera:Drosophilidae) **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. v.46, p. 38–47.
- Burla H. 1956 Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur

- Drosophilauntergattung *Hirtodrosophila*. **Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin**. v. 32, p. 189-321..
- Cabezas P, MacPherson E, Machordom A. 2009. Morphological and molecular description of new species of squat lobster (Crustacea: Decapoda: Galatheididae) from the Solomon and Fiji Islands (South-West Pacific). **Zoological Journal of the Linnean Society**. v.156, p. 465 – 493.
- Döge JS, Gottschalk MS, Valente VLS. 2011. Two new Neotropical species of *Drosophila peruensis* species group (Diptera, Drosophilidae) **Iheringia, Série Zoologia**, v.101, p. 310-316.
- Duda O. 1923. Die orientalischen und australischen Drosophiliden-Arten (Dipteren) des Ungarischen National-Museums zu Budapest. **Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici**. v.20, p. 24-59.
- Duda O. 1924. Beitrag zur Systematik der Drosophiliden unter besonderer Berücksichtigung der Paliarktischen U. Orientalischen Arten (Dipteren). **Archiv Naturgeschichte**. v.90, p. 172-259.
- Földvári M, Pomiankowski A, Cotton S, Carr M. 2007. A morphological and molecular description of a new *Teleopsis* species (Diptera: Diopsidae) from Thailand. **Zootaxa**. v.1620, p. 37 - 51.
- Fontaine B, Perrard A, Bouchet P. 2012. 21 years of shelf life between discovery and description of new species. **Current Biology**. v. 22, p.943-944.
- Franco FF, Prado RF, Sene FM, Costa LF, Manfrin MH. 2006. 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, p. 203-212.
- Goldstein PZ and DeSalle R. 2010 Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **Bioessays**. v.33, p. 135–147.
- Gottschalk MS, Bizzo LEM, Döge JS, Profes MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2009. Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. **Iheringia. Série Zoologia**. v. 99, p. 442-448.
- Grimaldi D. 1990. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.197, p. 1-139.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**. v. 52, p. 696–704.
- Hammer Øy., Harper, DAT. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, version 2.17b. **Paleontologia Electronica**, v. 4, p. 9. (<http://folk.uio.no/ohammer/past>).

- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceeding of the Royal Society of London B**. v. 270, p. 313-321.
- Hsu TC. 1949. The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to systematics. **University of Texas Publications**. v.4920, p. 80-142.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**. v. 17, p. 754-755.
- Irati M, Baylac M, Iriondo M, Manzano C, Garnery L, Estonba A. 2011. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. **Apidologie**. v.42, p. 150–161.
- Nylander JAA. 2004. **MrModeltest v2. Program distributed by the author**. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Robe LJ, Valente VLS, Loreto ELS. 2010. Phylogenetic relationships and macroevolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**. v. 138, p. 725-735.
- Rohlf FJ. 2006. **tpsDig2, digitize landmarks and outlines**, version 2.10. Dept Ecology & Evolution, St. Univ. New York, Stony Brook, New York.
- Rohlf FJ. 2007. **tpsRelw, relative warps analysis**, version 5/13/05. Dept Ecology & Evolution, St. Univ. New York, Stony Brook, New York.
- Sadeghi S, Adriaens D, Dumont HJ. 2009. Geometric Morphometric analysis of wing shape variation in ten European populations of *Calopteryx Splendens* (HARRIS, 1782) (Zygoptera, Odonata). **Odonatologica**. v.38. p. 343-360.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 87, p. 651-701.
- Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology** v. 5, p. 233 – 241.
- Sturtevant AH. 1921. The North American species of *Drosophila*. **Carnegie Institute of Washington Publication**. v. 301, p. 1-150.
- Swofford DL. 2003. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region

of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p.1596-1599.

van der Linde K, Houle D, Spicer GS. 2010. A supermatrix-based molecular phylogne of the family Drosophilidae. **Genetic Research**. v. 92, p. 25-38.

Vilela, C. R. and Bächli, G. 1990. Taxonomic studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft**, v. 63, p. 1-332.

Vilela CR, Bächli G. 2004. On the identities of nine Neotropical species of Hirtodrosophila (Diptera, Drosophilidae). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**. v. 77, p. 161-195.

Vilela, C. R.; Bächli, G. 2005. Three new species of Neotropical Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 78, p. 143-163, 2005.

Yassin A. 2013. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology** (2013)

Wittkopp PJ, Carroll SB, Kopp A. 2003. Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. **Trends in Genetics**. v. 19, p. 405-504.

## CAPÍTULO 3 – ARTIGO II

### **Two new Neotropical species of *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae) proposed by molecular and morphological approaches**

João Junges<sup>1</sup>, Marco Silva Gottschalk<sup>2</sup>, Elgion Lucio da Silva Loreto<sup>1</sup>, and Lizandra  
Jaqueline Robe<sup>13</sup>

1 - Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

2 - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

3 - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC),  
Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande,  
RS, Brasil.

## Abstract

There are about 130 species of *Mycodrosophila* Oldenberg 1914 around the world, however only nine species were so far recorded for American countries: three in the Nearctical and six from Neotropical region. This small number of known species is probably an artifact related to methodological sampling bias, which favors the frugivorous drosophilid, and the absence of studies with this genus in the last 50 years in the Neotropics. However we have found two common species from *Mycodrosophila* in Amazonian and Pampa biomes which are similar to *M. projectans* and *M. neoprojectans*. We compared molecular sequences, external morphology characteristics and the male terminalia from these species and based on the differences among the intra and interspecific molecular distances, phylogenetic and phenetic analyses and differences on the male terminalia we proposed them as two new species of Neotropical *Mycodrosophila*.

**Key words:** Amazonian Forest, Atlantic Forest, Cytochrome oxidase subunit I, DNA-Barcoding, Male terminalia, Mycophagous drosophilid.



## 1 Introduction

*Mycodrosophila* Odenberg 1914 is usually known for its records associated with fungi fructification bodies related mainly to *Polyporus* Micheli ex Adans 1763 (Wheeler and Takada 1963, Bock 1980). This genus belongs, along with *Hirtodrosophila* Duda 1923, *Paramycodrosophila* Duda 1924, *Paraliodrosophila* Duda 1925 and *Zygothrica* Wiedemann 1830, to the *Zygothrica* genus group (Grimaldi 1990), whose species are mainly associated with mycophagous habits.

There are almost 130 described *Mycodrosophila* species (Bächli 2013) and the genus is known for its world-wide distribution, although most of its species occur in Africa, Japan and Australia (Burla 1954, Okada 1956, 1965, 1968, Bock 1980). Six species are recorded for the Neotropical region, mostly to Central America and Brazil, and all of them were described or redescribed in Wheeler and Takada (1963). In that study we can also access the illustrations from *Mycodrosophila projectans* Sturtevant 1916, *M. dimidiata* Loew 1962 and the descriptions for two Nearctical species, *M. stalkerii* Wheeler and Takada 1963 and *M. claytonae* Wheeler and Takada 1963.

In fact, Wheeler and Takada's (1963) study can be considered the most important work for recognizing American species of *Mycodrosophila* because it characterizes all species already reported for this continent (Grimaldi 2010) however that study was developed 50 years ago and there has been no other study encompassing the systematics or taxonomy of this genus in the Neotropical region. This delay associated with the fruit bait bias in the drosophilid sampling can be responsible for the scarce knowledge in the *Mycodrosophila* fauna from Neotropics.

In spite of this, we have collected two species, putatively common to the Brazilian Amazon and Pampa biomes, which could not be correctly matched to any species in the key presented by Wheeler and Takada (1963). We compared molecular sequences for the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene and re-evaluated the morphological features among these and the other so far described American *Mycodrosophila* and confirmed that these individuals actually encompass two new species. Below we describe these two new species using external morphology and male terminalia illustrations. Moreover, we also provide an update of Wheeler and Takada's (1963) key, and a molecular DNA-Barcoding like analysis for some sampled Neotropical *Mycodrosophila*.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Collections and Descriptions

*Mycodrosophila* flies were collected flying over fungi fructification bodies (Fig. 1), using a modified manual aspirator. Four and tree individuals of each new species were used for the descriptions, which were performed according to the methodology proposed by Bächli et al. (2004). The post-abdomen of all the specimens was dissected and the obtained male terminalias were allocated in slides with Canada balsam for illustrations, which were performed using a *camara lucida* attached to an optical microscope (Olympus BX40) with a 40x objective lens and a 10x ocular lens.



Figure 1. Flies resting over body fructification fungi of the genus *Mycena* (Pers.) Roussel 1806 (Agaricales, Mycenaceae)

The fungi, whenever was possible, were photographed and sent to an expert to the correct identification. The location from the type series and other recorded points for the new species are presented in the figure 2 and the type series for both new *Mycodrosophila* species here described will be deposited in Museu de Ciências Naturais of the Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCNZ, Porto Alegre, Brazil).

## 2.2 DNA manipulation and analyses

DNA samples were obtained from a total of 14 *Mycodrosophila* specimens encompassing four species, two already described, *M. projectans* and *M. elegans*, and two new species, *Mycodrosophila* sp1, *Mycodrosophila* sp2 (Table 1). The identity of these flies were evaluated by external morphology and, whenever possible, by the male terminalia features, according mainly to Wheeler and Takada (1963).

The total DNA was extracted using NucleoSpin Tissue XS kit (MACHEREY-NAGEL) and the PCR reaction was performed using the TYJ1460 and C1N2329 primers described by Simon et al. (1994), for the amplification of approximately 900 bp from the Cytochrome Oxidase subunit I (COI) mitochondrial gene. PCR products were purified using a solution of PEG 13% (Polyethylene glycol) and NaCl 1,6M and then directly sequenced in a MegaBace 500 automatic sequencer, using a DYEnamic ET® Sequencing Kit (Amersham) according to the manufacturer's protocol. Both, forward and reverse sequences were determined, so that each base was read at least twice. These were later assembled, visualized and corrected in the GAP 4 program from the Staden Package (Staden 1996), and aligned with the Clustal W algorithm as implemented in MEGA 5.0 (Tamura et al 2011). Table 1 presents GenBank access numbers for the 14 new plus two downloaded COI *Mycodrosophila* sequences (those from the Nearctic *M. dimidiata* and *M. claytonae*). Additionally, COI sequences were also downloaded for different species of *Acletoxenus*, *Amiota*, *Leucophenga* and *Ceratitis* (Table 1), which were used as outgroups, since they belong to a different Drosophilidae subfamily or even to a different Diptera family.

The phylogenetic analyses were performed using different softwares and methods: Bayesian analysis (BA), as performed in Mr Bayes 3.2.1 (Ronquist et al. 2012); maximum likelihood (ML) analysis, as implemented in PhyML 3.0 (Guindon and Gascuel 2003); maximum parsimony (MP) analyses as executed in Paup 4.0b10 (Swofford 2003); and a Neighbor-Joining (NJ) tree was constructed in the Mega 5.0. BA analysis was performed using 1,000,000 generations of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) search, with the GTR+G+I model adopted following the AIC evaluation criterion, as implemented in MrMODELTEST 2.3 (Nylander 2004), with tree sampling every 100 generations and discarding 25% of the initial results as burn-in. ML analysis was carried out with the GTR+G+I model selected by the AIC criteria in MODELTEST 3.7 (Posada and Crandall 1998), using an optimized NJ starting tree. MP trees were inferred by heuristic search with Tree Bisection and Reconnection branch swapping optimization applied to a group of 100 random stepwise addition starting trees. The NJ method was carried out according to Tamura-Nei substitution distance model (Tamura and Nei 1993) (the most similar to GTR among Mega 5.0 options available for NJ searches) with a Gamma correction, whose alpha value was set to 0.17, following MODELTEST results. The clades support was inferred through a bootstrap test with

1,000 replications for ML, MP and NJ analyses, while BA, the posterior probability (PP) for the clades was calculated. Moreover, intra and interspecific COI distances related to the proposed new species were evaluated according to the Kimura 2-Parameters (K2P) evolutionary model (Kimura, 1980), with standard error evaluated through 1,000 bootstrap replicates.

A morphological phylogenetic analysis with 14 categorical and continuous characters (Table 2) was performed based on the data obtained in Wheeler and Takada (1963), Sturtevant (1916) and the descriptions for *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 presented below.

Table 1. Taxonomic position, geographical source and COI gene sequences GenBank Accession numbers for *Mycodrosophila* species and outgroups

Family	Subfamily	Species	Origin	Accession Number*
Drosophilidae Rondani 1856	Drosophilinae Rondani 1856	<i>Mycodrosophila</i> sp1 1	Colorado do Oeste, RO, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Mycodrosophila</i> sp1 2	Melgaço, PA, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Mycodrosophila</i> sp2 1	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Mycodrosophila</i> sp2 2	Rio Grande, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Mycodrosophila</i> sp2 3	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Mycodrosophila</i> sp2 4	Rio Grande, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>Mycodrosophila</i> sp2 5	Rio Grande, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>M. elegans</i> 1 (Wheeler and Takada 1963)	Diamante do Norte, PR, Brazil	<u>JX497750</u>
		<i>M. elegans</i> 2 (Wheeler and Takada 1963)	Teodoro Sampaio, SP, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>M. projectans</i> 1 (Wheeler and Takada 1963)	Santa Maria, RS, Brazil	<u>JX497751</u>
		<i>M. projectans</i> 2 (Wheeler and Takada 1963)	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>M. projectans</i> 3 (Wheeler and Takada 1963)	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
		<i>M. projectans</i> 4 (Wheeler and Takada 1963)	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>
	<i>M. projectans</i> 5 (Wheeler and Takada 1963)	Santa Maria, RS, Brazil	<u>Still unavailable</u>	
	Steganinae Hendel 1917	<i>Acletoxenus indicus</i> (Loew 1864)	Hainan, Qionghai, China	HQ701131
		<i>Amiota setigera</i> Malloch 1924	-	EU493568
		<i>Leucophenga albfasciata</i> (Macquart 1851)	-	EU493569
		<i>L. angusta</i> Okada 1956	Hachioji, Tokyo, Japan	HQ842780

Table 1 continued

<b>Family</b>	<b>Subfamily</b>	<b>Species</b>	<b>Location</b>	<b>Accession Number*</b>
		<i>L. quadripunctata</i> (de Meijere 1908)	Hachioji, Tokyo, Japan	HQ842781
		<i>L. varia</i> (Walker 1849)	Florida, Leon Co., USA	GU597446
Tephritidae Widemann	Dacinae Drew 1989	<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedmann 1824)	-	NC_000857

Note: \*New sequences obtained in this study are underlined.

Only the species average for each measure was used, since these were the only data available in the literature. Additionally, continuous characters were first categorized in an ascending order and latter weighted in inverse proportion to their minimum number of steps, using a scaled MP search, as performed in PAUP 4.0b10. Given the difficulties in establishing homologies for these characters in regard to other species, the Nearctic species were used as outgroup, which seemed justifiable given our molecular results (see below).

Table 2. Morphological characters and respective class and state in the analysis

<b>Morphological character</b>	<b>Class/States</b>
Costal index	Continuous
4v index	Continuous
5x index	Continuous
Ac index	Continuous
Length Or1/ Length Or2	Continuous
Rows of Achrostical setae	Categorical – 6/8/10
Tergit II - pale area	Categorical – presence/absence
Tergite III - pale area	Categorical – presence/absence
Tergite IV - pale area	Categorical – presence/absence
Tergite V - pale area	Categorical – presence/absence
Tergite VI - pale area	Categorical – presence/absence
Cloud band apical CII	Categorical – presence/absence
Cloud band 1 <sup>st</sup> costal brake	Categorical – presence/absence
Cloud band 2 <sup>nd</sup> costal brake	Categorical – presence/absence

### 3 Results

#### 3.1 Descriptions

*Mycodrosophila* (Oldenberg 1914)

*Mycodrosophila* sp1

(Fig. 3, 5-9)

Type material. Holotype ♂, labeled “Brasil, RO. Colorado do Oeste 13°00'37.7"S;

60°35'24.9"W, Junges, J. col. 5.I.2012 / *Mycodrosophila* sp1 Junges, Loreto, Robe and Gottschalk ♂ Holótipo". Paratypes: 2 ♂ labeled: "Brasil, RO. Colorado do Oeste. Zona rural, 13°00'37.7"S; 60°35'24.9"W, Junges, J. col. 5.I.2012 / *Mycodrosophila* sp1 Junges, Loreto, Robe and Gottschalk ♂ Parátipo 1"; "Brasil, RO. Colorado do Oeste. Zona rural, 13°00'37.7"S; 60°35'24.9"W, Junges, J. col. 5.I.2012 / *Mycodrosophila* sp1 Junges, Loreto, Robe and Gottschalk ♂ Parátipo 2 (only a slide with terminalia)". All the specimens (holotype and paratypes) had their post-abdomen dissected and the terminalias mounted on slides with Canada balsam.

Type locality (Fig. 2): Amazonian forest fragment, Colorado do Oeste city, Rondonia State, Brazil (13°00'37.7"S; 60°35'24.9"W).

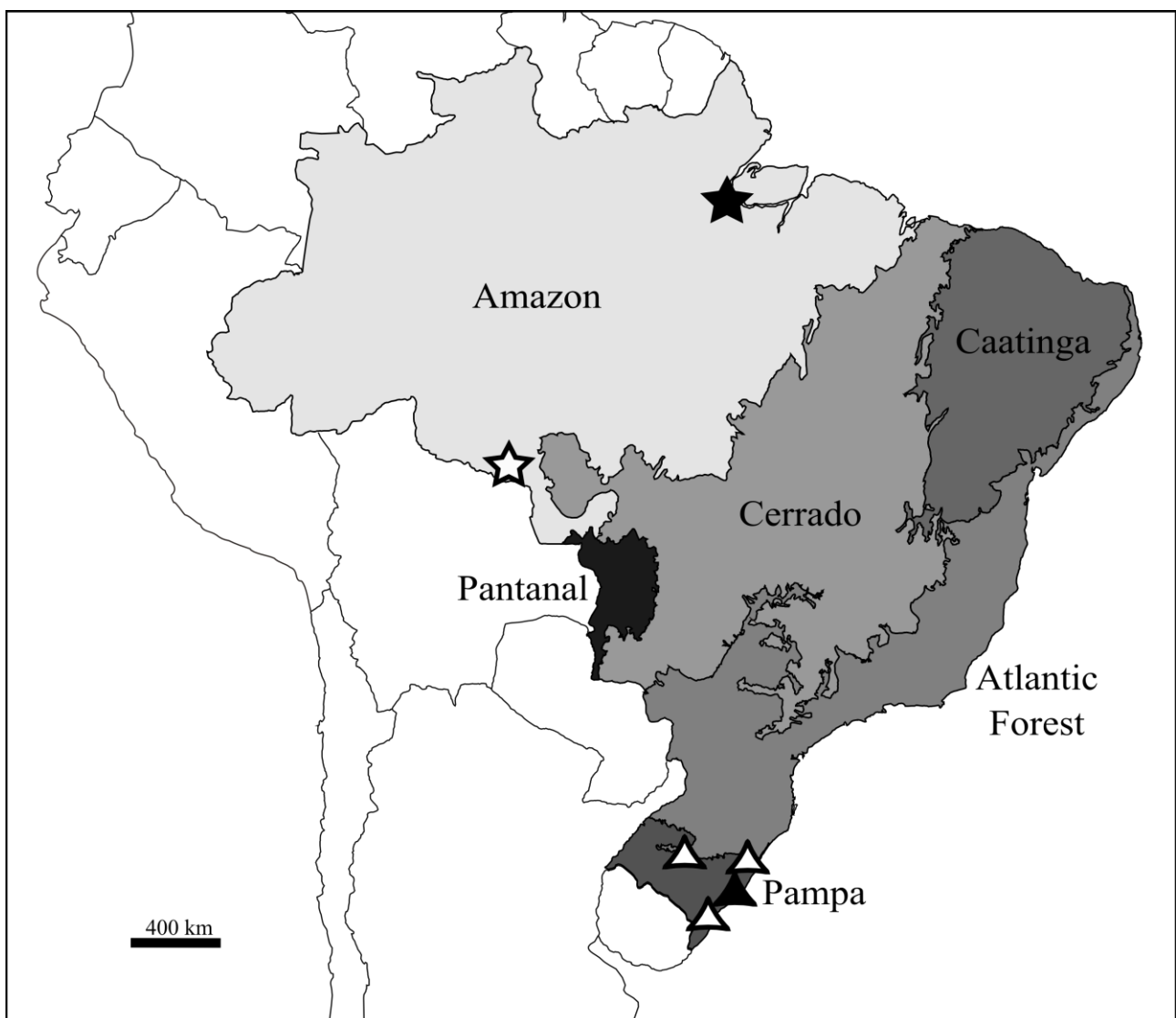


Figure 2. Brazilian Biomes, according to IBGE (2013), and the occurrence records from the two new *Mycodrosophila* species. Stars indicate *Mycodrosophila* sp1, triangles indicates *Mycodrosophila* sp2. The black symbols indicates the location from the type series.

Diagnosis: Main color dark brown. Thorax with dorsal region dark brown and pleura pale



yellowish. Abdomen with dark brown bands covering tergites II-V, tergite II with a pale central area backward projected centrally, tergite V with the dark band covering only the posterior margin, with a slight central and anterior projection, and tergite VI with a central longitudinal strip. Wing bearing two clouded bands extending dorso-ventrally below to each costal vein breaks, very similar to *M. projectans*. Aedeagus projected anteriorly with apical region bifurcated and jagged (Fig.4-6).

Head: Frons dark brown. Frontal length= 0.24 mm (0.21-0.25 mm); frontal index= 0.81 (0.86-0.91) frontal tapering ratio= 1.18 (1.13-1.22), length ratio of orbital setae: or2/or1= 0.16, or2/or3= 0.33, or1/or3= broken, vertical setae broken; ocellar triangle yellowish about 32% (30-33%) of frontal length. Facial carina prominent and nose like. Antennae brown, arista with 4 dorsal and 1 ventral branches, flagellomere I width to length ratio= 0.9 (0.87-0.93). Palpus dark brown. Red eyes without pile. Gena brown, vibrissal index= 0.60 (0.45-0.75); cheek index= 5.47 (4.43-7.00); eye index= 1.11 (1.07-1.15).

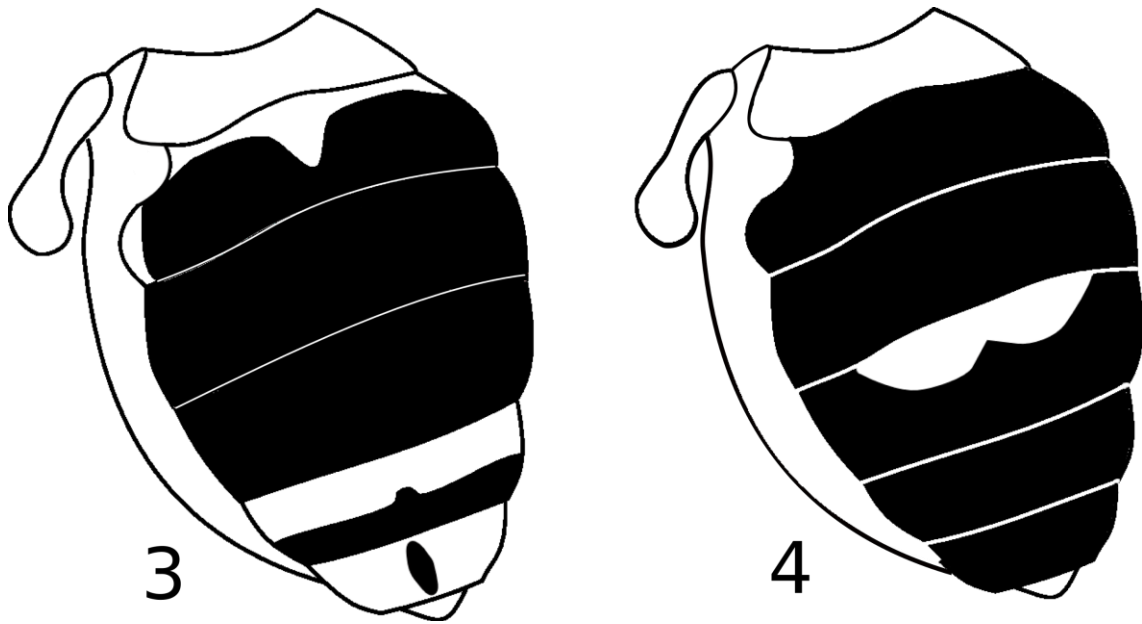
Thorax: Main color dark brown. Length: 0.67 mm (0.62-0.70 mm), width: 0.54 mm (0.50-0.57 mm). Eight irregular rows of acrostichals, anterior pair of dorsocentral setae absent, distance between posterior dorsocentral= 0.26 (0.22-0.30); no prescutellar setae. Scutellum dark brown. Basal scutellar setae convergent. Scut index= 0.54 (0.45-0.64); scut position index= 0.61 (0.5-0.7). Two prominent katepisternal setae. Sterno index= 0.54 (0.45-0.63). Pleurae brownish yellow and legs yellowish.

Wings: Yellowish with dark yellow veins, bearing two clouded bands extending dorso-ventrally below each costal vein breaks. Length= 1.53 mm (1.5-1.57 mm). Indices: wing index= 2.27 (2.17-2.33); C= 0.90 (0.88-0.92); Ac= 5.95 (5.40-6.25); 4v= 2.04 (1.52-2.38); 5x= 1.85 (1.55-2.00); 4c= 1.79 (1.31-2.15); M= 0.51 (0.42-0.70); hb= 0.63 (0.60-0.66); prox. X= 0.56 (0.42-0.69).

Abdomen (Fig. 3): Tergites II-V with dark brown bands. Tergite II with the pale area occupying almost half of the anterior margin, with a backward central projection. Tergite V with the band covering only the posterior margin and containing a slight central projection. Tergite VI bearing one central longitudinal strip.

Body length: 1.51 mm (1.50-1.55 mm)

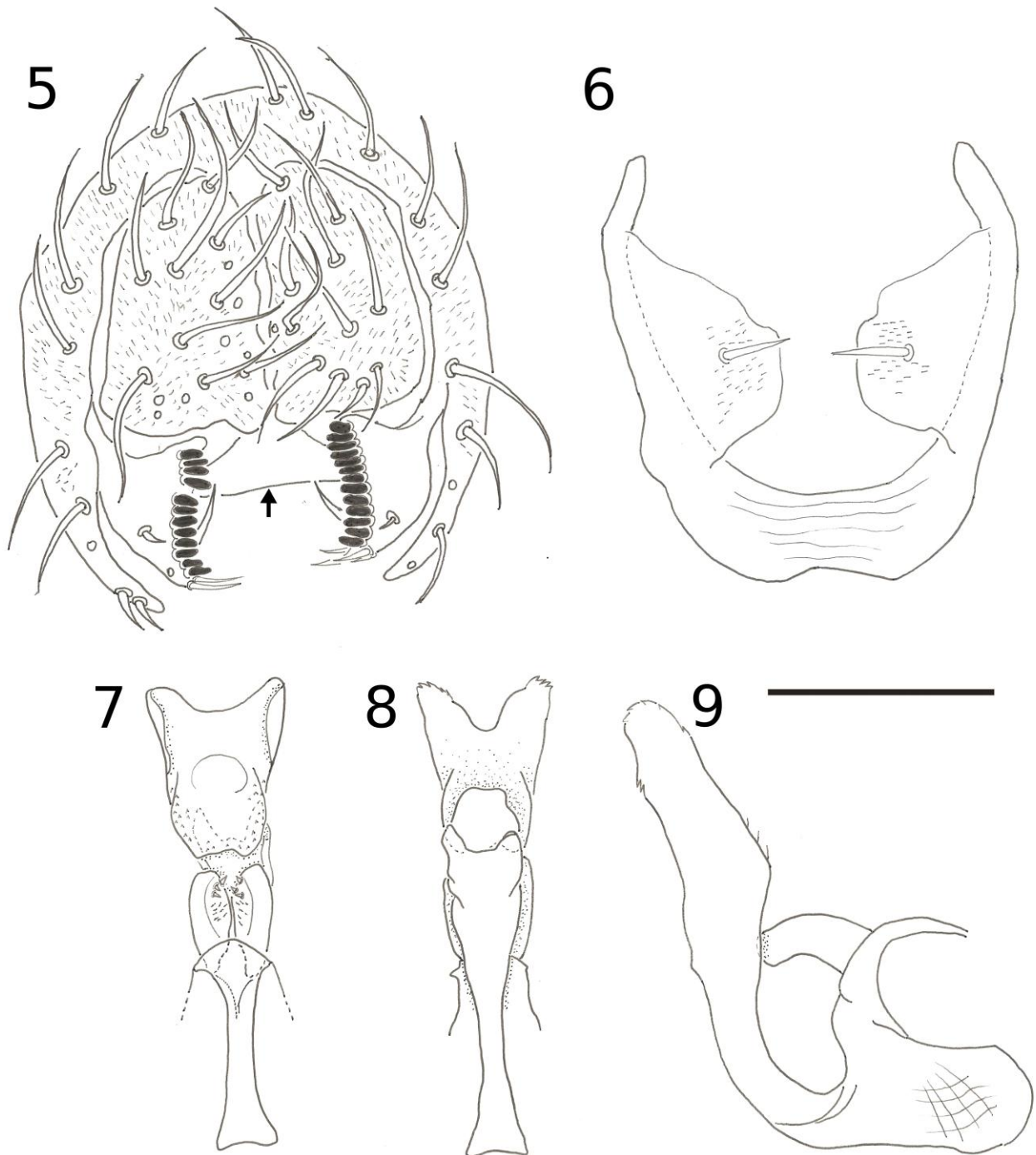
Terminalia (Figs. 5-9): Epandrium microtrichose with 5 upper bristles, ventral lobe not microtrichose with 7 large bristles. Cerci microtrichose bearing large bristles, not fused to epandrium. Decasternum as in Figure 5. Surstili with 12 - 13 prensisetae, 2 - 3 inner and 3 - 4 outer setae. Hyandrium with an arc format. Gonopods large, fused to hyandrium and containing short piles and one seta. Aedeagus projected anteriorly, with the apical region bifurcated and jagged, internal margin of the aedeagus with rows of tiny setae. Aedeagal apodeme flattened laterally and shorter than aedeagus. Ventral rod projected anteriorly and fused with the lower margin of the hyandrium. Paraphyses microtrichose, fused to the gonopods and containing three inner setulae.



Figures 3–4. Illustration of the abdominal patterns for *Mycodrosophila* species. 3. *Mycodrosophila* sp1, 4. *Mycodrosophila* sp2

Geographic distribution: *Mycodrosophila* sp1 was sampled in areas from two Brazilian Amazonian Forest areas: in Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço city, Pará (PA) ( $1^{\circ}47'32.3''\text{S}$ ;  $1^{\circ}26'2.5''\text{W}$ ) and in Colorado do Oeste city, Rondônia (RO) ( $13^{\circ}00'37.7''\text{S}$ ;  $60^{\circ}35'24.9''\text{W}$ ) (Fig. 2). The type series includes only specimens from RO, although one individual from PA was used in the molecular analysis.

Ecological notes: The distance between the sampled locations of *Mycodrosophila* sp1 suggests this species may be largely distributed in the Amazon Biome. Nevertheless, the absence of more records from this species hampers the achievement of conclusive answers. Type series specimens were collected fling over fructification bodies of the genus *Mycenas* (Agaricales, Mycenaceae) (Fig. 1).



Figures 5-9. Male terminalia of the holotype of *Mycodrosophila* sp1. 3. Epandrium, cerci, surstyli and decasternum, posterior view. 4. Hypandrium and gonopods, posterior view. 5-7. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses, 5. Ventral; 6. Dorsal; and 7. Lateral view. In 3, arrow indicates decasternum position. Bar = 0.1 mm.

*Mycodrosophila* sp2

(Figs. 4, 10-14)

Type material. Holotype ♂, labeled: “Brasil, RS. Pelotas. Horto Botânico - UFPel. 31°46'02.05"S, 52°26'55.34"W, Blauth, M.L and Valer, F. col. 29.04.2011 / *Mycodrosophila* sp2 Junges, Loreto, Robe and Gottschalk, ♂ Holótipo”. Paratypes: 3 ♂ labeled: “Brasil, RS. Pelotas. Horto Botânico - UFPel. 31°46'02.05"S, 52°26'55.34"W, Blauth, M.L and Valer, F. col. 29.04.2011/*Mycodrosophila* sp2 Junges, Loreto, Robe and Gottschalk ♂ Parátipo”. All the specimens (holotype and paratypes) had their post-abdomen dissected and the terminalias mounted on slides with Canada balsam.

Type locality (Fig.2): Horto-Botânico Irmão Teodoro Luis, Universidade Federal de Pelotas Campi, Capão do Leão city, Rio Grande do Sul State, Brazil (31°46'02.05"S, 52°26'55.34).

Diagnosis: Main color dark brown, notum dark brown and pleura brownish yellow. Abdomen with dark brown bands covering tergites II-VI (tergite IV with a pale central area as in *M. projectans*). Wing bearing two clouded bands below each costal vein breaks. The aedeagus (Figs. 9 - 11) has a tubular form with tiny scales around it, being apically bifurcated and slightly serrated.

Head: Frons dark brown with a median area light brown. Frontal length= 0.29 mm (0.29-0.30 mm); frontal index= 0.97 (0.96-1.00), frontal tapering ratio= 1.35 (1.30-1.48), length ratios of orbital setae: or2/or1= 0.20 (0.12-0.29), or2/or3= 0.21 (0.12-0.38), or1/or3= 1.05 (0.82-1.3), vt index= 0.99 (0.77-1.15), ocellar triangle dark brown about 35% (29-40%) of frontal length. Face dark brown, facial carina prominent and nose like. Antennae dark brown, arista with 4 or 5 dorsal, 1 ventral and 4 internal branches, flagellomere I width to length ratio= 0.44 (0.41-0.47). Palpus dark brown. Red eyes without pile. Gena brown, vibrissal index= 0.27 (0.16-0.33); cheek index= 9 (5-13); eye index= 1.12 (1.05-1.26).

Thorax: Main color dark brown. Length= 0.95 mm (0.92-1.00 mm), width= 0.72 mm (0.69-0.77 mm). Ten irregular rows of acrostichals, anterior pair of dorsocentral setae absent, distance between posterior dorsocentral= 0.34 (0.28-0.36), no prescutellar setae. Scutellum dark brown. Basal scutellar setae convergent. Scut index= 0.41 (0.36-0.51), scut position index= 0.63 (0.41-0.82). Two prominent katepisternal setae, sterno index= 0.54 (0.47-0.59). Pleura and legs brownish yellow.

Wings: Yellow with veins dark yellowish, bearing clouded bands below the two costal vein breaks, extending dorso-ventrally. Length= 2.26 mm (2.17-2.33 mm). Indices: wing index= 2.39 (2.17-2.81); C= 0.84 (0.80-0.87); Ac= 5.40 (5.06-5.86); 4v= 1.90 (1.81-1.97); 5x= 1.42 (1.25-1.61); 4c= 1.78 (1.64-1.86); M= 0.48 (0.45-0.50); hb= 0.76 (0.72-0.79); prox. X= 0.52 (0.47-0.54).

Abdomen (Fig. 4): Tergites II, VI dark brown, only tergite IV with an anterior and medial

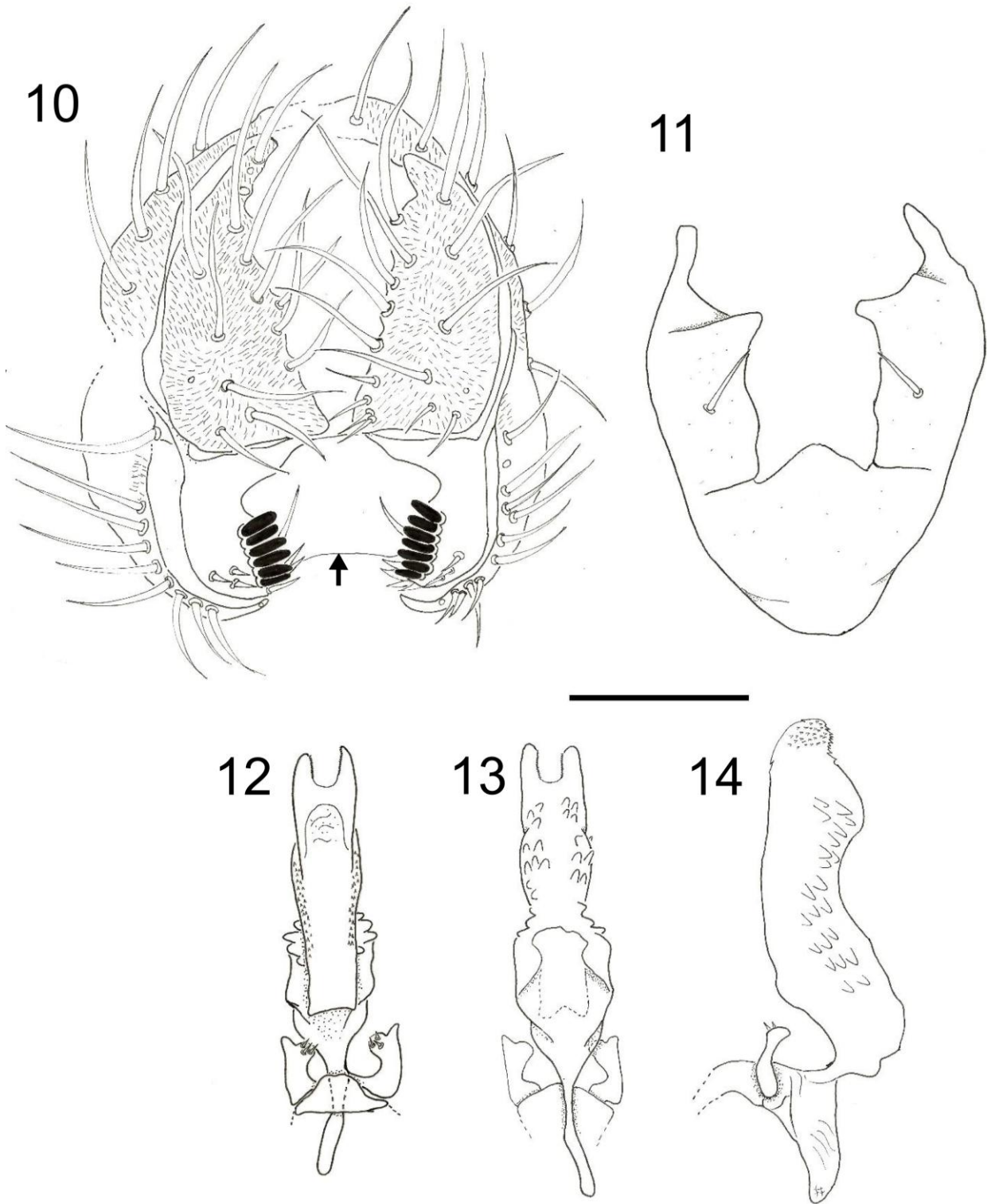
pale area.

Body length: 2.36 mm (2.12-2.61 mm)

Terminalia (Fig. 10-14): Epandrium highly microtrichose, with 11 upper bristles. Ventral lobe not microtrichose, with 10 large bristles. Cerci microtrichose, bearing large bristles, not fused to epandrium. Decasternum as in Fig. 8. Surstylus with 6 peg-like prenisetae, 4 inner and 3 outer setae. Hyandrium longer than wide. Gonopods fused to hyandrium, longer than wider, with one long seta. Aedeagus tubular with tiny scales in the medial half, projected anteriorly, with the tip turned to the dorsal region. Apex of aedeagus bifurcated, with marginal small spines and a jagged aspect. Aedeagal apodeme shorter than aedeagus. Ventral rod projected and fused with the lower margin of the hyandrium. Paraphyses linked to the aedeagal apodeme by membranous tissue and containing three tiny setulae internally.

Geographic distribution: *Mycodrosophila* sp2 appears to be widely distributed for the Southern region in Brazil, being recorded in areas encompassing the Atlantic and Pampa Biomes (Fig. 2), it was until now collected in Santa Maria, RS, Brazil (29°43'02''S; 53°43'34''W), Pelotas, RS, Brazil (31°46'02.05''S; 52°26'55.34''), Rio Grande, RS, Brazil (32°32'18.28''S; 52°32'6.74''W) and Viamão, RS, Brazil (30°05'17''S; 51°06'07''W). The type series includes only specimens from Pelotas, RS, although individuals from, Santa Maria and Rio Grande were included in the molecular analysis.

Ecological notes: This species is putatively common in Southern Brazil, where specimens of the type series were sampled flying over an unidentified fungus of the Polyporaceae family.



Figures 10-14 Male terminalia of the holotype of *Mycodrosophila* sp2 10. Epandrium, cerci, surstyli and decastrum, dorsal view; 11. Hypandrium and gonopods, dorsal view; 12-14. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses, 12. ventral; 13. dorsal; and 14. lateral view. In 10, arrow indicates decastrum position. Bar = 0.1 mm..

### 3.2 Phylogenetic Analysis

The multiple alignment of the 23 sequences for the COI gene with 748 base pairs presented 227 variable sites, of which 184 were parsimoniously informative. The general frequencies for each nucleotide were: A=29.8, C=15.8, G=16.7 and T=37.7 and the average transition/transversion ratio was 0.81. Minimum, maximum and average of intraspecific and interspecific K2P COI distances with standard errors are presented in Table 3. In this case, whereas the two *Mycodrosophila* sp1 obtained sequences presented a 0.4% divergence, the *Mycodrosophila* sp2 sequences ranged from 0.0 to 0.3% of intraspecific distances. The interspecific distances presented by the new species and each of the two other evaluated Neotropical species were quite higher, and always greater than 12%. Even the K2P distances between the two proposed new species are high, and they diverge by an amount of 13%.

Table 3. Intra and interspecific K2P COI distances and their respective standard errors in regard to the comparisons involving *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 plus the other evaluated Neotropical *Mycodrosophila* species

	Species	Distances values		
		Minimal	Average	Maximal
Intraspecific distances	<i>Mycodrosophila</i> sp1 (Msp1)	-	0.004±0.002	-
	<i>Mycodrosophila</i> sp2 (Msp2)	0.000±0.000	0.001±0.001	0.003±0.002
Interspecific distances	Msp1 x <i>M. projectans</i>	0.143±0.017	0.145±0.017	0.149±0.017
	Msp1x <i>M.elegans</i>	0.163±0.018	0.164±0.018	0.165±0.018
	Msp2 x <i>M. projectans</i>	0.127±0.014	0.134±0.015	0.144±0.016
	Msp2 x <i>M. elegans</i>	0.146±0.014	0.148±0.015	0.150±0.016
	Msp1 x Msp2	0.133±0.016	0.135±0.016	0.137±0.016

The COI supported phylogram is depicted in Figure 15, which presents the Bayesian majority rule consensus tree added to the respective posterior probability (PP) and bootstrap values recovered for each node in the different analyses. This phylogeny rooted with *C. capitata* presents

*Mycodrosophila* monophyletic in regard to the included Steganinae species (PP = 0.97). Although several interspecific clusters were quite poorly resolved, the species were all reciprocally monophyletic, with high support for all methods. Interestingly, besides the clustering between the two Nearctic species (PP = 1.00), the only supported interspecific clade positioned *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 as sister species (PP = 0.95). Although with low support, our tree also recovered the early separation between Neotropical and Nearctical species (PP = 0.51), and presented *M. elegans* as an early Neotropical offshoot (PP = 0.69).

The morphological weighted parsimony analysis recovered six trees with the same number of steps (242), all of which presented a *ci* of 0.91 and a *ri* of 0.73. Disconsidering relationships among the Nearctic species, this set of trees was further reduced to two, one of which is presented in Figure 16. This phenogram reconciles morphological and molecular data in presenting *M. elegans* as the most distinguished Neotropical species. Nevertheless, instead of clustering *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 together, this tree recovers *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 as morphologically similar to *M. neoprojectans* and *M. projectans*, respectively.

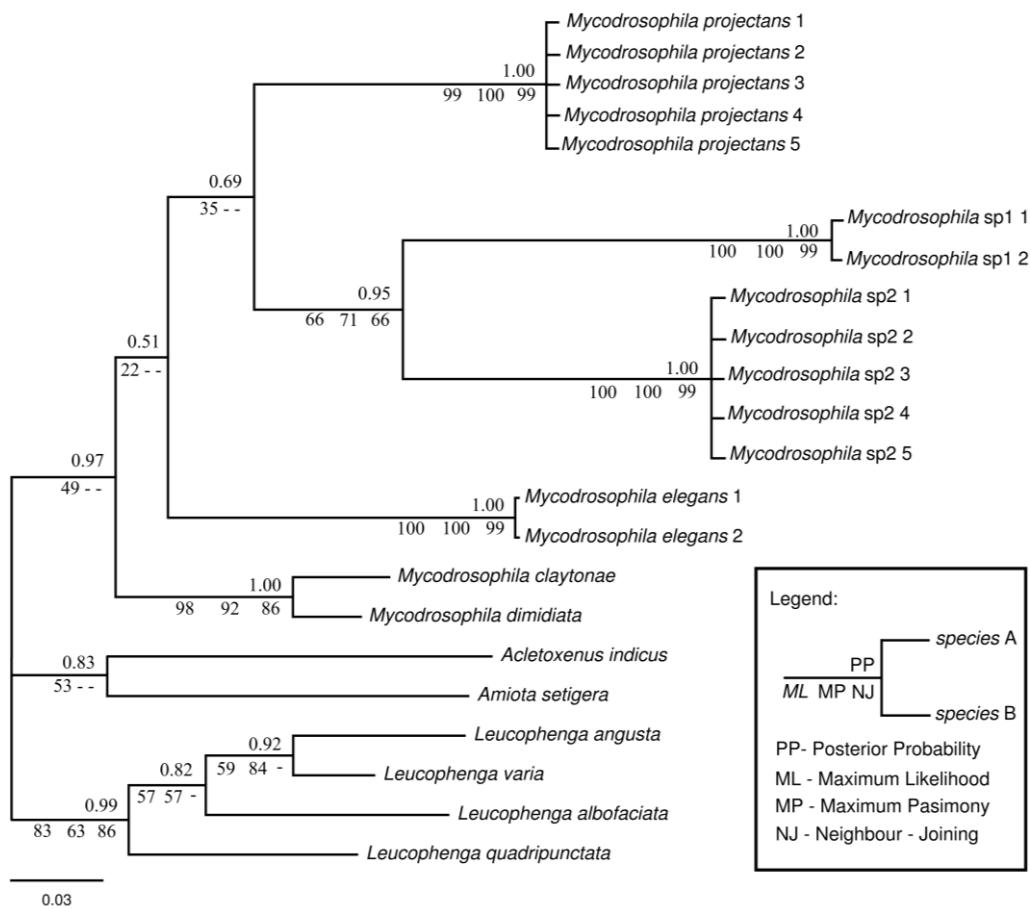


Figure 15. COI majority-rule consensus phylogeny inferred by Bayesian analysis using the GTR+G+I model, as proposed by the AIC test performed for the 23 nucleotide sequences. The values above the nodes are the posterior probability and the values below are the bootstraps for the maximum likelihood, maximum parsimony and neighbor-joining trees, respectively. The “-” signal indicates absence of support for the considered relationship. This tree was rooted with *C. capitata* sequences.



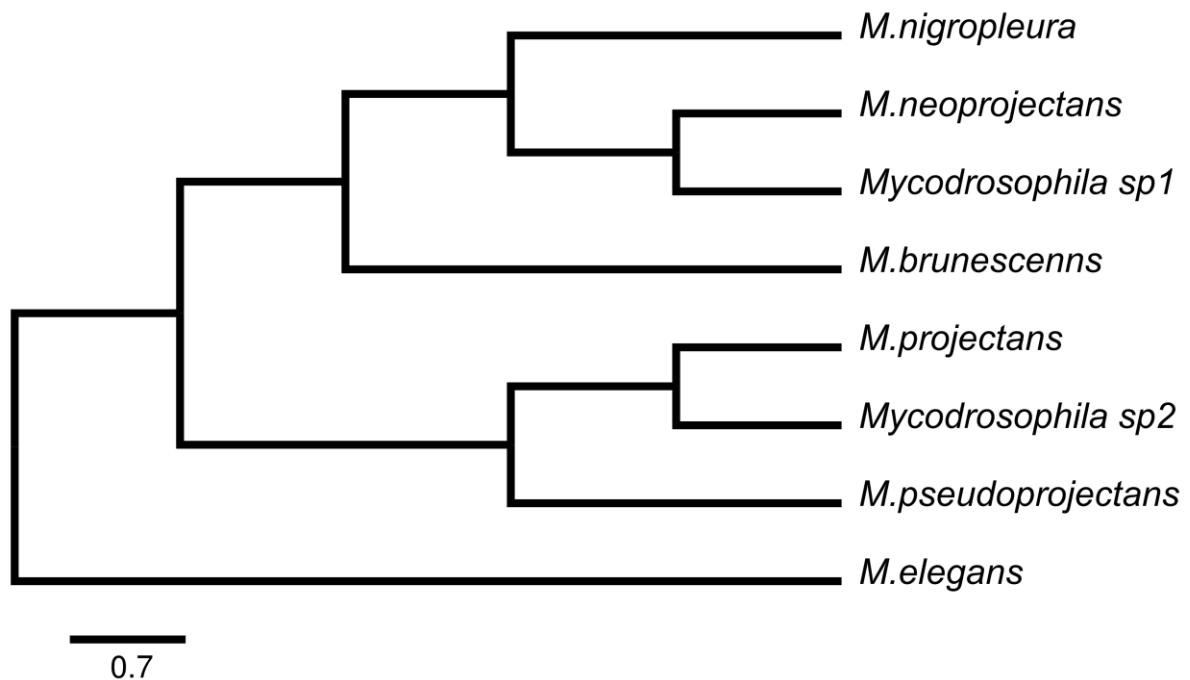


Figura 16. One among two maximum parsimony trees recovered through analysis of the morphological characters depicted in Table 2 showing the external similarities among the eight known Neotropical *Mycodrosophila* species. This tree was rooted with the three Nearctic species (*M. claytonae*, *M. dimidiata*, and *M. stalkerii*), but their relationships were omitted in order to reduce the set of equally parsimonious trees.

## 4. Discussion

### 4.1 Descriptions

The two species described here are included in the *Mycodrosophila* genus because they present aristae with a single ventral branch basal to the terminal fork, only one pair of dorsocentral setae, a costal lappet and the scutum entirely coloured and shining, without spots at bases of setae (Wheeler and Takada 1963, Grimaldi 1990). As concerns the two subgenus proposed by Oldenberg (1914) and Okada (1986), *Mycodrosophila sp1* and *Mycodrosophila sp2* belong to the subgenus *Mycodrosophila* Oldenberg, with a costal lappet developed and a cloud band below the second costal vein.

The patterns of the tergites are very similar to those described by Wheeler and Takada (1963), bearing some pale areas between the black bands, but we can realize some characteristic differences. When we compare these species with the Nearctic *M. dimidiata*, *M. claytonae* and *M. stalkerii*, the patterns of tergites are largely different once these three species present pale areas in all the six last tergites, whereas *Mycodrosophila sp1* and *Mycodrosophila sp2* present pale areas restricted to some tergites. Presence of pale areas in the tergites seems to be widespread in this genus, being found in a great number of *Mycodrosophila* from Oceania (Bock 1990, Tsacas and

Chassagnard 1991), Afrotropical region and Japan (Okada 1956, Wynn and Toda 1990, Chassagnard and Lachaise 2000).

When we compared the Neotropical *Mycodrosophila* species (Wheeler and Takada 1963), it is possible to see that *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 are different from *M. nigropleura*, *M. brunnescens* and *M. elegans* because these last species have their abdomen completely dark whereas the first two have some pale areas in the tergites. *Mycodrosophila* sp1 differs from *M. projectans* by not showing the pale areas in tergites III and IV, and from *M. pseudoprojectans* by presenting a dark spot on tergite VI. *Mycodrosophila* sp1 has the abdominal pattern more similar to *M. neoprojectans*, a similarity also recorded by the presented morphological phenogram, although both species differ in tergite II, which has a pale area in the first species and is completely dark in the last species. Moreover, *Mycodrosophila* sp2 also differs from *M. neoprojectans*, *M. projectans* and *M. pseudoprojectans* by having a pale area only in tergite IV, while the other three species have more pale areas in the abdomen. At contrast, the abdomen of *Mycodrosophila* sp2 is externally similar to *M. projectans*, however despite the pale expanded area in the anterior margin of the tergite IV, *M. projectans* is different from the new species because a pale area in the tergite II that it is not found in *Mycodrosophila* sp2. The similarity between *Mycodrosophila* sp2 and *M. projectans* is also recorded in our morphological phenogram (Fig. 14).

The male terminalia for the two new species also presents the regular form found in *Mycodrosophila* flies, with a tubular, elongated and apically bifurcated aedeagus (Wheeler and Takada 1963, Okada 1968, Bock 1980, Chen et al. 1989, Winn and Toda 1990, Tsacas and Chassagnard 1991, Chassagnard and Lachaise 2000, McEvey and Polak 2005.). In fact, the aedeagus with a bifurcation or bifurcated and jagged in the apical region is a characteristic shared for a large number of *Mycodrosophila* species. For the American species, eight of the as yet described species plus the two here described present this shape in aedeagus structure, a pattern also presented by several species of Africa, Asia and Oceania (Okada 1956, 1968, 1986, Sundaran and Gupta 1991, Chassagnard and Lachaise 2000, McEvey and Polak 2005). A putative exception to this rule is provided by *M. brunneceus* whose male genitalia is as yet unknown (Wheeler and Takada 1963).

*Mycodrosophila* sp1 has an aedeagus as elongated as in *M. neoprojectans*, but the abdomen patterns with the pale area in tergite II and the wing with a band in both costal brakes in *Mycodrosophila* sp1 are distinctive features presented by this species. Comparing *Mycodrosophila* sp1 with *Mycodrosodophila* species inhabiting other Zoogeographical Regions (Okada 1968 and Bock 1980), we have *M. diversa* Bock 1980 and *M. erecta* Okada 1968 also bearing the aedeagus curved ventrally, but *M. diversa* has the tergite VI pale and a thinner apical aedeagus region, while *M. erecta* has the aedeagus more straight and with a few notched bifurcations. In regard to

*Mycodrosophila* sp2, it has an aedeagus very similar to that of *M. claytonae*, with a straight format and tiny spines in the apical region, but the pattern of abdomen in both species are largely different, as described above.

Key to American species of *Mycodrosophila* (updated from Wheeler and Takada, 1963)

1. Dark bands of the tergites II and III broadly interrupted medially and all the tergites with pale areas; Nearctic species ..... 2
  - 1'. Dark bands of the tergites II and III without broad median interruption; Neotropical species ..... 4
2. Dark band of tergite IV broadly interrupted medially thus appearing like preceding tergites *Mycodrosophila dimidiata* (Loew) (Terminalia in Wheeler and Takada, 1963, p.396, figs. 3-6)
  - 2'. Dark band of tergite IV not interrupted, medially shaped like an inverted V ..... 3
3. Costal index about 2.0, tergite VI dark or with small pale areas in lateral region. Abdominal pattern as shown Wheeler and Takada 1963, p. 394, fig.2 *Mycodrosophila stalkerii* Wheeler and Takada (Terminalia in Wheeler and Takada, 1963, p.396, figs. 7-10)
  - 3'. Costal index about 1.7, tergite VI with large pale areas laterally. Abdominal pattern as shown in Wheeler and Takada 1963, p. 394, fig.2; *Mycodrosophila claytonae* Wheeler and Takada. (Terminalia in Wheeler and Takada, 1963, p.396, figs. 11-14)
4. Wing with five prominent black clouds, including one over dm-Cu crossvein; R<sub>2+3</sub> bent abruptly to Costa. *Mycodrosophila elegans* Wheeler and Takada (Terminalia in Wheeler and Takada, 1963, p.397, figs. 31-34).
  - 4'. Wings less clouded, the posterior crossvein (dm-Cu) never in a cloud; R<sub>2+3</sub> vein approaching Costa gradually ..... 5
5. Pleura largely brown, whit a whitish area extending obliquely from axillary area (wing base) to pronotum(prosternum); legs brown ..... *Mycodrosophila brunnescens* Wheeler and Takada
  - 5'. Pleura pale yellowish, at most the anepimeron(pteropleura) dark; legs mostly pale ..... 6
6. Anepimeron (pteropleura) dark, forming a short oblique band from haltere base to katepisternum (sternopleural) corner; abdomen black. *Mycodrosophila nigropleura* Wheeler and Takada (Terminalia in Wheeler and Takada, 1963, p.396, figs. 27-30).
  - 6'. Anepimerom (Pteropleura) yellowish pale or brownish pale; some tergites with pale areas ..... 7
7. Tergite VI whole shining black ..... 8
  - 7'. Tergite VI yellow with and elongate, narrow, median black stripe; tergite V with an apical dark band expanded basally in midline ..... 9
8. Tergites III and IV with or only the tergite IV with some pale areas; tergites V and VI shining

black; costal lappet large and black ..... 10

8'. Tergites III, IV and VI shining black, tergite V with paramedian pale areas basally; Humeral break (costal incision) weak, the lappet scarcely developed *Mycodrosophila pseudoprojectans* Wheeler and Takada (Terminalia in Wheeler and Takada, 1963, p.396, figs. 23-26).

9. Tergite II without pale areas; dark band in the tergite V not touching the lateral margin. *Mycodrosophila neoprojectans* Wheeler and Takada (Terminalia in Wheeler and Takada 1963., p. 397, figs. 19-20)

9'. Tergite II with a pale area in the anterior margin and dark band with bilobed aspect *Mycodrosophila sp1*, sp.nov (Terminalia in fig. 3-7).

10. Both tergites III and IV with pale areas in the anterior margin; tergite III with a pale and rounded central area and tergite IV with an expanded pale area. *Mycodrosophila projectans* Sturtevant (Terminalia in Wheeler and Takada 1963, p. 396, figs. 15-18).

10'. Only tergite IV with a pale expanded area in the anterior margin, tergite III dark brown *Mycodrosophila sp.2*, sp. nov. (Terminalia fig.7-11).

#### 4.2 Phenetic and Phylogenetic Analysis

According to the molecular results, *Mycodrosophila sp1* and *Mycodrosophila sp2* are indeed new species. In this sense, phylogenetic results presented these as reciprocally monophyletic species, whereas phenetic distance analysis recovered a broad barcoding gap between intra and interspecific distances. Since these are two premises for successful application of DNA-Barcoding approaches (Meyer and Paulay 2005), our results support the notion that this methodology may help in species identification/discovery issues (Hebert et al. 2003, van Nieuwerkerken et al. 2012).

Interspecific relationships are difficult to infer because of the low support values presented by our phylogenies, added to the fact that comparisons using a single gene in only one internal group may not accurately reflect species phylogeny (Nixon and Carpenter 1993, van Nieuwerkerken et al. 2012). Nevertheless, as some similarities detached above were recovered in both molecular and morphological analyses, we may use them to make a first approximation to the group's phylogeny. This is the case, for example, for the clustering of *M. projectans*, *Mycodrosophila sp1* and *Mycodrosophila sp2*, which formed a monophyletic clade sister to *M. elegans* in both, molecular and morphological phylogenies. The formation of a Neotropical *Mycodrosophila* species group independent to the Nearctical species was inferred though *COI* phylogenetic analysis, and despite its low support values, is in concordance with the proposition of Wheeler and Takada (1963). In this sense, it is important to emphasize that to our knowledge none molecular study has as yet

explored the phylogenetic relationships among American *Mycodrosophila* species, and this is certainly an open issue that still needs to be further addressed.

## 5. Conclusion

*Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 were described here and their relationships with other American *Mycodrosophila* species were inferred based on morphological and molecular data as combined approaches to elucidate some aspects of the systematic of this poorly known part of the *Mycodrosophila* genus. New studies will be needed in order to access other aspects related to their geographical distribution, their ecological properties and their evolutionary affinities. Nevertheless, at least at a first sight, *Mycodrosophila* sp1 and *Mycodrosophila* sp2 are closely related species that are putatively frequent in the Amazonian and Atlantic Forest Brazilian Biomes.

## 6. Acknowledgements

The authors are grateful to Ronaldo Golombiesky for the sequencing reactions; to Monica Laner Blauth, Felipe Berti Valer and Stela Machado, for kindly providing some specimens; to Pedro Mesquita Fonseca and Francine Cenzi de Ré for helping with DNA manipulation procedures; to Eduardo Bernardi for the fungi identifications, and to the Brazilian Funding Agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

## 7 References

- Bächli G; Vilela CR; Escher SA; Saura A. 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. **Fauna Entomologica Scandinavica**, vol. 39, p. 1-362.
- Bächli, G. 2013. **TaxoDros: The database on Taxonomy of Drosophilidae**. Version 2010/12. Electronic Database accessible at <http://www.taxodros.unizh.ch>. Captured on February 2013.
- Bock I. 1980. Drosophilidae of Australia. IV. *Mycodrosophila* (Insecta: Diptera). **Australian Journal of Zoology**, v.28, p. 261-269.
- Burla H. 1954. Zur Kenntnis Der Drosophiliden der Elfenbeinküste (Französisch, West-Afrika). **Reviste Suisse Zoologi**, v. 61, 1-218.
- Chassagnard MT, Lachaise D. 2000. *Mycodrosophila matilei*, nouvelle espèce mycophage afrotropicale découverte par Loïc Matile (Diptera, Drosophilidae). **Revue Française**

**d'Entomologie**, v.22, p. 177–182.

Chen HZ, Fan ZD, Okada T. 1989. Six new and two newly recorded species of the genus *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae) from China. **Japanese Journal of Entomology**, v. 57, p. 383-390.

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

Grimaldi DA. 2010. Drosophilidae (small fruit flies, pomace flies, vinegar flies). In: Brown, BV, Borkent A, Cumming JM, Wood DM, Woodley NE, Zumbado MA. **Manual of Central American Diptera**. NRC-CNRC, 1197-1206p.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematics Biology**, v. 52, p. 696-704.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceeding of the Royal Society of London B**, v. 270, p. 313-321.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. Mapas Murais, Biomas. Available from: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas\\_e\\_Mapas/Mapas\\_Murais/](ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/).

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

Meyer CP, Paulay. G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS Biol**, v.3, p. 2229-2238.

McEvey SF, Polak M. 2005. *Mycodrosophila* (Diptera: Drosophilidae) of Fiji and Vanuatu with description of nine new species. **Bishop Museum Occasional Papers**, v. 84, p. 35-67.

Nixon KC, Carpenter JM. 1993. On outgroups. **Cladistics**, v. 9, p. 413-426.

Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University.

Oldenberg L. 1914. Beitrag zur Kenntnis der europäischen Drosophiliden (Dipt.). **Archiv für Naturgeschichte**, v. 80, p. 1-42.

Okada, T. 1956. **Systematic study of Drosophilidae and allied families of Japan**. Gihodo. 183 p.

Okada T. 1965. Drosophilidae of the Okinawa Islands. **Kontyû**, v.33, p. 327-350.

Okada T. 1968. Addition to the fauna of the family Drosophilidae of Japan and adjacent countries (Diptera).II. Genera *Paramycodrosophila*, *Mycodrosophila*, *Liodrosophila* and *Drosophila*,

- including a new subgenus *Psilodorha*. **Kontyû**, v. 26, p. 324-340.
- Okada T. 1986. The genus *Mycodrosophila* Oldenberg (Diptera, Drosophilidae) of Southeast Asia and New Guinea I. Typical species. **Kontyû**, v. 54, p. 112–123.
- Okada T. 1986. The genus *Mycodrosophila* Oldenberg (Diptera, Drosophilidae) of Southeast Asia and New Guinea II. Atypical species. **Kontyû**, v. 54, p. 291–302.
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, p. 817-818.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 538-542.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701.
- Staden R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p. 233-241.
- Sturtevant AH. 1916. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. **Annals of the Entomological Society of America**, v.9, p. 323-343.
- Sundaran AK, Gupta JP. 1991. The Species of the genus *Mycodrosophila* Oldenberg (Diptera: Drosophilidae) from India. **Zoological Science**, v.8, p. 371–376.
- Swofford DL. 2003. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p. 512-526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28 , p.2731-2739.
- Tsacas L, Chassagnard MT. 1991. Diptera Drosophilidae de Nouvelle-Calédonie. 2. *Leucophenga*, *Mycodrosophila* et *Paramycodrosophila*, avec une note sur les genitália de *Leucophenga*., In Chazeau J, Tillier S. (eds.). **Zoologia Neocaledonica**. V. 2. Muséum national d'Histoire naturelle. p. 301–328.

van Nieukerken EJ, Doorenweerd C, Stokvis FR, Groenenberg DSJ. 2012. DNA barcoding of the leaf-mining moth subgenus *Ectoedemia* s. str. (Lepidoptera: Nepticulidae) with COI and EF1- $\alpha$ : two are better than one in recognising cryptic species. **Contributions to Zoology**, v.81, p. 1-24.

Wheeler MR; Takada H. 1963. A revision of the American species of *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 56. p. 392-399.

Wynn S; Toda MJ. 1990. Drosophilidae (Diptera) in Burma, VI. The genera *Mycodrosophila* and *Paramycodrosophila*, **Japanese Journal of Entomology**, v.58(2), p. 303–311.



## 4 DISCUSSÃO GERAL

As espécies Neotropicas de *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* tratadas neste estudo são apenas uma parte da grande lacuna no conhecimento de Drosophilidae, causada principalmente por um viés relacionado às metodologias de amostragem, que tendem a usar armadilhas adequadas para a atração de espécies frugívoras (Freire-Maia e Pavan 1949, Vilela e Bächli 2004, Gottschalk et al. 2009). Isto ocorre porque esta metodologia de amostragem atrai apenas eventualmente alguns drosofilídeos com outros hábitos, e a inespecificidade da isca e a raridade com que moscas com outros hábitos são atraídas dificultam estudos sobre aspectos ecológicos e evolutivos mais amplos (Grimaldi et al. 2003, Tidon et al. 2005), e até mesmo sobre a biodiversidade envolvendo estas espécies..

Outra vantagem apresentada por algumas espécies de *Drosophila* em detrimento de outras diz respeito à facilidade de manutenção de linhagens em laboratório. Isto acabou favorecendo o aumento dos estudos sobre o gênero e conseqüentemente para os táxons mais relacionados a ele, promovendo a formação de coleções taxonômicas, de bancos de armazenamento e manutenção de linhagens e *websites* onde são disponibilizadas fotos e outras informações (Powell 1997, Chaves e Tidon 2008, Bachli 2013). De fato, o gênero *Drosophila* se tornou tão carismático e importante para algumas áreas da ciência que a proposição de mudança de hierarquia do subgênero *Sophophora*, onde está incluída *D. melanogaster*, para o nível genérico causou, e ainda causa discussões entre os drosofilistas com vários trabalhos de opinião publicados no Boletim de Nomenclatura Zoológica (van der Linde et al. 2007, O'grady et al. 2007, O'grady e Markow 2009, van der Linde e Yassin 2010). Yassin (2013) ressalta que nos últimos 20 anos mais de 150 trabalhos utilizando dados moleculares foram publicados com o objetivo de recuperar as relações evolutivas dentro de Drosophilidae, que até então eram estabelecidas quase que exclusivamente através de características morfológicas, e ainda destaca apenas 17 dos 78 gêneros da família foram usados nestes trabalhos e que *Drosophila* é o mais constante.

Desta forma, essa concentração deixa lacunas de conhecimento para alguns gêneros de drosofilídeos, que poderiam, inclusive, auxiliar nas resoluções evolutivas da família. Levando em consideração a existência de um novo ciclo de extinção e a crise de biodiversidade que se estabelece (Landim e Hingst-Zaher 2010, Hoag 2010, Fontaine et al. 2011), é urgente que se adote novas estratégias na proposição de projetos dentro desta família. Utilizando como exemplo o gênero *Mycodrosophila*, é possível perceber uma descontinuidade dos estudos ao

longo do tempo, especialmente na região Neotropical. Em 1963, Marshall Wheeler e Haruo Takada publicaram um estudo que é a principal referência para a identificação de espécies *Mycodrosophila* nas Américas (Grimaldi 2010). Neste trabalho, eles descreveram seis das nove espécies Americanas conhecidas deste gênero, que na época era composto por 40 espécies. Hoje, 50 anos depois, o gênero *Mycodrosophila* possui quase 130 espécies descritas (Bächli et al. 2013), mas as Américas ainda apresentam somente as nove espécies descritas por Wheeler e Takada (1963).

Mesmo gêneros maiores encontrados na região Neotropical apresentam estudos restritos sobre questões intragenéricas. O gênero *Zygothrica* possui uma grande revisão realizada por Grimaldi (1987) onde, além de um estudo sobre as relações evolutivas e agrupamentos, foram descritas 49 novas espécies, que junto com as previamente descritas totalizavam 114. Neste estudo, o autor ainda salienta que restam por descrever cerca de 60 novas espécies e que talvez *Zygothrica* seja a linhagem mais especiosa dos drosofilídeos Neotropicais. No entanto, hoje este gênero conta com apenas 10 espécies a mais do que em 1987, contabilizando, assim, 124 no total.

Neste sentido, os estudos apresentados nesta dissertação, bem como outros já realizados (Gottschalk et al. 2009) e ainda em andamento, junto aos drosofilídeos microfílicos Neotropicais têm um aspecto essencial para a compreensão da biologia destes gêneros pouco conhecidos. Estes trabalhos taxonômicos possuem fundamental importância no que cerne a atualização, recuperação e produção de informações que possam auxiliar no tratamento de questões relacionadas à ecologia e à evolução deste complexo conjunto de espécies. Afinal, a primeira etapa em qualquer destes estudos deve ser a delimitação e a identificação das espécies-alvo.

Abordagens integrativas como as análises morfológicas e moleculares tendem a apresentar boas resoluções quando tratadas conscientemente e quando respeitadas as respectivas limitações (Hebert et al. 2004, Smith et al. 2004 e 2005, Irati et al. 2010). Isso também pode ser evidenciado nos estudos desenvolvidos neste trabalho onde espécies crípticas puderam ser corretamente identificadas utilizando as duas abordagens concomitantemente. Contudo, existem outras ferramentas e mesmo aprimoramentos das atuais podem elucidar questões mais complexas (Page e Hughes 2011). A comparação e a incorporação de informações e de metodologias ao longo do tempo são, pois, fundamentais para o adequado desenvolvimento científico.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo foram descritas seis novas espécies, contemplando o objetivo de auxiliar na resolução taxonômica do grupo por meio de investigações e inferências relacionadas à taxonomia-alfa. Além disso, foi feita uma avaliação da eficiência relacionada ao uso de uma abordagem integrativa entre as metodologias morfológicas (clássica e morfométrica) e moleculares para as descrições, cumprida através da utilização da tecnologia do DNA Barcode (Hebert et al. 2003a ou b? e 2004) e da análise morfométrica (Bookstein 1991, Rohlf e Marcus 1993), aliadas ao tratamento clássico de descrições estabelecido para Drosophilidae (McEvey 1990, Vilela e Bächli 1990, Bächli et al. 2004). A análise integrativa também possibilitou a correta identificação de espécies crípticas, que através de comparações exclusivamente morfológicas não puderam ser corretamente classificadas. Além disso, o uso das metodologias moleculares também revelou alvos potenciais para estudos adicionais na busca por novas espécies.

Como suas principais perspectivas, este estudo traz a possibilidade de se estudar mais profundamente as relações filogenéticas destas espécies, seja para o tratamento da sistemática do grupo de uma forma mais abrangente, ou para a elucidação dos padrões e processos espaço-temporais relacionados à evolução do mesmo. Estudos como este permitirão, ainda, a identificação de características diagnósticas sinapomórficas para os clados potenciais, mais uma vez através de uma análise integrativa entre metodologias molecular e morfológica. Além disso, o avanço na proposição do uso da tecnologia de DNA-Barcoding neste grupo de espécies apresenta um potencial importante na resolução de uma das principais dificuldades dentro do estudo de Drosophilidae e de outros insetos, a identificação de imaturos e fêmeas. Através das sequências moleculares geradas neste trabalho e da sua associação às espécies já descritas ou às espécies novas, a identificação de drosofilídeos em diferentes estágios de desenvolvimento e de ambos os gêneros pode ser corretamente aprimorada, o que pode auxiliar nos estudos sobre a biologia de grupos crípticos e dificilmente mantidos em laboratório.

## REFERÊNCIAS

Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the revolution. **Italian Journal of Zoology**. v. 71, p. 5-16.

Bolzan AR. **DNA Barcode de Drosofilídeos Micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica***. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 2011. 86p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, Hajibabei M, Hebert PDN. 2010. Genitalia, DNA Barcodes, larval facies, and foodplants place the mimetic species *Neoxeniades molion* in *Rhinthon* (HESPERIIDAE: HESPERIINAE). **Journal of the Lepidopterists' Society** v. 64, p. 69–78

Chaves NB, Tidon R. 2008. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera: Drosophilidae) of the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.52, p. 340–348.

Cook LG, Edwards RD, Crisp MD, Hardy NB. 2010. Need morphology always be required for new species descriptions? **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 322–326.

Cordeiro AR. 1952. *Drosophila (Hirtodrosophila) caxiensis*, a new species of fungus-feeding fly from Brasil. **Dusenía**, v. 3, p. 303-308.

Costa-Lima A. 1937. Outras moscas cujas larvas são predadoras de Coccídeos. **Chácaras e Quintais**, v. 55, p. 179-182.

Courtney SP, Kibota TT, Singleton TA. 1990. Ecology of mushroom-feeding Drosophilidae. **Advances in Ecological Research**, v. 20, p. 225-274.

Culik MP, Ventura JA. 2009. New species of *Rhinoleucophenga*, a potential predator of pineapple mealybugs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 417-420.

Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407–415.

Da Lage JL, Dergoat GJ, Maczkowiak F, Silvain JF, Cariou ML, Lachaise D. 2007. A phylogeny of Drosophilidae using the Amyrel gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p.47-63.

Duda O. 1925. Die costaricanischen Drosophiliden des Ungarischen National-Museums Zu Budapest. **Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici**. v. 22, p. 149-229.

- Dobzhansky T, Pavan C. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, v. 36, p. 7-72.
- Ebach MC. 2011. Taxonomy and the DNA Barcoding Enterprise. **Zootaxa**, v. 2742, p. 67–68.
- Francoy TM, Grassi ML, Imperatriz-Fonseca VL, May-Itzá WJ, Quezada-Euán JJG. Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). **Apidologie**. V. 42, p. 499-577.
- Freire-Maia N, Pavan C. 1949. Introdução ao estudo da drosófila. **Cultus**, v. 1, p. 1-171.
- Frota-Pessoa O. 1945. Sobre o subgênero *Hirtodrosophila*, com descrição de uma nova espécie (Dipt., Drosophilidae, Drosophila). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 5, p. 469-483.
- Frota-Pessoa O. 1951. *Drosophila (Hirtodrosophila) magnarcus* n. sp. (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 11, p. 407-411.
- Garnier S, Magniez-Jannin F, Rasplus JY, Alibert P. 2005. When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. **Journal of Evolutionary Biology**. v. 18, p. 269–280
- Goldstein PZ, DeSalle R. 2010 Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **Bioessays**, v. 33, p. 135–147.
- Gottschalk MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Check List**, v.4, p. 485–518
- Grimaldi DA. 1987. Phylogenetics and taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 186, p. 103-268.
- Grimaldi D, Ervik F, Bernal, R. 2003. Two new Neotropical genera of Drosophilidae (Diptera) visiting palm flowers. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 76, p. 109-124.
- Hatadani LM, Klaczko LB. 2008. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction **Genetica**, v. 133, p. 335–342.
- Heed WB. 1977. A new cactus-feeding but soil-breeding species of drosophilia (Diptera: Drosophilidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 79, p. 649-654.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Jenzen DH, Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA Barcoding reveals cryptic species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astrartes fuligator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14812-14817.

Hernández-Triana LM, Crainey JL, Hall A, Fatih F, Mackenzie-Dodds J, Shelley AJ, Zhou X, POST RJ, Gregory TR, Hebert PDN. 2012. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: Simulium) and related taxa in the New World. **Zootaxa**, v. 3514: p. 43–69.

Hoag H. 2010. Confronting the biodiversity crisis. **Nature reports**, v. 4, p. 51-54.

Holynski RB. 2010. Taxonomy and the Mediocrity of DNA Barcoding – Some Remarks on PACKER et al. 2009: DNA Barcoding and the Mediocrity of Morphology. **Arthropod Systematics and Phylogeny**. v. 68, p. 143 – 150.

Hochmüller CJC, Lopes-da-Silva M, Valente VLS, Schmitz H J. 2010. The Drosophilid fauna (DIPTERA, DROSOPHILIDAE) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil: first records. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, p. 285-295.

Hsu TC. 1949. The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to systematics. **University of Texas Publication**, v. 4920, p. 80-142.

Hunter AS. 1992. Flower breeding Drosophila of Bogota, Colombia: New species (Diptera: Drosophilidae). **Pan-Pacific Entomologist**, v. 68, p. 192-199.

Jinbo U, Kato T, Ito M. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications. **Entomological Science**, v. 14, p. 107–124.

Kaneshiro KY. 1969. A study of the relationships of Hawaiian Drosophila species based on external male genitalia. **University of Texas Publication**, v. 6918, p. 55-70.

Kendall D. 1977. The diffusion of shape. **Advances in Applied Probability**, v. 9, p. 428-430.

Klingenberg CP, Gidaszewski NA. 2010. Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data. **Systematic Biology**. v. 59. 245-261.

Landin e Hingst-Zaher 2010 Brazil's biodiversity crisis. **ICOM News**. v.2, p. 14-15.

Medeiros HF, Klaczko LB. 2004. How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forest of São Paulo, Brazil? Species list of three forest remnants. **Biota Neotropica**, v. 4, p. 1-12.

- McEvey SF, Barker JSF. 2001. *Scaptodrosophila acinata*: A new Hibiscus flower- breeding species related to *S. hibisci* (Diptera: Drosophilidae). **Records of the Australian Museum** , v. 53, p. 255-262.
- Mourão CA, Gallo AJ, Bicudo HEMC. 1965. Sobre a sistemática de *Drosophila* no Brasil, com descrição de *D.mendeli* sp.n. e relação de espécies brasileiras de *Drosophila*. **Ciência e Cultura**, v. 17, p. 587-596.
- Monteiro LR, Reis SF. 1999. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Holos. 198p.
- O'Grady PM, Ashburner M, Castrezana S. et al. (2008) Comment. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 65, p. 141–144.
- O'Grady PM, Ashburner M, Castrezana S, DeSalle R, Kaneshiro KY, Lapoint RT, Magnacca KN, Markow TA, McAllister BF, Ruiz A, Vilela CR, Val FC. 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* (Insecta, Diptera). **Bulletin of Zoological Nomenclature** v. 65, p. 141-144.
- Okada TA. 1989. Proposal of Establishing Tribes for the Family Drosophilidae with Key to Tribes and Genera (Diptera). **Zoological Science**, v.6, p. 391-399.
- Page TJ, Hughes JM. 2011. Neither molecular nor morphological data have all the answers; with an example from *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from Australia. **Zootaxa**, v. 2874, p. 65–68.
- Pitnick S, Heed, WB. 1994. New Species of cactus-Breeding *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the Nannoptera Species Group. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 307-310.
- POWELL, J.R. 1997. **Progress and Prospects in Evolutionary Biology: the Drosophila Model**. Oxford University Press, New York.
- Raga A, Machado RA, Dinardo W, Strikis PC. 2006. Eficácia de atrativos alimentares na captura de moscas-das-frutas em pomar de citros. **Bragantia**, v.65, p.337-345.
- Remsen J, O'Grady PO. 2002. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae) with comments on combined analysis and character support. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 24, p. 249-264.
- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364.
- Rohlf FJ, Marcus LF. 1993. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 8, p. 129-132.

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

Roque F, Figueiredo R, Tidon R. 2006. Nine new records of drosophilids in the Brazilian savanna. **Drosophila Information Service**, v. 89, p. 14-17.

Russo CAM, Takezaki N, Nei M. 1995. Molecular phylogeny and divergence times of Drosophilid species. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p. 391-404.

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

Smith MA, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Deans AR, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN. 2008. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, 12359–12364.

Vaglia T, Haxaire J, Kitching IJ, Meusnier I, Rougerie R. 2008. Morphology and DNA barcoding reveal three cryptic species within the *Xylophanes neoptolemus* and *loelia* species-groups (Lepidoptera: Sphingidae). **Zootaxa**, v. 1923, p. 18-36.

Throckmorton, L.H., 1962. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. **University of Texas Publications**, v. 6205, p. 207-343.

Throckmorton, L.H., 1966. The relationships of the endemic Hawaiian Drosophilidae, University of Texas Publication, v. 6615, p. 335-396.

Tidon R, Leite DF, Ferreira LB, Leão BFD. 2005. Drosofilídeos (Diptera, Insecta) do Cerrado. In: Scariot A, Felfili J, Silva JCS (Org.). **Ecologia e Biodiversidade do Cerrado**. Ministério do Meio Ambiente, p. 337-352.

van der Linde K, Houle D. 2008. A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and closely related genera (Diptera, Drosophilidae). **Insect Systematics and Evolution**. v. 39, p. 241-267.

van der Linde e Yassin, 2010. A fly by any other name. **New scientist**, p. 24-25.

Yassin A. 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* (Insecta, Diptera). **Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 65, p. 96.

Yassin A, Da Lage JL, David JR, Kondo M, Madi-Ravazzi L, Prigent S, Toda MJ. 2010. Polyphyly of the *Zaprionus* genus group (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 335–339.