

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

**DNA *BARCODE* DE DROSOFILÍDEOS MICÓFAGOS
PERTENCENTES AOS GÊNEROS
*Hirtodrosophila, Mycodrosophila e Zygothrica***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andreza Ribeiro Bolzan

**Santa Maria, RS, Brasil.
2011.**

**DNA *BARCODE* DE DROSOFILÍDEOS MICÓFAGOS
PERTENCENTES AOS GÊNEROS**

Hirtodrosophila, Mycodrosophila e Zygothrica

Andreza Ribeiro Bolzan

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

Orientador (a): Dr^a Lizandra Jaqueline Robe
Co-Orientador: Dr^o Elgion Lúcio da Silva Loreto

Santa Maria, RS, Brasil.
2011.

**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

**DNA *BARCODE* DE DROSOFILÍDEOS MICÓFAGOS PERTENCENTES
AOS GÊNEROS *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica***

elaborada por
Andreza Ribeiro Bolzan

Como requisito parcial na obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas – Área Biodiversidade Animal

COMISSÃO EXAMINADORA

Lizandra Jaqueline Robe, Dr^a
(Presidente/Orientador)

Mônica Laner Blauth, Dr^a (Universidade Federal de Pelotas - RS)

Luciano Basso da Silva, Dr^o (Universidade Feevale - RS)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais (reais ou não) Ana Lúcia, Eustélia e Otávio (meus pais-avós) e Alessandro, por sempre me incentivarem aos estudos mesmo, as vezes, com dificuldades. Aos meus avós (ao meu legítimo pai eternas saudades) pelos ensinamentos da vida e à minha mãe pela busca incansável de uma vida melhor, saibas que conseguiu. Amo vocês.

À Maria Eduarda, minha irmã-afilhada, confesso que quando chegaste, no auge dos meus 17 anos, morri de ciúmes, mas hoje você é fundamental pra mim. A quem veio se agregando aos poucos, Agenor, Dejanir, Escobar, Greta e Luna, também o meu muito obrigada pelas horas de alegrias e apoio que vocês me deram.

Ao Jader, meu companheiro de todas as horas nos últimos sete anos, obrigada por me compreender, conhecer, amar e estar sempre comigo, em todos os momentos. Amo-te muito. Não posso esquecer-me de agradecer nosso filho (gato) Aquiles que sempre me esperou na porta de casa com um belo miado no rosto, isso me fazia esquecer os problemas da vida.

Aos meus colegas de convívio do LabDros (não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém) saibam que todos (de uma forma ou de outra) serão guardados com carinho, obrigada por entenderem minhas ausências e por proporcionarem ótimos dias de companhia no laboratório. A vida é mais fácil quando temos pessoas felizes ao nosso lado.

Aos meus colegas de convívio do Totem Vestibulares, obrigada por acreditarem em mim há oito anos, por entenderem minhas ausências quando necessário, e por compartilharem comigo a maior parte do tempo de suas vidas, vocês também tornam minha vida mais feliz.

Ao professor Elgion fico muito grata pela confiança e oportunidade de estar próxima de tantas pessoas legais, e também por me apresentar à minha amiga-confidente-orientadora Lizandra. Liz, muito obrigada pelo acompanhamento dado nestes dois anos de convívio, pelos ensinamentos (que foram muitos), pelos puxões de orelha (que não foram muitos e sim necessários), pelas risadas, pelas coletas, por acreditar que eu podia e por confiar em mim. Agradecerei-te sempre.

E a todos que participaram de alguma maneira deste trabalho (nas coletas, auxiliando um PCR, um gel, sequenciando amostras, purificando DNA...foram tantas coisas), meu grato agradecimento. Ele também é de vocês.

RESUMO

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

DNA *BARCODE* DE DROSOFILÍDEOS MICÓFAGOS PERTENCENTES AOS GÊNEROS *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* E *Zygothrica*

Autora: ANDREZA RIBEIRO BOLZAN
Orientadora: LIZANDRA JAQUELINE ROBE
Co-Orientador: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011.

A biodiversidade existente em nosso planeta é imensa e ainda está longe de ser conhecida. As técnicas utilizadas na identificação de espécies baseiam-se, muitas vezes, na morfologia dos espécimes, e sua descrição é um trabalho que demanda conhecimento e tempo, limitando-se à especialistas. Em contrapartida, com a intenção de ser uma ferramenta mais rápida e de fácil acesso, o DNA *Barcode* propõe o uso de uma sequência padronizada de DNA do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) com o objetivo de identificar espécimes a partir de espécies já descritas e descobrir novas espécies. Para sua efetividade, entretanto, é preciso que propriedades como o monofiletismo das sequências intraespecíficas e a existência de um *gap* entre as variações intra e interespecíficas sejam diagnosticadas. Neste trabalho, nós testamos a eficácia desta técnica para a identificação/descoberta de espécies de drosofilídeos micófagos dos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Os espécimes foram obtidos a partir de coletas realizadas na região Sul do Brasil, em especial, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, totalizando 10 pontos de coleta e 177 indivíduos. Após a identificação morfológica, o DNA total foi extraído e os genes COI (citocromo c oxidase subunidade I) e COII (citocromo c oxidase subunidade II) foram amplificados e sequenciados, obtendo-se 117 e 137 sequências, respectivamente, que foram posteriormente analisadas através de métodos fenéticos e filogenéticos. Um total de 33 diferentes morfotipos foi encontrado e, pelas coletas, pode-se perceber que os gêneros micófagos *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* são bem distribuídos na região Sul. Muitas espécies, inclusive, têm aqui seu primeiro registro de coleta para a região. As análises moleculares revelaram a existência de um *Barcode gap* entre as distâncias intra e interespecíficas, porém com a presença de sobreposição das distâncias interespecíficas congênicas e intergenéricas, propriedade que dificultam a clara delimitação dos gêneros, mas estimulam sua utilização para a designação das espécies. Os fenogramas/filogenias obtidos pelos algoritmos de Neighbor-Joining/Análise Bayesiana também mostraram que, a despeito da monofilia recíproca apresentada pelas diferentes espécies, os três gêneros apresentam-se polifiléticos dentro de Drosophilidae. Neste sentido, sugere-se aqui que a técnica seja efetiva na discriminação de espécies, mas não de gêneros diferentes. De fato, a aplicação da técnica de DNA *Barcode* para este grupo de organismos revelou a sua utilidade em auxiliar na discriminação entre espécies crípticas quando a análise de caracteres morfológicos não se faz precisa, principalmente pela existência exclusiva de fêmeas. Além disso, nossos dados demonstram a importância de agregar o DNA *Barcode* a dados de morfologia, o que pode auxiliar na delimitação ou até levar à diferenciação de prováveis espécies novas.

Palavras-chave: DNA *Barcode*. Drosofilídeos micófagos. Drosophilidae. *Hirtodrosophila*. *Mycodrosophila*. *Zygothrica*.

ABSTRACT

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

DNA *BARCODE* OF MICOPHAGOUS DROSOPHILIDS COMPRISING THE GENERA *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*

Autora: ANDREZA RIBEIRO BOLZAN
Orientador: LIZANDRA JAQUELINE ROBE
Co-Orientador: ELGION LÚCIO DA SILVA LORETO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011.

The biodiversity that exists in our planet is huge and far from being known. Most of the times the techniques that are used in species identification are based in the morphology of the specimens, and the description is a time-consuming work, that is limited to specialists. At contrast, DNA *Barcode* is intended to be a fast and accessible tool, which proposes the use of a standard DNA sequence encompassing the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, with the aim of identifying species from already described sequences and discovering new species. Nevertheless, its efficiency is based on the diagnosis of specific properties, as monophyly of the intraspecific sequences and the existence of a *Barcode* gap between intra and interspecific variation. In this study, we tested the efficacy of the DNA *Barcode* in the identification/discovery of mycophagous drosophilid species belonging to the genera *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* and *Zygothrica*. The specimens were collected throughout the southern Brazil, specially in the Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, which totalized 10 collection points and 177 individuals. After morphological identification, total DNA was extracted and the COI (cytochrome oxidase c subunit I) and COII (cytochrome oxidase c subunit II genes) were amplified and sequenced, holding a total of 117 and 137 sequences, respectively, which were analyzed through phenetic and phylogenetic methods. A total of 33 different morphotypes were encountered and, with the collections it was possible to realize that the mycophagous genera *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* and *Zygothrica* are well distributed throughout the Southern Brazilian Region. Furthermore, many species have here their first description for the sampled region. The molecular analyses revealed the existence of a *Barcode* gap between the intra and the interspecific distances, although there was an overlap between the interespecific congeneric and intergeneric variation, properties which hamper clear generic delimitation but stimulate DNA *Barcode* utilization for species designation. The phenograms/phylogenies obtained through the algorithms of Neighbor-Joining/Bayesian Inference also have shown that despite the reciprocal monophyly presented by the different species, the three genera were shown as polyphyletic within Drosophilidae. In this sense, we suggest here that the DNA *Barcode* technique is effective in the mycophagous species discrimination, but not in genera differentiation. In fact, the application of this technology for this group of species revealed straightforward utility in cryptic species discrimination when the analysis of morphological characters is not precise, mainly due to the exclusive existence of females. Moreover, our data show the importance of joining DNA *Barcode* with morphological data, which may help in the delimitation or even in the differentiation of likely new species.

Key-Words: DNA *Barcode*. Mycophagous drosophilids. Drosophilidae. *Hirtodrosophila*. *Mycodrosophila*. *Zygothrica*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

1. A técnica do DNA <i>Barcode</i>	07
1.1 O genoma mitocondrial.....	10
1.2 Vantagens e desvantagens.....	12
2. A família Drosophilidae	14
3. Objetivos.....	21

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

DNA <i>Barcode</i> de drosofilídeos micófagos: uma avaliação empírica dos potenciais de aplicação	22
Resumo	23
1. Introdução	24
2. Material e Métodos.....	26
3. Resultados	30
4. Discussão	49
Agradecimentos	52
Referências Bibliográficas	53

CAPÍTULO 3 – CONCLUSÕES

1. Conclusões finais.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. A técnica de DNA *Barcode*

A biodiversidade existente no planeta é extremamente variada, de micro-organismos até organismos superiores. Conhecer e compreender esta variação é um dos grandes desafios ao qual sistematas e taxônomos estão submetidos. Porém, é preocupante imaginar que toda esta diversidade está longe de ser totalmente conhecida, principalmente se considerarmos a grande velocidade com que as espécies vêm sendo extintas. A discriminação de espécies, entretanto, não é uma tarefa fácil, uma vez que os critérios de identificação utilizados ainda são basicamente morfológicos e o processo como um todo demanda tempo em aspectos como o treinamento na identificação de uma espécie ou de um dado grupo de organismos, a análise minuciosa de cada espécime, a publicação de descrições, etc. Estes aspectos acabam restringindo a possibilidade de determinação de espécies apenas a especialistas (Giangrande, 2003, Goldstein & DeSalle, 2010; de Carvalho et al., 2007). Sendo assim, como poucos taxonomistas podem operacionalmente identificar mais do que 0,01 % da estimativa de 10-15 milhões de espécies que habitam o nosso planeta, seriam requeridos cerca de 15.000 taxonomistas para identificar a vida caso fossem mantidas as técnicas de diagnóstico morfológico (Hebert et al., 2003a) e um tempo de em torno de 940 anos até que todas as espécies fossem descritas (Seberg et al., 2004).

Além do fator tempo, é importante destacar que a execução da taxonomia alfa por meio de técnicas baseadas no uso de caracteres morfológicos apresenta algumas importantes limitações (Hebert et al., 2003b; Valentini et al., 2008):

a) A presença de plasticidade fenotípica e a variabilidade dos caracteres empregados podem levar a identificações incorretas;

b) Táxons crípticos, comuns em muitos grupos e regiões (Hebert et al., 2004b; Yassin et al., 2008) são, muitas vezes, erroneamente agrupados;

c) Chaves morfológicas costumam ser eficazes para apenas alguns estágios do ciclo de vida e/ou para apenas um dos sexos;

d) Chaves dicotômicas geralmente requerem um grande nível de especialização e entendimento para sua correta aplicação, o que aumenta a frequência de erros associada ao processo de identificação.

Estes são os principais motivos pelos quais o uso de novas técnicas de identificação se faz necessário. Neste sentido, a tecnologia do DNA *Barcode*, vem sendo considerada a melhor solução para o problema da identificação de espécies quando seus caracteres morfológicos apresentam algumas limitações (Valentini et al., 2008; Packer et al., 2009).

A proposta do DNA *Barcode* foi formalizada por Hebert et al. (2003a), embora ainda antes disso diversos autores tenham realizado trabalhos de taxonomia com o uso de caracteres moleculares. Entretanto, o enfoque do DNA *Taxonomy* difere daquele apresentado pelo DNA *Barcode* (Goldstein & DeSalle, 2010; Hajibabaei et al., 2007, Tautz et al., 2003): enquanto este busca ligar as entidades genéticas reconhecidas através das sequências a espécies Linneanas, aquele não apresenta qualquer intenção neste sentido, sendo mais apropriado para grupos de organismos que não possuem um sistema taxonômico detalhado e atuando como uma ferramenta de investigação.

A técnica do DNA *Barcode* em animais baseia-se no uso de uma pequena sequência padronizada de aproximadamente 648 pares de bases do genoma mitocondrial (correspondente a uma região na extremidade 5' do gene citocromo c oxidase - COI), que segundo Hebert et al. (2003a) é capaz de distinguir indivíduos de diferentes espécies porque a variação genética entre espécies excede aquela apresentada dentro das espécies. Em outro estudo, Hebert et al. (2003b) demonstram que as divergências nas sequências de COI permitem a discriminação regular de espécies proximalmente relacionadas em todos os filos, com exceção de Cnidária. Posteriormente, Ratnasingham & Hebert (2007) estimaram, inclusive, que mais de 95% das espécies de diversos grupos animais têm apresentado padrões distintivos de sequências de COI.

A tecnologia do DNA *Barcode* agrupa dois objetivos diferentes e independentes (Hebert et al, 2003a): (1) identificar e designar espécimes desconhecidos a espécies previamente descritas; (2) facilitar a descoberta e o diagnóstico de novas espécies, auxiliando a desvendar a diversidade críptica. Para tanto, um banco de dados (Barcode of Life Data Systems – BOLD – www.barcodeoflife.org) vem sendo desenvolvido para servir como um repositório de sequências e como uma plataforma de bioinformática que suporta todas as fases

do processo analítico-comparativo de análise de novas sequências com base em sequências prévias (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Durante o processo de implementação do DNA *Barcode*, diferentes requerimentos são necessários. No processo de identificação de espécimes, a amostra a ser identificada será posicionada em uma filogenia previamente caracterizada, e receberá a identidade do clado no qual será agrupada. Assim, para que a designação de espécimes seja efetiva, o grupo precisa apenas ser monofilético (Whitworth et al., 2007), como demonstrado para a cigarrinha *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Cercopidae) (Seabra et al., 2010), para *Aedes aegypti* e *Anopheles* (Meier et al., 2006), para espécies do gênero *Schistocerca* (Yassin et al., 2009) e para moluscos gastrópodes (Remigio & Hebert, 2003). Entretanto, muitos trabalhos vêm apresentando evidências de que uma grande quantidade de espécies não são monofiléticas (Crisp e Chandler, 1996; Funk e Omland, 2003).

Para a descoberta de novas espécies, por outro lado, um limiar é escolhido para separar a variação intraespecífica daquela interespecífica, de modo que, se a amostra a ser identificada diferir das demais por um valor superior ao limiar, ela será considerada uma nova espécie. Desta forma, a descoberta acurada de espécies requer, além da existência de monofilia para um grupo de indivíduos, uma ausência de sobreposição, ou seja, a presença de um *gap*, entre a variação intra e interespecífica (Whitworth et al., 2007). Neste caso, para insetos, Hebert et al. (2003a) propuseram a utilização de um limiar de 3%. Em outro artigo (Hebert et al. 2004a), entretanto, os autores propõem a utilização de um limiar igual a dez vezes a variação intraespecífica média. Atualmente, a tendência é obter um limiar específico para cada grupo (por exemplo, Lefébure et al., 2006 e Costa et al., 2007 para Crustáceos) e, segundo Yassin et al. (2010), não há um limite único de distância que possa ser utilizado no processo de identificação de espécies pelo menos para drosofilídeos. Em muitos casos, o uso do limiar torna-se difícil em função da sobreposição das variações intra e interespecíficas, como ocorreu com moluscos (Meyer & Paulay, 2005) e pode ocorrer comumente se os táxons analisados são intimamente relacionados (Moritz & Cícero, 2004). Para Meier et al. (2006), o uso do gene mitocondrial COI não é uma boa ferramenta na identificação de espécies, especialmente para dípteros, uma vez que seus dados mostraram uma grande sobreposição na variação intra e interespecífica com 99% de suas amostras congênicas inserindo-se num intervalo de 0% a 15,5% de distância. Entretanto, em muitos trabalhos como Hebert et al. (2004b) para lepidópteros, Yassin et al. (2008) para dípteros e Yassin et al. (2009) para

ortópteros, a utilização do fragmento de COI foi eficiente na identificação de espécies crípticas.

Além disso, para que a técnica do DNA *Barcode* possa ser implementada com sucesso no processo de identificação de espécies, alguns requisitos são necessários, como, por exemplo, a existência de um banco de dados de referência com sequências fidedignas armazenadas para fins de comparação, uma padronização da técnica, e a adoção de um limiar que se justifique e seja aplicável na delimitação das espécies, permitindo refutar ou aceitar um dado taxonômico (Yassin et al., 2010).

1.1. O genoma mitocondrial

O genoma mitocondrial humano é circular com um tamanho de 16.569 pares de bases, tendo sido completamente sequenciado por Anderson et al. (1981). O mesmo autor ainda designou a cada um dos genes mitocondriais suas funções e seus produtos gênicos, demonstrando a presença de 13 genes codificadores de proteínas, 2 genes de rRNAs e 22 genes de tRNA, como representado na Figura 1. Sabe-se, atualmente, que este mesmo conjunto de 37 genes, em geral sem íntrons, é comum ao genoma mitocondrial de diferentes espécies animais, apresentando uma ordem excepcionalmente bem conservada dentro de cada filo (Lang et al., 1999).

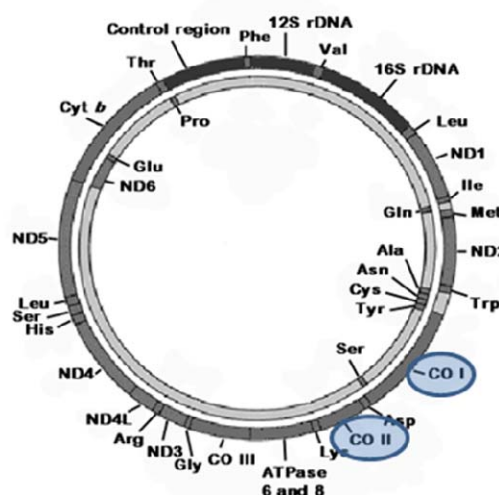


Figura 1: Representação esquemática da organização circular do genoma mitocondrial demonstrando a localização dos genes das proteínas citocromo c oxidase I (COI) e citocromo c oxidase II (COII) em vertebrados de acordo com Pereira (2000).

A escolha de um marcador mitocondrial vem sendo amplamente empregada em estudos filogenéticos de diversas espécies animais, uma vez que o mesmo evolui mais rapidamente que o DNA nuclear, de modo a acumular um maior número de diferenças, de 5 a 10 vezes mais que genes nucleares (Stoeckle et al., 2005), sendo informativo mesmo quando espécies próximas são comparadas (Hebert et al., 2004b).

Além disso, a ampla utilização do genoma mitocondrial pode ser explicada por outras de suas propriedades (Hurst & Jiggins, 2005; Roe & Sperling, 2007): o DNA mitocondrial é haploide e apresenta herança materna nos animais; tem recombinação gênica limitada; é mais resistente à degradação; apresenta regiões altamente conservadas, como as regiões de genes ribossomais (Stoeckle et al., 2005), o que possibilita a construção de primers mais robustos; além disso, regiões mitocondriais costumam ser fáceis de amplificar e não necessitam de processos de clonagem pré-sequenciamento. Outro motivo frequentemente apontado refere-se ao fato de que o tamanho efetivo populacional do genoma mitocondrial é cerca de um quarto do genoma nuclear, o que está intimamente relacionado com o seu menor tempo de coalescência (Whitworth et al., 2007). Além disso, Hebert et al. (2003b) defendem que, possivelmente, sequências de DNA mitocondrial apresentem restrições nas taxas intraespecíficas de divergência, o que é um fator crítico para o diagnóstico de espécies. Segundo estes autores, existem evidências de interações entre os produtos gênicos codificados pelo núcleo e pela mitocôndria, de forma que “varreduras seletivas” atuariam regularmente no sentido de aperfeiçoar o equilíbrio destas. Isto acabaria reduzindo os efeitos de polimorfismos ancestrais e introgressões.

Quanto à escolha de COI, Hebert et al. (2003a) destacaram que regiões codificadoras não apresentam o desafio dos *indels* (inserções e deleções), que dificultam o alinhamento, além de que, dentre os genes codificadores mitocondriais, COI é o que possui primers universais mais robustos e menores taxas evolutivas, apresentando taxas evolutivas rápidas o bastante nas terceiras posições de seus códons, de modo a discriminar espécies próximas, mas lentas o bastante em nível de aminoácidos, de modo a manter o sinal mesmo em níveis filogenéticos maiores. Além disso, há que se destacar que, pelo menos em animais, COI apresentava o maior número de sequências então disponíveis (Hajibabaei et al., 2007).

É preciso considerar, entretanto, que introgressões de DNA mitocondrial podem ocorrer em função da hibridização entre espécies, especialmente na presença de bactérias endossombiontes, como *Wolbachia*, que são transmitidas por fêmeas infectadas à sua prole

(Whitworth et al., 2007). A infecção de insetos por *Wolbachia* também pode ser resultado de transmissão horizontal, conforme sugerido por Werren et al. (1995) e Baldo et al. (2006). Estima-se que entre 15-75% das espécies de insetos estejam infectadas com *Wolbachia* (Werren et al., 1995). Em drosofilídeos, Stahlhut et al. (2010) estimaram que a infecção por *Wolbachia* entre espécies de regiões geográficas diferentes não apresenta grande variação; por exemplo, espécies infectadas das regiões Neártica, Neotropical e Paleártica não apresentavam grandes diferenças no supergrupo de infectantes quando comparadas a espécimes da mesma área geográfica. No mesmo trabalho, entretanto, a grande semelhança das cepas de *Wolbachia* entre moscas micófagas comparadas com não micófagas é enfatizada.

Muitos trabalhos que envolvem estudos de relações filogenéticas entre diversos grupos de organismos também são realizados utilizando sequências do gene mitocondrial COII (Maekawa et al., 1999; Caterino et al., 2000; Ohno et al., 2006; Sena et al., 2002). Neste trabalho, a utilização deste gene dá-se com o objetivo de auxiliar na identificação de artefatos derivados da amplificação de Numt's de COI como proposto por Linares et al. (2009) e revelar algumas dessas relações também como uma forma de amplificar o sinal filogenético sobre o ruído produzido por saturação (Remsen & DeSalle, 1998).

1.2. Vantagens e desvantagens

A tecnologia do DNA *Barcode* é especialmente promissora, dadas algumas circunstâncias (Emery et al., 2009; Hajibabaei et al., 2007; Herre, 2006; Packer et al., 2009; Valentini et al., 2008):

- a) pode identificar espécies a partir de pequenos fragmentos de tecido, uma vez que o DNA mitocondrial está disponível em maior quantidade, e é mais resistente à degradação;
- b) funciona com os diferentes estágios ao longo do ciclo de vida dos organismos, e mesmo com os diferentes sexos, o que não é comum na taxonomia morfológica (Miller et al., 2005; Webb et al., 2006);
- c) permite a identificação, inclusive, da origem de fezes e urina;
- d) permite o monitoramento do comércio ilegal de animais silvestres, bem como a identificação rápida de espécies exóticas;

- e) auxilia na reconstrução de cenários paleoecológicos e evolutivos, ao possibilitar a identificação de espécimes fósseis;
- f) diferencia espécies crípticas, indistinguíveis morfologicamente (Yassin et al., 2008; Burms et al., 2007 e 2010, Goldstein & DeSalle, 2010);
- g) é robusto à ocorrência de plasticidade fenotípica, uma vez que a sequência é única, sem possibilidades de alteração mediante efeito ambiental;
- h) reduz ambiguidades, uma vez que sua descrição é objetiva e única, não sujeita a alterações devidas a diferentes interpretações;
- i) proporciona novas ferramentas para a descoberta da diversidade desconhecida;
- j) democratiza o acesso, pois os dados serão depositados em uma biblioteca online de acesso fácil e irrestrito;
- k) uma vez implementada em larga escala, após segura avaliação de sua eficácia, o DNA *Barcode* disponibiliza os taxonomistas para outras tarefas, como por exemplo, a descrição e avaliação de novas espécies propostas com base em DNA *Barcode*, a análise evolutiva e ecológica dos caracteres taxonômicos empregados, etc.; e ainda permite a incorporação das sequências obtidas em estudos posteriores, principalmente aqueles de âmbito filogenético e filogeográfico.

Por outro lado, o DNA *Barcode* também apresenta algumas restrições, tais como (Moritz & Cícero, 2004; Packer et al., 2009; Whitworth et al, 2007):

- a) retenção de polimorfismo ancestral, fator especialmente grave quando espécies próximas são avaliadas;
- b) em determinadas populações a migração pode ser unilateral, de forma que, por exemplo, se apenas os machos migrarem, poderá haver diferenciação em nível de DNA mitocondrial mesmo na ausência de uma estruturação simétrica;
- c) seleção em pelo menos um ou alguns sítios do DNA mitocondrial, ou até mesmo em outro DNA maternalmente herdado, pode afetar os resultados encontrados devido ao desequilíbrio de ligação;
- d) introgressão devido à hibridação entre espécies;

- e) paralogia resultante de cópias nucleares, que podem ser co-amplificadas, ou até mesmo apresentar uma amplificação preferencial;
- f) negligência de espécies novas, que divergiram recentemente, e ainda não acumularam maiores níveis de diferenciação;
- e) casos em que as variações intra e interespecífica se sobrepõem ou em que as espécies não são monofiléticas devido a peculiaridades no seu processo de especiação (Yassin et al., 2010).

2. A família Drosophilidae

Drosophilidae é apenas uma das mais de 150 famílias que compõem a ordem Diptera (Yeates & Wiegmann, 1999), mas encontra-se entre as mais diversas e amplamente distribuídas. Algumas espécies são endêmicas, enquanto outras são cosmopolitas, podendo apresentar dispersão muitas vezes associada às atividades humanas (van der Linde et al., 2010). Dentro dos ecossistemas, drosofilídeos desempenham um papel fundamental nas cadeias alimentares saprofíticas, uma vez que seus estágios imaturos alimentam-se de organismos fermentadores. Além disso, é importante destacar que desde os tempos de Morgan e seus colaboradores, diversas espécies de Drosophilidae tem se constituído em organismos-modelo ideais para os mais diferentes estudos evolutivos (Markow & O'Grady, 2007).

Drosophilidae apresenta mais de 4.100 espécies descritas, distribuídas em 76 gêneros (Bächli, 2011). Estes gêneros subdividem-se em duas subfamílias: Steganinae, que apresenta 28 gêneros; e Drosophilinae, que perfaz outros 47 gêneros (Quadro 1). Drosophilidae apresenta uma taxonomia complexa, com alguns táxons não reconhecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, como complexos e semiespécies.

Segundo Gottschalk et al. (2008), existem 304 espécies de Drosophilidae descritas para o Brasil, sendo que a maioria destas pertence ao gênero *Drosophila* (cerca de 180 espécies). Outros gêneros estão presentes, entretanto, em menor frequência, como por exemplo: *Zygothrica* com 54 espécies descritas para o Brasil, *Hirtodrosophila* com 16, *Leucophenga* com seis espécies, e *Mycodrosophila* com três espécies descritas para o nosso país.

Neste aspecto, é, entretanto, necessário ressaltar que estes números refletem uma provável subestimativa. Gottschalk et al. (2008) demonstram que os estudos com

Drosophilidae conduzidos no Brasil concentram-se amplamente nas regiões Sul e Sudeste do país. Mesmo nessas regiões, entretanto, o gênero *Drosophila* apresenta um amplo destaque frente aos demais, sendo que a amostragem dos demais gêneros em comparação a *Drosophila* é pelo menos duas vezes menor em todos os estados com exceção do Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Rondônia. Estas tendenciosidades amostrais também refletem a estratégia de coleta utilizada pelos pesquisadores, já que na maior parte das coletas, são utilizadas iscas de banana para atrair as moscas, o que recupera, preferencialmente, espécies de *Drosophila* (Döge et al., 2007). Neste sentido, em concordância com Val et al. (1981), Gottschalk et al. (2008) demonstram que a maior parte dos gêneros de Drosophilidae não tem recebido a merecida atenção por parte da comunidade científica.

Quadro 1. Classificação de 75 dos 76 gêneros pertencentes à família Drosophilidae em suas respectivas subfamílias [Obtido a partir de Toda (2007) e Bächli (2011)]. O número de espécies apresentado por cada táxon encontra-se indicado entre parênteses.

Gêneros da subfamília Steganinae	Gêneros da subfamília Drosophilinae	
1- <i>Acletoxenus</i> (4)	29- <i>Baeodrosophila</i> (5)	57- <i>Neotanygastrella</i> (18)
2- <i>Allopygaea</i> (3)	30- <i>Balara</i> (1)	58- <i>Palmomyia</i> (1)
3- <i>Amiota</i> (116)	31- <i>Bialba</i> (1)	59- <i>Palmophila</i> (2)
4- <i>Apenthecia</i> (12)	32- <i>Calodrosophila</i> (1)	60- <i>Paraliodrosophila</i> (4)
5- <i>Apsiphortica</i> (2)	33- <i>Celidosoma</i> (1)	61- <i>Paramycodrosophila</i> (16)
6- <i>Cacoxenus</i> (35)	34- <i>Chymomyza</i> (56)	62- <i>Phorticella</i> (11)
7- <i>Crincosia</i> (3)	35- <i>Cladochaeta</i> (124)	63- <i>Poliocephala</i> (1)
8- <i>Electrophortica</i> (1)	36- <i>Collesia</i> (5)	64- <i>Protochymomyza</i> (1)
9- <i>Eostegana</i> (13)	37- <i>Colocasiomyia</i> (26)	65- <i>Samoia</i> (7)
10- <i>Erima</i> (1)	38- <i>Dettopsomyia</i> (13)	66- <i>Scaptodrosophila</i> (279)
11- <i>Gitona</i> (15)	39- <i>Diathoneura</i> (39)	67- <i>Scaptomyza</i> (263)
12- <i>Hyalistata</i> (6)	40- <i>Dichaetophora</i> (61)	68- <i>Sphaerogastrella</i> (10)
13- <i>Leucophenga</i> (205)	41- <i>Dicladochaeta</i> (1)	69- <i>Sphyrnoceps</i> (1)
14- <i>Luzonimyia</i> (4)	42- <i>Drosophila</i> (1.149)	70- <i>Styloptera</i> (10)
15- <i>Mayagueza</i> (1)	43- <i>Hirtodrosophila</i> (158)	71- <i>Tambourella</i> (3)
16- <i>Paraleucophenga</i> (8)	44- <i>Hypselothyrea</i> (30)	72- <i>Zaprionus</i> (56)
17- <i>Paraphortica</i> (1)	45- <i>Idiomyia</i> (379)	73- <i>Zapriothrica</i> (5)
18- <i>Pararhinoleucophenga</i> (2)	46- <i>Jeannelopsis</i> (3)	74- <i>Zaropunis</i> (1)
19- <i>Parastegana</i> (3)	47- <i>Laccodrosophila</i> (5)	75- <i>Zygothrica</i> (124)
20- <i>Phortica</i> (97)	48- <i>Liodrosophila</i> (64)	

21- <i>Pseudiasata</i> (6)	49- <i>Lissocephala</i> (32)	
22- <i>Pseudocacoxenus</i> (1)	50- <i>Lordiphosa</i> (58)	
23- <i>Pseudostegana</i> (33)	51- <i>Marquesia</i> (2)	
24- <i>Pyrgometopa</i> (1)	52- <i>Microdrosophila</i> (77)	
25- <i>Rhinoleucophenga</i> (18)	53- <i>Miomyia</i> (1)	
26- <i>Soederbomia</i> (1)	54- <i>Mulgravea</i> (14)	
27- <i>Stegana</i> (119)	55- <i>Mycodrosophila</i> (118)	
28- <i>Trachyleucophenga</i> (1)	56- <i>Neorhinoleucophenga</i> (2)	

Obs.: O gênero monoespecífico *Apacrochaeta* não foi incluído nesta Tabela, uma vez que sua localização não foi determinada.

Além das frutas, entretanto, muitos outros substratos são utilizados pelos drosofilídeos como sítios de oviposição, desenvolvimento, corte e/ou alimentação. Entre estes, podemos destacar as flores e os fungos, sendo que grupos com ecologia embasada nestes últimos encontram-se, certamente, entre as maiores sub-representações. Entre as espécies micófagas que ocorrem no Brasil, são especialmente frequentes aquelas pertencentes aos gêneros *Leucophenga*, *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* (Gottschalk et al., 2008). O gênero *Leucophenga* é o maior da subfamília Steganinae, apresentando 205 espécies descritas (Bächli, 2011), e habitando, predominantemente, regiões tropicais e subtropicais ao longo da Terra (Wheeler, 1981). Os outros três gêneros micófagos mencionados pertencem todos à subfamília Drosophilinae:

- O gênero *Hirtodrosophila* é cosmopolita, e tem sua diversidade concentrada ao longo dos trópicos, onde apresenta 158 espécies descritas (Bächli, 2011). Apresenta 16 espécies descritas para o Brasil (Tabela 1) conforme Gottschalk et al. (2008).

Tabela 1. Lista de espécies pertencentes à *Hirtodrosophila* já coletadas no Brasil, com seu respectivo estado de coleta/grupo.

Grupo	Espécies	Locais de coleta no Brasil (estados)
<i>hirticornis</i>	<i>H. gilva</i> (Burla, 1956)	RJ
	<i>H. mendeli</i> (Mourão, Gallo e Bicudo, 1965)	SP
	<i>H. morgani</i> (Mourão, Gallo e Bicudo, 1967)	SP
	<i>H. subgilva</i> (Burla, 1956)	RJ

<i>thoracis</i>	<i>H. clypitata</i> (Grimaldi, 1987)	RJ, SP
	<i>H. pleurostrigata</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>H. thoracis</i> (Williston, 1896)	RJ
	<i>H. strigocula</i> (Burla, 1956)	BA
<i>magnarcus</i>	<i>H. levigata</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>H. magnarcus</i> (Frota-Pessoa, 1951)	RS, RJ, SP
n.d.*	<i>H. gavea</i> (Vilela & Bächli, 2005)	RJ
	<i>H. jordanensis</i> (Frota-Pessoa, 1945)	SP
	<i>H. minuscula</i> (Vilela & Bächli, 2005)	RJ
	<i>H. pictiventris</i> (Duda, 1925)	PA
	<i>H. ramulosa</i> (Burla, 1956)	RJ
	<i>H. subflavohalterada</i> (Burla, 1956)	RJ

Nota: *n.d. indica a ausência de designação.

- O gênero *Mycodrosophila* apresenta 118 espécies descritas (Bächli, 2011) e está provavelmente relacionado à *Hirtodrosophila* (Throckmorton, 1975; van der Linde et al., 2010). Na Tabela 2, estão apresentadas as três espécies descritas para o Brasil conforme Gottschalk et al. (2008).

Tabela 2. Lista de espécies pertencentes à *Mycodrosophila* já coletadas no Brasil, com seu respectivo estado de coleta.

Espécies	Locais de coleta no Brasil (estados)
<i>M. brunnescens</i> (Wheeler & Takada, 1963)	PA
<i>M. elegans</i> (Wheeler & Takada, 1963)	PA
<i>M. projectans</i> (Sturtevant, 1916)	MT

- O gênero *Zygothrica* contém 124 espécies descritas (Bächli, 2011) e compreende espécies predominantemente micófagas e algumas associadas a flores (Grimaldi, 1987), como manacá (Frota-Pessoa, 1954) e *Cestrum parquii* (Sepel et al., 2000). Estas espécies apresentam hábitos florestais e alta sensibilidade às flutuações de fatores abióticos (Parsons, 1991). Até 1980, este gênero era considerado exclusivamente Neotropical (Burla, 1956), mas posteriormente novas espécies foram descobertas na África e na Ilha de Samoa (Gottschalk et

al., 2008). *Zygothrica* apresenta 54 espécies descritas para o Brasil conforme Gottschalk et al. (2008) demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de espécies pertencentes à *Zygothrica* já coletadas no Brasil, com seu respectivo estado de coleta.

Grupo	Espécie	Locais de coleta no Brasil (estados)
<i>atriangula</i>	<i>Z. atriangula</i> (Duda, 1927)	PA, RJ, SP
	<i>Z. parapoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. paraptilialis</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. poeyi</i> (Sturtevant, 1921)	RJ, SC
	<i>Z. subcandens</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. virgatinigra</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
<i>bilineata</i>	<i>Z. bilineata</i> (Williston, 1896)	MT, PA, PR, RJ, RO, RS, SC, SP
<i>candens</i>	<i>Z. candens</i> (Burla, 1956)	PA
<i>dispar</i> (subgrupo <i>aldrichi</i>)	<i>Z. aldrichi</i> (Sturtevant, 1920)	PA
	<i>Z. joeyesco</i> (Grimaldi, 1987)	RO
	<i>Z. mediovitta</i> (Grimaldi, 1987)	PA
	<i>Z. microeristes</i> (Grimaldi, 1987)	AM, ES, PA, MT, RO
	<i>Z. neoaldrichi</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>Z. nigropleura</i> (Grimaldi, 1987)	SC, SP
	<i>Z. paraldrichi</i> (Burla, 1956)	AM, PA, RJ, RO, SP
	<i>Z. pilipes</i> (Hendel, 1936)	AM, AP, PA, RO
	<i>Z. radialis</i> (Grimaldi, 1987)	PA
	<i>Z. somatia</i> (Grimaldi, 1987)	PA
	<i>Z. zygia</i> (Grimaldi, 1987)	AM, PA, RO
	<i>dispar</i> (subgrupo <i>caudata</i>)	<i>Z. caudata</i> (Hendel, 1913)
<i>Z. laticeps</i> (Burla, 1954)		RJ, SP
<i>dispar</i> (subgrupo <i>dispar</i>)	<i>Z. dispar</i> (Wiedemann, 1830)	ES, PA, PI, RJ, SC, SP
	<i>Z. prodispar</i> (Duda, 1925)	BA, MT, PA, PI, RJ, SC, SP
<i>fuscina</i>	<i>Z. fuscina</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. venustipoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
<i>hypandriata</i>	<i>Z. hypandriata</i> (Burla, 1956)	RJ, SC, SP
	<i>Z. lanceolata</i> (Burla, 1956)	SC, SP

	<i>Z. spiculirostris</i> (Burla, 1956)	SP
<i>orbitalis</i>	<i>Z. orbitalis</i> (Sturtevant, 1916)	PA, RJ, SC, SP
<i>virgatalba</i>	<i>Z. virgatalba</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
<i>vittimaculosa</i>	<i>Z. sectipoeyi</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>Z. vitticlara</i> (Burla, 1956)	RJ
	<i>Z. vittimaculosa</i> (Burla, 1956)	RS, SC, SP
	<i>Z. vittinubila</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>Z. vittipunctata</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. zygopoeyi</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
<i>vittatifrons</i>	<i>Z. vittatifrons</i> (Williston, 1896)	Desconhecido
	<i>Z. vittimarginata</i> (Burla, 1956)	SP
n.d.*	<i>Z. apopoeyi</i> (Burla, 1956)	SC, SP
	<i>Z. clavipoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. festiva</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>Z. gracilipoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. laevifrons</i> (Duda, 1927)	PA
	<i>Z. laeviventris</i> (Duda, 1927)	Desconhecido
	<i>Z. mesopoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. pallidipoeyi</i> (Burla, 1956)	RJ, SP
	<i>Z. palpipoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. parvipoeyi</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. ptilialis</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. vittimarmorata</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. vittinotialis</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. vittipoecila</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. vittisecta</i> (Burla, 1956)	SP
	<i>Z. vittivirgata</i> (Burla, 1956)	SP

Nota: *nd: indica ausência de designação.

Durante os últimos anos, diferentes trabalhos têm auxiliado no esclarecimento da história associada à evolução de diversas espécies e grupos de Drosophilidae (Yotoko et al., 2003, Robe et al., 2002, 2005, 2010 a, b e c; van der Linde et al, 2008 e 2010; Mota et al., 2008; Hatadani et al., 2010, Cenzi de Ré et al., 2010). Alguns destes estudos adicionaram suporte à hipótese de parafilia de *Drosophila* com relação a outros gêneros de Drosophilidae,

tais como *Hirtodrosophila*, *Liodrosophila*, *Samoaia*, *Scaptomyza* e *Zaprionus* (Robe et al., 2005 e 2010a). A confiança no status parafilético de *Drosophila*, associada à tentativa de preservação da nomenclatura da espécie-modelo *Drosophila melanogaster*, motivaram a elaboração de uma petição junto ao Comitê Internacional de Nomenclatura Zoológica no sentido de redesignar esta como a espécie tipo do seu gênero (van der Linde et al., 2007). O caso foi recentemente recusado, mas antes disso, diversos pesquisadores manifestaram-se contra qualquer alteração taxonômica, dada a insuficiência de estudos mais inclusivos, que avaliem o posicionamento filogenético de outras espécies e gêneros frente aos membros de *Drosophila* (McEvey et al., 2008).

Dentro deste cenário de tendenciosidades e incompreensões, pouco se sabe a respeito da evolução das espécies de Drosophilidae que colonizam corpos de frutificação de fungos. De acordo com Throckmorton et al. (1975), adaptações para micofagia devem ter surgido mais de uma vez ao longo da evolução de Drosophilidae. Assim, algumas espécies de *Drosophila* [especialmente aquelas pertencentes aos grupos *pinicola*, *quinaria*, *testaceae* e *tripunctata* (Markow & O'Grady, 2005)], de *Leucophenga* e de *Scaptomyza* parecem ter adquirido hábitos micófagos independentemente (Courtney et al., 1990). Entretanto, considera-se que a micofagia pode representar uma sinapomorfia para as espécies pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, agrupadas junto ao grupo genérico *Zygothrica* por Grimaldi (1990).

Throckmorton et al. (1975) situou os gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* dentro do gênero *Drosophila*, como uma ramificação da radiação *immigrans-Hirtodrosophila*. Segundo Grimaldi (1990) e Remsen & O'Grady (2002), entretanto, as espécies situadas no grupo genérico *Zygothrica* constituem uma ramificação basal da subfamília Drosophilinae. Embora estudos incluindo os três gêneros mencionados tenham escasseado desde então, *Hirtodrosophila* vêm sendo apresentada como uma das primeiras linhagens a divergir depois do subgênero *Sophophora* (Remsen & DeSalle, 1998; Tatarenkov et al., 1999 e 2001), ou até mesmo como um táxon próximo aos membros da radiação *immigrans-tripunctata* (Kwiatowski & Ayala, 1999). Além disso, mais recentemente, van der Linde et al. (2010) apresentaram os gêneros *Hirtodrosophila* e *Mycodrosophila* como irmãos, de forma a constituir uma ramificação basal à radiação *imigrans-tripunctata*.

3. Objetivos

Dado o conjunto de circunstâncias mencionadas, a presente dissertação apresenta o objetivo geral de contribuir para a compreensão e o estabelecimento de aspectos taxonômicos e evolutivos de gêneros pouco conhecidos de Drosophilidae, ecologicamente associados a fungos, como *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, pelo delineamento dos seguintes objetivos específicos:

- Identificar espécies de drosofilídeos associados a fungos em diferentes pontos da região do sul do Brasil, mais especificamente nos estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina;
- Testar a utilidade da tecnologia de DNA *Barcode* para identificação destas espécies bem como para descoberta e alocação de novas espécies;
- Auxiliar na resolução de algumas questões relacionadas à história evolutiva do grupo genérico *Zygothrica*, principalmente no que se refere às relações filogenéticas interespecíficas.

CAPÍTULO II – ARTIGO

Trabalho a ser submetido ao periódico
“Molecular Phylogenetics and Evolution”

DNA *Barcode* de drosofilídeos micófagos: uma avaliação empírica dos potenciais de aplicação

Andreza Ribeiro Bolzan¹, Pedro Fonseca², Marco Silva Gottschalk³,
Elgion Lúcio da Silva Loreto¹, Lizandra Jaqueline Robe¹

1 – Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

2 – Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

3 – Laboratório de Entomologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

RESUMO

A técnica de DNA *Barcode* propõe o uso de uma sequência padronizada de DNA de 648 pb do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) com o objetivo de identificar espécimes a partir de espécies já descritas e descobrir novas espécies, o que pode ser particularmente importante em grupos de espécies menos conhecidos/estudados, como é o caso dos drosofilídeos micófagos. Para sua efetividade, entretanto, a técnica de DNA *Barcode* requer a aplicação de algumas propriedades como o monofiletismo das sequências intraespecíficas e a existência de um *gap* entre as variações intra e interespecíficas. É, pois, importante que a eficácia da abordagem do DNA *Barcode* seja testada individualmente em cada grupo taxonômico antes da sua efetiva utilização, e o nosso objetivo é testar a aplicabilidade desta metodologia para drosofilídeos micófagos dos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Para tanto, foram realizadas coletas em 10 diferentes pontos da região Sul do Brasil, o que permitiu a amostragem de 177 indivíduos. Após a identificação morfológica, o DNA total da maior parte destes espécimes foi extraído e os genes COI (citocromo c oxidase subunidade I) e COII (citocromo c oxidase subunidade II), foram amplificados e sequenciados, obtendo-se um total de 117 e 137 sequências, respectivamente. Estas sequências foram analisadas segundo métodos fenéticos e filogenéticos, sendo que ambos apresentaram resultados similares e equivalentes, tanto no que se refere à designação de espécies quanto no que diz respeito à designação de gêneros. Neste sentido, as análises das distâncias nucleotídicas obtidas segundo o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) evidenciaram a existência de um *Barcode gap* entre as distâncias intra e interespecíficas, porém revelaram uma sobreposição das distâncias interespecíficas congênicas e intergenéricas dificultando a delimitação genérica. A busca por um limiar que auxilie na diferenciação da variação intra e interespecífica para este grupo, revelou que uma otimização da metodologia pode ser obtida pelo uso do valor referente a dez vezes a média da variação intraespecífica, uma vez que esse apresenta menores índices de falsos-positivos e/ou falsos-negativos para nosso conjunto de dados. Também os fenogramas/filogenias obtidos de acordo com o algoritmo de Neighbor-Joining/Análise Bayesiana mostraram que, com exceção de *M. dimidiata*, todas as espécies amostradas são reciprocamente monofiléticas, embora os três gêneros apresentem-se polifiléticos dentro de Drosophilidae. A efetividade da técnica de DNA *Barcode* na identificação destas espécies pode ainda ser comprovada pela sua utilização na discriminação entre espécies crípticas (como ocorreu, por exemplo, para *Hirtodrosophila subgilva*, *H. mendeli* e *H. levigata*) e na sugestão de dez prováveis espécies novas, quando a análise de caracteres morfológicos não se fez precisa devido à existência apenas de indivíduos fêmeas. Além disso, os métodos utilizados também permitiram a confirmação da diferenciação ou até mesmo a discriminação inicial de MOTU's morfolologicamente muito similares, o que confirma sua importância na descoberta de níveis crípticos de biodiversidade.

Palavras-chave: DNA *Barcode*. Drosofilídeos micófagos. Drosophilidae. *Hirtodrosophila*. *Mycodrosophila*. *Zygothrica*.

1. INTRODUÇÃO

A técnica do DNA *Barcode* propõe o uso de uma região padronizada de DNA para (1) identificar e designar indivíduos desconhecidos para espécies descritas e (2) promover a descoberta de novas espécies (Hebert et al., 2003a). Para os animais, a região proposta para o DNA *Barcode* é um fragmento de 648 pb, englobando a seção 5-' do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) (Hebert et al., 2003a e 2003b). O DNA *Barcode* trabalha dentro do sistema hierárquico Linneano, preservando os princípios pelos quais as espécies são nomeadas e classificadas, mas estabelece uma estrutura taxonômica baseada em dados de sequência do DNA (Hebert & Gregory, 2005; Goldstein & DeSalle, 2010). Nesse sentido, esta abordagem tem sido indicada como uma solução para o "impedimento taxonômico", que remete para problemas que atualmente obstruem o progresso na taxonomia (Gaston & O'Neil, 2004; De Carvalho et al, 2005), incluindo restrições temporais e escassez a de taxonomistas em face à magnitude da biodiversidade. No que diz respeito a artrópodes tropicais, por exemplo, Hamilton et al. (2010) estimaram que, apesar de 250 anos de taxonomia e 855 mil espécies já descritas, cerca de 70% das espécies permanecem por serem descritas.

Além de acelerar o processo de identificação e a descoberta de novas espécies, o DNA *Barcode* também pode superar algumas limitações apresentadas pela taxonomia clássica baseada na morfologia (Hebert et al., 2003a; Valentini et al, 2008), como por exemplo (1) erros de identificação devidos à plasticidade fenotípica, ou à existência de polimorfismos, (2) a existência de táxons crípticos, (3) a efetividade limitada de identificação para um determinado sexo, estágio ou condição de vida, etc. Na verdade, esta abordagem tem o potencial de melhorar as perspectivas não só da sistemática e da conservação, mas também de uma série de outros campos da biologia, pois a descrição e identificação de espécies estão certamente entre as tarefas mais essenciais em biologia. No entanto, vários fatores podem comprometer a eficácia do DNA *Barcode* (Moritz & Cícero, 2004; Will & Rubinoff, 2004; Virgilio et al., 2010), incluindo (1) especiação recente associada ao fenômeno de *incomplete lineage sorting*, (2) hibridização regular com introgressão mitocondrial (que é ainda mais provável nos casos de infecção por endossimbiontes – Whitworth et al., 2007), (3) existência de fraquezas ou erros associados ao sistema de referência, (4) amplificação preferencial ou co-amplificação de Numts (cópias nucleares de fragmentos de DNA mitocondrial), (5) sobreposição entre as distâncias intra e interespecífica, (6) não uniformidade dos mecanismos

de especiação nos diferentes táxons. Assim, é importante que a eficácia da abordagem do DNA *Barcode* seja testada individualmente em cada grupo taxonômico antes da sua efetiva utilização.

Drosophilidae abrange atualmente 76 gêneros descritos, apresentando mais de 4.100 espécies (Bächli, 2011), bem como várias centenas de espécies ainda por serem descritas. Desde os tempos de Morgan e seus colaboradores, esta família tem sido única no fornecimento de vários organismos modelo para estudos genéticos, ontogenéticos, citológicos, ecológicos e evolutivos (Markow & O'Grady, 2007). No entanto, apesar da adaptação das espécies de Drosophilidae para hábitos frugívoros, micófagos, antófilos, etc. (Val et al., 1981), a maioria dos estudos e coletas são focados em moscas que utilizam frutos como substrato para alimentação e/ou reprodução (Döge et al., 2007; Gottschalk et al., 2008). Também é importante ressaltar as tendências relacionadas ao estudo preferencial de espécies do gênero *Drosophila* (Gottschalk et al., 2009), a despeito dos outros gêneros cujas propriedades evolutivas e ecológicas estão ainda por ser avaliadas, especialmente na região Neotropical.

Neste contexto, investigamos aqui a eficácia da tecnologia de DNA *Barcode* para a identificação de drosofilídeos Neotropicais micófagos pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica*, ou seja, os gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* (Grimaldi, 1990). Nós também testamos se as sequências dos genes COI (marcador padrão do DNA *Barcode*, conforme proposto por Hebert et al., 2003a) e COII (utilizado como um auxiliar na detecção de artefatos provenientes da amplificação de Numt's de COI, conforme proposto por Linares et al., 2009) de um conjunto de espécimes coletados apresentam as propriedades desejadas para o devido funcionamento do DNA *Barcode*, em uma perspectiva de que uma vez que esse potencial seja confirmado, a rápida identificação poderia promover uma mudança no cenário de desconhecimento com relação aos aspectos evolutivos, ecológicos e até mesmo biogeográficos relacionados a estas espécies. Por outro lado, além de confirmar a utilidade do DNA *Barcode* baseado em sequências de COI e/ou de COII, este estudo também representa um avanço no sentido de melhor compreender a biodiversidade Neotropical de drosofilídeos micófagos, uma vez que ele revela altos níveis de diversidade críptica e de espécies ainda não descritas, ao mesmo tempo em que questiona alguns limites genéricos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Coleta de amostras

Para a realização deste trabalho, drosofilídeos adultos foram coletados sobrevoando ou pousados sobre fungos com o auxílio de um aspirador entomológico (aspirador manual modificado) ou de uma rede entomológica. Em alguns casos, os corpos de frutificação dos fungos foram coletados e levados ao laboratório, onde eram constantemente monitorados quanto à eclosão de indivíduos adultos, que, uma vez detectados, eram aspirados. Além disso, indivíduos de *Z. vittimaculosa* (Burla, 1956) foram obtidos a partir de inflorescências de *Cestrum calycinum* (Solanaceae), que foram levadas ao laboratório e permitiram a eclosão e aspiração de espécimes adultos.

As coletas foram realizadas em diversos municípios distribuídos ao longo da região Sul do Brasil, conforme indicação da Tabela 1 com respectivas datas de coleta e coordenadas geográficas. Em todos os casos, corpos de frutificação colonizados por drosofilídeos micófagos foram encontrados em áreas de mata nativa ou reflorestadas.

Tabela 1: Locais de coletas, respectivas coordenadas geográficas e datas de coletas.

Pontos de coleta	Subpontos	Datas das coletas	Coordenadas Sul (S)	Coordenadas Oeste (W)
Florianópolis (SC)	Morro da Lagoa da Conceição	20/11/2009	27°35'27''	48°28'33''
Ivoti (RS)	Cascata São Miguel	20/02/2010	29°35'00''	51°07'06''
Pejuçara (RS)	Balneário do Picolé	27/02/2010 04/04/2010	28°23'12''	53°39'95''
Santa Maria (RS)	Bosque da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)	12/03/2009 23/03/2009 24/03/2009	29°43'19''	53°42'47''
	Jardim Botânico (UFSM)	23/03/2009 24/03/2009	29°43'02''	53°43'34''
	Morro do Elefante	27/04/2009	29°40'73''	53°43'55''
	Cascata do Mezzomo	Jan/2009	29°37'95''	53°36'01''

Santiago (RS)	Tênis Clube	01/02/2010	29°11'09''	54°53'50''
	Parque Zamperete	01/02/2010	29°12'51''	54°51'27''
Viamão (RS)	Parque Saint'Hilaire	19/02/2010	30°05'17''	51°06'07''

Os indivíduos coletados foram armazenados em álcool absoluto (que mantém a integridade do DNA por mais tempo) e posteriormente identificados.

A determinação dos indivíduos ocorreu por meio da análise da morfologia externa e terminália masculina (Bächli et al., 2004), que foram comparadas com descrições e revisões encontradas na literatura especializada (Frota-Pessoa, 1954; Burla, 1956; Wheeler & Takada, 1963; Grimaldi, 1987 e 1990; Vilela & Bächli, 1990 e 2004).

Após a identificação morfológica, o material restante (tórax e cabeça) de cada espécime foi utilizado na realização dos protocolos dos dados moleculares.

2. 2. Manipulação do DNA

O DNA total foi extraído dos tecidos restantes com o uso do kit NucleoSpin Tissue XS (MACHEREY-NAGEL), com os extratos ressuspensos em 20-30µl de H₂O milli-Q. Posteriormente, a amplificação por PCR para os genes de interesse deu-se com o uso dos seguintes pares de primers (Simon et al., 1994): (1) TYJ1460 (5'-TAC AAT CTA TCG CCT AAA CTT CAG CC -3') e C1N2329M (5'-ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CAT ACA-3'), levando à amplificação de um fragmento de 917pb da região 5' do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI); e (2) TL2J3037 (5'-ATG GCA GAT TAG TGC AAT GG-3') e TKN3785 (5'-GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG-3'), levando à amplificação de um fragmento de 787 pb do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade II (COII). O mix para a realização da reação da PCR (referente a um volume de 25 µl) era constituído de 1x tampão, 10 pmol de cada primer, 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1 U de *Taq* polimerase e 1 µl de DNA total. As reações de PCR empregaram uma etapa inicial de desnaturação a 94° C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 55° C por 45 segundos e extensão a 72° C por um minuto, ao que se seguiu uma etapa de extensão final a 72° C por 5 minutos.

Optou-se por utilizar dois marcadores mitocondriais neste estudo como uma proteção importante para a detecção de contaminações com Numts, conforme proposto por Linares et

al. (2009). Além disso, Roe & Sperling (2007) aconselham o uso de uma região maior do genoma mitocondrial como uma forma de aumentar a probabilidade de amostrar áreas filogeneticamente informativas, uma vez que espécies/grupos próximos podem apresentar perfis de divergência/saturação variáveis ao longo da região contendo os genes COI e COII.

Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, e posteriormente purificados com o uso de uma solução contendo PEG 13% e NaCl 1.6M sendo, então, diretamente sequenciados. Neste caso, o sequenciamento ocorreu em um sequenciador automático MegaBACE 500, utilizando a técnica de terminação de cadeia implementada mediante utilização do kit DYEnamic ET® (Amersham), de acordo com o protocolo fornecido e com o uso dos mesmos primers utilizados na PCR.

2. 3. Matrizes de dados

A Tabela 1S (Material Suplementar) contém a lista de todos os espécimes coletados, incluindo dados referentes aos seus locais de coleta. Para os indivíduos que tiveram seu DNA extraído, na maior parte dos casos, a amplificação, o sequenciamento e a análise de ambos marcadores foi possível, enquanto em outros casos apenas um dos marcadores foi caracterizado. Entretanto, quando muitos representantes de uma mesma espécie eram coletados em um mesmo ponto, apenas alguns deles foram escolhidos aleatoriamente para a inclusão nas análises. As sequências estão em processo de deposição no Genbank, de forma que seus números de acesso ainda não estão disponíveis.

Além das 117 novas sequências de COI e 137 novas sequências de COII obtidas neste trabalho, todas as sequências de COI e COII disponíveis no GenBank para espécies determinadas pertencentes ao grupo genérico *Zygothrica* foram baixadas e utilizadas nas análises (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências adicionais baixadas do GenBank e seus respectivos números de acesso.

Espécies	COI	COII
<i>H. duncani</i> (Sturtevant, 1918)	GU597473	GU597505
<i>H. histrioides</i> (Okada & Kuirakawa, 1957)	AF519387	AF519323
<i>H. pictiventris</i> (Duda, 1925)	-	AF478434
<i>H. thoracis</i> (Williston, 1896)	GU597474	GU597506
<i>H. trilineata</i> (Chung, 1960)	EU126511	-
<i>M. claytonae</i> (Wheeler & Takada, 1963)	GU597470	GU597502
<i>M. dimidiata</i> (Loew, 1862)	GU597471, EU493682	GU597503
<i>Amiota setigera</i> * (Malloch, 1924)	EU493568	EU493700
<i>Leucophenga albofasciata</i> * (Macquart, 1851)	EU493569	EU493701
<i>Leucophenga varia</i> * (Walker, 1849)	GU597446	GU597476
<i>Ceratitis capitata</i> * (Wiedmann, 1824)	NC_000857	NC_000857

Notas: (1) “-” indica que a sequência não está disponível para download. (2) Espécies demarcadas com * foram utilizadas como grupos externos nas análises filogenéticas.

2.4. Análises

Através do uso do pacote Staden (Staden, 1996) foi possível realizar a montagem dos eletroferogramas. Cada uma das sequências consenso assim obtidas, tiveram sua identidade confirmada pelo uso do BLASTN (NCBI site), sendo, então, avaliadas quanto à presença de mudanças no quadro de leitura ou de códons de terminação com o uso do software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versão 4 (Tamura et al., 2007), de forma a evitar a presença de Numts nas matrizes. Posteriormente, as sequências ortólogas foram alinhadas entre si no programa Clustal W (Larkin et al., 2007), conforme implementado no MEGA 4.

2.4.1. Análises de Distância

Distâncias par-a-par foram calculadas usando o modelo Kimura dois parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), conforme implementado no software MEGA 4. Este software também foi utilizado para obter valores médios de distância dentro de cada uma das categorias avaliadas

(intraespecífica, interespecífica congênica e interespecífica intergenérica), com as medidas de erro padrão estimadas através de bootstrap, com 1.000 réplicas.

2.4.2. Análises filogenéticas

As análises foram executadas isolada e conjuntamente para os dois genes, mediante utilização dos seguintes métodos: critério de Neighbor Joining (NJ), executado no MEGA 4; Análise Bayesiana (AB) realizada no programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), segundo o modelo GTR + I + G indicado pelo teste AIC (Akaike, 1974), conforme implementado no MrModelTest (Nylander, 2004).

Na AB, o espaço filogenético foi explorado pelo uso de duas corridas MCMC (Markov Chain Monte Carlo), cada qual com quatro cadeias. Ambas as corridas foram implementadas por 10.000.000 de gerações, com amostragem a cada 1.000 gerações, e descarte de 25% das amostragens iniciais. A confiabilidade da análise de NJ foi medida pela utilização do teste de bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1.000 réplicas, enquanto que na AB foi avaliada a probabilidade posterior de cada um dos agrupamentos.

Em cada um dos casos, as espécies *Amiota setigera*, *Leucophenga albofasciata* e *L. varia* [três membros da subfamília Steganinae, irmã da subfamília Drosophilinae da qual fazem parte os três gêneros estudados (Remsen & O'Grady, 2002)], além de *Ceratitis capitata* (Tephritidae, Diptera), foram usadas como grupos externos (números de acesso apresentados na Tabela 2).

3. RESULTADOS

3.1. Coletas

Foram coletados e identificados 177 indivíduos, dos quais 83 pertencem ao gênero *Hirtodrosophila*, 30 ao gênero *Mycodrosophila* e 55 ao gênero *Zygothrica* (Tabela 3). Para o gênero *Hirtodrosophila* foram encontrados 15 morfotipos, dentre os quais foi possível confirmar a identidade de *H. levigata* (Burla, 1956), *H. mendeli* (Mourão, Gallo e Bicudo, 1965), *H. subgilva* (Burla, 1956) e *H. thoracis* (Williston, 1896). Além disso, foi amostrado

um morfotipo muito semelhante a *H. morgani* (Mourão, Gallo e Bicudo, 1967) (*H. morgani* affinis), outro muito semelhante a *H. thoracis* (*H. thoracis* affinis 1¹), dois morfotipos semelhantes a *H. subgilva* (Burla, 1956) (*H. subgilva* affinis 1² e *H. subgilva* affinis 2²) e um morfotipo que pode apenas ser situado dentro do grupo *hirticornis* (grupo de *H. hirticornis*). Acredita-se que estes cinco morfotipos sejam espécies desconhecidas pela ciência. Ainda nas determinações de *Hirtodrosophila*, foram encontrados seis morfotipos isolados (*Hirtodrosophila* sp. H007, H010, H012, H013, H014 e *H. thoracis* affinis 2) que, por possuírem somente espécimes fêmeas, não puderam ser devidamente identificados por sua morfologia, embora um deles se assemelhe bastante a exemplares de *H. thoracis* (*H. thoracis* affinis 2³). Dentre todas as espécies/morfotipos, *H. levigata* (Burla, 1956) foi a mais frequentemente amostrada, sendo encontrada em seis pontos, junto aos municípios de Santa Maria, Ivoti, Viamão e Florianópolis. *Hirtodrosophila hirticornis* grupo e *H. thoracis* foram encontradas em quatro e três pontos, respectivamente, todos localizados no estado do Rio Grande do Sul. Todos os demais morfotipos apresentaram uma distribuição limitada a um ou dois pontos de coleta (Tabela 3).

Para o gênero *Mycodrosophila*, apenas dois morfotipos foram encontrados: o mais abundante pode ser devidamente identificado como *M. projectans* (Sturtevant, 1916), enquanto o segundo pertence, provavelmente, a uma espécie nova (*Mycodrosophila* sp. M001). *Mycodrosophila projectans* foi encontrada principalmente junto ao Bosque da UFSM, onde coletamos 19 espécimes dos 26 espécimes totais (73%). Os outros sete espécimes (27%) distribuíram-se entre o Morro do Elefante, Pejuçara e Viamão com baixa representatividade. Já *Mycodrosophila* sp. M001 foi encontrada apenas em dois pontos da cidade de Santa Maria e em Viamão.

Para o gênero *Zygothrica* foram amostradas *Z. dispar* (Wiedmann, 1830), *Z. hypandriata* (Burla, 1956), *Z. orbitalis* (Sturtevant, 1916), *Z. parapoeyi* (Burla, 1956), *Z. parvipoeyi* (Burla, 1956), *Z. prodispar* (Duda, 1925), *Z. ptialialis* (Burla, 1956) e *Z. poeyi* (Sturtevant, 1921), além de *Z. vittimaculosa* (Burla, 1956), coletada a partir de inflorescências de *C. calycinum*. Ainda, indivíduos semelhantes a *Z. apopoeyi* (Burla, 1956)

¹ A diferenciação destes indivíduos com relação à espécie afim foi inicialmente estabelecida com base nas análises filogenéticas (veja abaixo), sendo posteriormente confirmada por uma reavaliação das genitálias.

² A diferenciação destes dois morfotipos entre si foi inicialmente estabelecida com base nas análises filogenéticas (veja abaixo), sendo posteriormente confirmada por uma reavaliação das genitálias.

³ A diferenciação deste indivíduo com relação à espécie afim foi apenas estabelecida com base nas análises filogenéticas (veja abaixo).

(*Z. apopoeyi* affinis), *Z. atriangula* (Duda, 1927) (*Z. atriangula* affinis), *Z. festiva* (Burla, 1956) (*Z. festiva* affinis) e *Z. prodispar* (*Z. prodispar* affinis⁴) também foram amostrados, e refletem, possivelmente, a existência de espécies novas relacionadas às espécies descritas. Três morfotipos individuais (*Zygothrica*. sp. Z002 e H011 e *Z. poeyi* affinis) e representados exclusivamente por fêmeas não puderam ser devidamente identificados morfológicamente, embora um deles fosse bastante semelhante a *Z. poeyi* (*Z. poeyi* affinis⁴). Todas as espécies de *Zygothrica* apresentaram abundância baixa e apenas *Z. atriangula* affinis teve mais de 10 indivíduos amostrados. *Zygothrica poeyi* foi a espécie mais frequente, tendo sido encontrada em Santa Maria, Ivoti, Viamão e Florianópolis. Dentre as demais espécies, apenas *Z. hypandriata* e *Z. orbitalis* foram encontradas nos dois estados amostrados (Tabela 3).

Tabela 3. Relação total de morfotipos coletados/sequenciados para COI/sequenciados para COII e seus respectivos locais de coleta.

Espécies/morfotipos	Total de indivíduos coletados/sequenciados COI/sequenciados COII	Locais de coleta
<i>H. hirticornis</i> gupo ^A	8/7/8	BQ, ME, IT, PJ
<i>H. levigata</i>	34/19/19	CM, BQ, ME, FS, VM, IT
<i>H. mendeli</i>	6/6/6	CM, SG
<i>H. morgani</i> affinis ^A	3/3/3	CM, SG
<i>H. subgilva</i>	4/3/3	CM, FS
<i>H. subgilva</i> affinis 1 ^A	1/1/1	SG
<i>H. subgilva</i> affinis 2 ^A	11/3/3	CM, SG
<i>H. thoracis</i>	7/2/6	JB, PJ, SG
<i>H. thoracis</i> affinis 1 ^A	2/2/2	FS
<i>H. thoracis</i> affinis 2 ^B	1/1/1	PJ
<i>H. sp.</i> H007 ^B	1/1/1	CM
<i>H. sp.</i> H010 ^B	1/1/1	FS
<i>H. sp.</i> H012 ^B	1/1/1	VM
<i>H. sp.</i> H013 ^B	1/1/1	FS
<i>H. sp.</i> H014 ^B	1/1/1	IT
<i>M. projectans</i>	26/5/10	BQ, ME, VM, PJ
<i>M. sp.</i> M001 ^A	4/2/4	BQ, JB, VM
<i>Z. apopoeyi</i> affinis ^A	7/5/7	FS
<i>Z. atriangula</i> affinis ^A	12/3/12	FS
<i>Z. dispar</i>	4/4/3	IT, VM
<i>Z. festiva</i> affinis ^A	1/1/1	IT
<i>Z. hypandriata</i>	8/6/7	CM, ME, FS, VM
<i>Z. orbitalis</i>	5/5/5	CM, FS, IT
<i>Z. parapoeyi</i>	1/1/1	IT
<i>Z. parvipoeyi</i>	3/3/3	CM
<i>Z. prodispar</i>	2/2/2	IT

<i>Z. prodipar affinis</i> ^A	1/1/1	IT
<i>Z. ptillialis</i>	6/6/5	CM, ME, VM
<i>Z. poeyi</i>	5/4/4	ME, FS, IT, VM
<i>Z. poeyi affinis</i> ^B	1/1/1	FS
<i>Z. vittimaculosa</i>	3/3/3	São Marcos, VM
<i>Z. sp. Z002</i> ^B	1/1/1	IT
<i>Z. sp. H011</i> ^B	1/1/0	FS

Nota: (1) Espécies assinaladas com ^A refletem prováveis espécies novas, desconhecidas pela ciência e ainda não descritas, enquanto espécies assinaladas com ^B indicam espécimes fêmeas cuja identidade não pode ser inferida. (2) Siglas: BQ (Bosque/UFSM), JB (Jardim Botânico/UFSM), ME (Morro do Elefante), CM (Cascata do Mezzomo), FS (Florianópolis/SC), IT (Ivoti/RS), VM (Viamão/RS), PJ (Pejuçara/RS) e SG (Santiago/RS), São Marcos é uma localidade inserida no município de Santa Maria.

3. 2. Análise das distâncias

Dentre as 117 e 137 sequências obtidas para COI e COII, respectivamente, não foram encontrados indícios da presença de Numts, já que não foram encontrados códons de terminação ou evidências de mudanças no quadro de leitura. Além disso, nenhuma das duas matrizes apresentou desvios significativos da estacionaridade ($p > 0,05$), o que confirma que as sequências avaliadas são similares em termos de composição de bases. Neste sentido, em ambos os casos as sequências revelaram-se ricas em A+T (médias de 67,3% e 71,1% para COI e COII, respectivamente), especialmente na terceira posição de seus códons (média de 89,2% para ambos os marcadores). As matrizes nucleotídicas apresentaram grande variabilidade, embora, em ambos os casos, mas especialmente para COI, esta seja majoritariamente restrita à substituições sinônimas (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo dos níveis de variabilidade apresentados pelas matrizes de COI e COII dentro dos seus grupos-internos.

	COI		COII	
	Matriz de nucleotídeos	Matriz de aminoácidos	Matriz de nucleotídeos	Matriz de aminoácidos
Tamanho da matriz	791 x 117	263 x 117	646 x 137	215 x 137
Número de caracteres variáveis	289	15	286	50
Número de caracteres	265	6	248	28

informativos para
a parcimônia

Na Tabela 5 são apresentadas as estimativas de distâncias nucleotídicas de acordo com o modelo K2P em relação aos genes COI e COII dentro de cada espécie/morfotipo analisado com mais de um indivíduo amostrado. É importante ressaltar que os valores foram obtidos sob inclusão de algumas fêmeas, mesmo quando a identidade das mesmas foi confirmada apenas com análises filogenéticas (veja abaixo). Como pode ser visto, a distância mínima de 0,000 foi comum para espécies dos três gêneros estudados e, com uma única exceção, sempre que uma espécie apresentava este valor de distância mínima para COI, o apresentava também para COII. Neste sentido, para o gênero *Hirtodrosophila*, cinco das oito espécies com mais de um indivíduo amostrado apresentaram esta distância mínima em ambos os marcadores; para o gênero *Mycodrosophila* encontramos estas distâncias para duas das três espécies estudadas e para o gênero *Zygothrica* encontramos estes valores para sete das dez espécies. Entretanto, *Z. ptilialis* apresenta uma distância intraespecífica mínima de 0,000 para COI e de 0,004 para COII (o que é compatível com a presença de taxas evolutivas maiores para COII), enquanto *M. projectans* apresenta uma distância intraespecífica mínima de 0,005 para COI e de 0,000 para COII (o que pode ser explicado pelas diferenças de tamanho amostral das duas matrizes). Em relação à distância nucleotídica máxima, os maiores valores foram detectados para *M. dimidiata* (distância de 0,143 para COI), seguida de *H. subgilva* (0,050 e 0,047 para COI e COII, respectivamente) e de *Z. ptilialis* (0,046 e 0,050 para COI e COII, respectivamente). Valores maiores de 2% para ambos marcadores foram ainda encontrados em *H. thoracis* (0,035 e 0,031 para COI e COII, respectivamente) e *M. projectans* (0,028 e 0,026 para COI e COII, respectivamente). Em geral, para os três gêneros e ambos os marcadores, os valores médios de distância intraespecífica ficaram menores ou iguais a 1% (Tabela 6), com exceção de COI de *Mycodrosophila* cuja média intraespecífica foi de $0,024 \pm 0,038$. Este valor deve-se à presença de sequências divergentes de *M. dimidiata* obtidas a partir do GenBank. Outro padrão que pode ser observado na Tabela 6 refere-se ao fato de que, na maior parte dos casos, a magnitude dos desvios da média intraespecífica para cada gênero é semelhante à magnitude desta, o que é um reflexo da grande variação nas distâncias apresentadas dentro de cada uma das espécies, conforme verificado na Tabela 5.

Os dados descritos na Tabela 6 mostram que dentro de *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, os valores de distância interespecífica variam de 0,076-0,202, 0,042-0,163 e 0,038-0,161, respectivamente, para COI; e 0,070-0,197, 0,124-0,196 e 0,050-

0,181, respectivamente, para COII. Como evidenciado pela comparação destes valores, embora os padrões interespecíficos congêneros de COI e COII sejam coincidentes e fiquem dentro de um intervalo de 0,038 - 0,202 para os gêneros *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*, ambos os marcadores divergem nas comparações interespecíficas dentro do gênero *Mycodrosophila*. O valor mínimo de 0,042 para COI contrasta com o mínimo de 0,124 para COII, mas os valores menores apresentados por COI devem-se exclusivamente às comparações envolvendo *M. dimidiata_2* e *M. claytonae* (cujas sequências foram obtidas a partir do GenBank) entre si (distância de 0,042) ou com outras espécies (distâncias maiores ($0,095 \leq x \leq 0,140$)). Entretanto, é importante observar que o intervalo de 0,038 - 0,202 para as distâncias interespecíficas congêneras sobrepõe-se com a faixa de 0,000 - 0,143 (ou até mesmo 0,000 - 0,050, obtido ao excluir-se *M. dimidiata*) das distâncias intraespecíficas e também com a faixa 0,093 - 0,215 das distâncias interespecíficas intergenéricas.

Ainda na Tabela 6, é possível verificar que, embora os valores de *Taxonomic Resolution Ratio* (TRT) indiquem amplos níveis de resolução taxonômica dentro de cada gênero, com valores de distâncias médias interespecíficas pelo menos cinco vezes maiores que os valores de distâncias médias intraespecíficas, a análise de *Barcode Gap* (BG) revela a existência de uma sobreposição de valores congêneros intra e interespecíficos para *Zygothrica* (com ambos os marcadores) e para *Mycodrosophila* (apenas com COI).

Porém, ao avaliar a distribuição das frequências relativas dos diferentes valores de distâncias apresentados pelos genes COI e COII dentro das diferentes categorias (intraespecífica, interespecífica congênica e interespecífica intergenérica) (Figuras 1 e 2) percebe-se que, em geral, um dos preceitos da técnica de DNA *Barcode* para que seja possível a identificação das espécies, ou seja, a existência de um *gap* entre as distâncias intra e interespecífica, aplica-se para os três gêneros estudados. Assim, ainda que uma análise minuciosa revele a existência de sobreposição entre as distâncias intra e interespecíficas, esta parece ser devida a casos isolados. Entretanto, este cenário não se aplica à comparação entre as distâncias interespecíficas congêneras e intergenéricas, para os quais existe ampla sobreposição no intervalo de 0,09 - 0,18 e 0,09-0,21, para COI e COII, respectivamente.

Se observarmos as distâncias intraespecíficas por gêneros, os dados apresentados na Figura 1 revelam que, em relação ao gene COI, o gênero *Hirtodrosophila* tem 98% das suas distâncias localizadas no intervalo de 0,000 – 0,030 enquanto os gêneros *Mycodrosophila* e *Zygothrica* tem 91,7% e 93,0% de suas sequências, respectivamente, situadas no mesmo intervalo. A análise das distâncias interespecíficas congêneras para COI revela que 99,7%

das distâncias pareadas dentro de *Hirtodrosophila* situam-se no intervalo 0,09-0,20, faixa ocupada por 97% e 99,3% das distâncias interespecíficas dentro de *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, respectivamente. Entretanto, as distâncias intergenéricas de COI estão amplamente sobrepostas às interespecíficas apresentadas dentro dos diferentes gêneros, de forma que 99,8% das comparações também são situadas no intervalo 0,090 - 0,200.

Para o gene COII, os dados representados na Figura 2 mostram que 89,8% das distâncias intraespecíficas de *Hirtodrosophila* situam-se dentro do intervalo 0,00 - 0,030, que é ocupado por 100,0% e 97,2% das distâncias intraespecíficas de *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Em relação às distâncias interespecíficas congênicas, encontramos 99,1% das distâncias envolvendo comparações entre espécies de *Hirtodrosophila* localizadas no intervalo de 0,090 - 0,200, intervalo ocupado por 100,0% e 99,3% das distâncias envolvendo espécies de *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, respectivamente. Sobre as distâncias intergenéricas do gene COII a distribuição das frequências também se estende dentro do intervalo 0,090 - 0,200, que é ocupado por 99,8% das comparações.

Tabela 5: Estimativa das distâncias nucleotídicas (modelo K2P) para os genes citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo c oxidase subunidade II (COII) dentro de cada uma das espécies avaliadas.

Espécies/morfotipos	COI				COII			
	Número de Sequências	Distância média (± erro padrão)	Distância Mínima	Distância Máxima	Número de Sequências	Distância média (± erro padrão)	Distância Mínima	Distância Máxima
<i>H. hirticornis</i> grupo	7	0,002 ± 0,001	0,001	0,003	8	0,002 ± 0,001	0,000	0,007
<i>H. levigata</i>	19	0,006 ± 0,002	0,000	0,015	19	0,011 ± 0,002	0,000	0,040
<i>H. mendeli</i>	6	0,004 ± 0,001	0,000	0,008	6	0,002 ± 0,001	0,000	0,004
<i>H. morgani</i> affinis	3	0,001 ± 0,001	0,000	0,001	3	0,001 ± 0,001	0,000	0,002
<i>H. subgilva</i>	3	0,034 ± 0,005	0,007	0,050	3	0,033 ± 0,006	0,008	0,047
<i>H. subgilva</i> affinis 2	3	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	3	0,000 ± 0,000	0,000	0,000
<i>H. thoracis</i>	3	0,024 ± 0,006	0,000	0,035	7	0,009 ± 0,002	0,000	0,031
<i>H. thoracis</i> affinis	2	0,006 ± 0,003	0,006	0,006	2	0,003 ± 0,002	0,003	0,003
<i>M. projectans</i>	5	0,014 ± 0,003	0,005	0,028	10	0,012 ± 0,003	0,000	0,026
<i>M. sp.</i> M001	2	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	4	0,000 ± 0,000	0,000	0,000
<i>M. dimidiata</i>	2	0,143 ± 0,018	0,000	0,143	-	-	-	-
<i>Z. apopoeyi</i> affinis	5	0,001 ± 0,001	0,000	0,003	7	0,003 ± 0,001	0,000	0,008

<i>Z. atriangula affinis</i>	3	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	12	0,002 ± 0,001	0,000	0,004
<i>Z. dispar</i>	4	0,010 ± 0,003	0,005	0,014	3	0,005 ± 0,002	0,003	0,005
<i>Z. hypandriata</i>	6	0,002 ± 0,001	0,000	0,004	7	0,002 ± 0,001	0,000	0,006
<i>Z. orbitalis</i>	5	0,004 ± 0,001	0,000	0,011	5	0,006 ± 0,002	0,000	0,015
<i>Z. parvipoeyi</i>	3	0,002 ± 0,001	0,000	0,003	3	0,001 ± 0,001	0,000	0,002
<i>Z. prodispar</i>	2	0,004 ± 0,002	0,004	0,004	2	0,006 ± 0,003	0,006	0,006
<i>Z. ptilialis</i>	6	0,016 ± 0,003	0,000	0,046	5	0,022 ± 0,004	0,004	0,050
<i>Z. poeyi</i>	4	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	4	0,002 ± 0,001	0,000	0,003
<i>Z. vittimaculosa</i>	3	0,002 ± 0,001	0,000	0,003	3	0,000 ± 0,000	0,000	0,000

Tabela 6. Estimativa das distâncias nucleotídicas (modelo K2P) para os genes citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo c oxidase subunidade II (COII) para cada uma das categorias taxonômicas avaliadas.

Categoria taxonômica		COI				COII			
		Distância Mínima	Distância Média	Distância Máxima	TRT e BG*	Distância Mínima	Distância Média	Distância Máxima	TRT e BG*
Gênero <i>Hirtodrosophila</i>	Intraespecífica	0,000	0,006 ± 0,006	0,050	21,333 e 0,026	0,000	0,010 ± 0,009	0,047	13,400 e 0,023
	Interespecífica	0,076	0,128 ± 0,015	0,202		0,070	0,134 ± 0,017	0,197	
Gênero <i>Mycodrosophila</i>	Intraespecífica	0,000	0,024 ± 0,038	0,143	5,375 e 0,026	0,000	0,010 ± 0,008	0,026	16,800 e 0,098
	Interespecífica	0,042	0,129 ± 0,024	0,163		0,124	0,168 ± 0,023	0,196	
Gênero <i>Zygothrica</i>	Intraespecífica	0,000	0,006 ± 0,010	0,046	21,333 e 0,026	0,000	0,004 ± 0,008	0,050	35,250 e 0,023
	Interespecífica	0,038	0,128 ± 0,015	0,161		0,050	0,141 ± 0,015	0,181	
Grupo genérico <i>Zygothrica</i>	Intraespecíficas	0,000	0,007 ± 0,011	0,143		0,000	0,008 ± 0,009	0,050	

Grupo genérico <i>Zygothrica</i>	Interespecíficas	0,038	0,128 ±	0,202	0,050	0,138 ±	0,197
	Congenéricas		0,015			0,017	
	Interespecíficas	0,093	0,132 ±	0,215	0,094	0,146 ±	0,215
	Intergenéricas		0,017			0,018	

Notas: (1) * TRT é a taxa de resolução taxonômica, calculada pelo quociente da distância média interespecífica pela distância média intraespecífica; BG é o *Barcode gap*, obtido pela subtração da mínima distância interespecífica pela máxima distância intraespecífica calculado porque a extensão do *gap* pode ser superestimada quando a média intra e interespecífica são utilizadas (Meier et al., 2008). *E* reflete a ausência de um *Barcode gap* em função de um valor negativo.

Figura 1: Distribuição das frequências relativas dos diferentes intervalos de distâncias para o gene COI onde (a) representa as distâncias intraespecíficas, (b) distâncias inter-específicas congênericas e (c) distâncias intergenéricas.

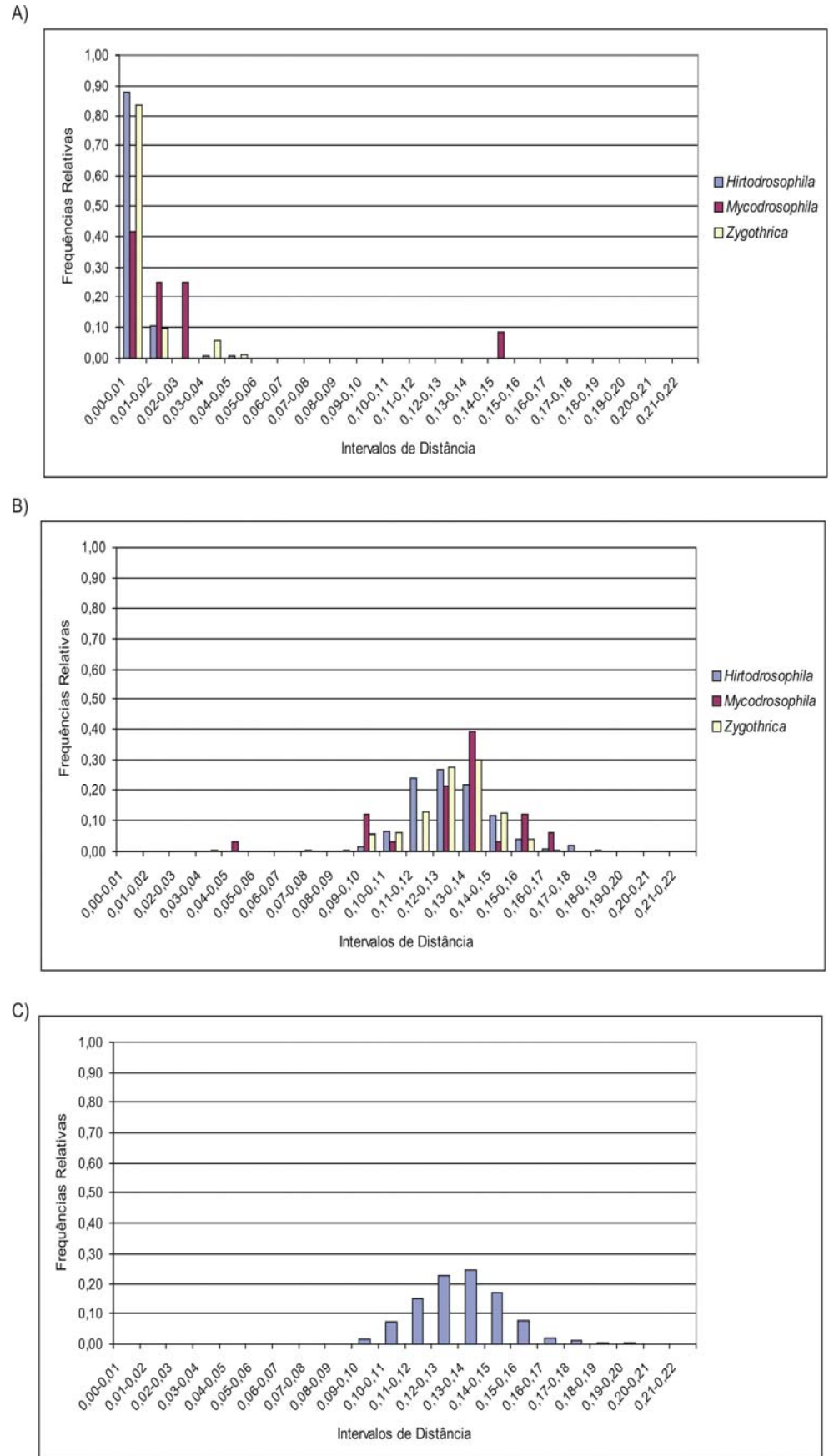
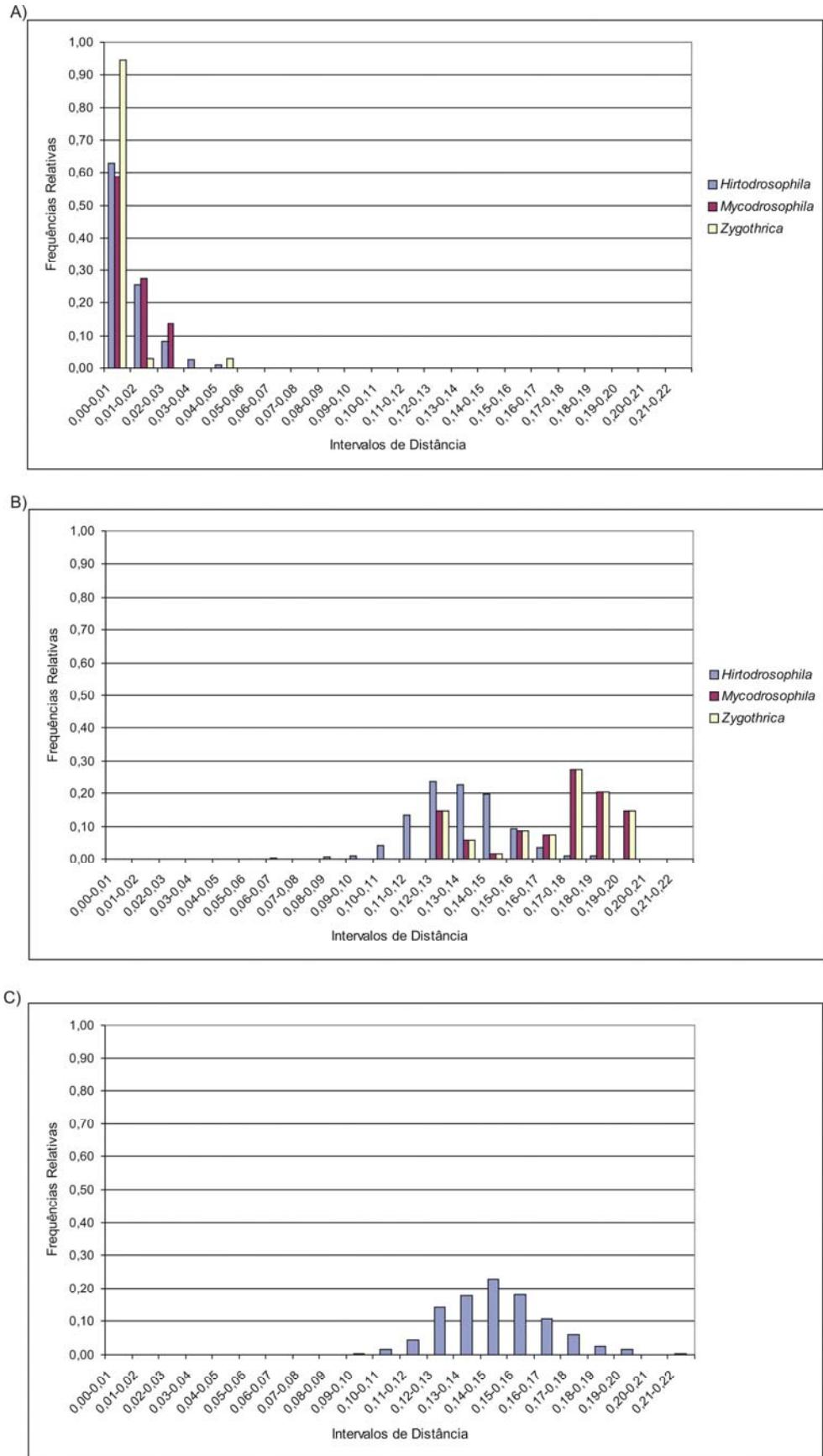


Figura 2: Distribuição das frequências relativas dos diferentes intervalos de distâncias para o gene COII onde (a) representa as distâncias intraespecíficas, (b) as distâncias interespecíficas congênicas e (c) distâncias intergenéricas.



3. 3. Análises filogenéticas

Tanto pelo fenograma/filogenia de COI (Figura 3), quanto para COII (Figura 4) conseguiu-se resolver algumas dúvidas relacionadas à identificação morfológica de indivíduos fêmeas, em especial no que diz respeito à distinção entre espécies crípticas. Por exemplo, duas fêmeas (62 e 110N) inicialmente com identidade dúbia, que foram determinadas como *H. subgilva* ou *H. levigata*, mostraram-se agrupadas à *H. levigata* com altos valores de suporte para os dois métodos de análise (BO = 100, PP = 1.00). Por outro lado, outra fêmea (110V) que foi determinada da mesma forma revelou-se um exemplar de *H. subgilva* com altos valores de suporte para o agrupamento com machos desta espécie (BO = 100, PP = 1.00). A identificação também foi resolvida para outras duas fêmeas de *Hirtodrosophila* (35 e 36), novamente com identidade dúbia e identificadas inicialmente como *H. mendeli* ou *H. subgilva*, mas neste caso significativamente suportadas como *H. subgilva* affinis 2 e como *H. mendeli*, respectivamente. Este padrão também foi verificado para espécies pertencentes ao gênero *Zygothrica*: duas fêmeas (64 e 65) não puderam ser identificadas com exatidão com base em caracteres morfológicos, sendo determinadas como *Z. orbitalis* ou *Z. ptilialis*, mas confirmadas como *Z. orbitalis* (BO = 100, PP = 1.00); já outras duas fêmeas (44 e 85) tiveram sua identidade de *Z. ptilialis* ratificadas (BO = 100, PP = 1.00) após determinação inicial entre *Z. ptilialis* e *Z. hypandriata*.

Uma série de outros morfotipos (H007, H010, H011, H012, H013, H014 e Z002) tiveram apenas fêmeas amostradas. Neste caso, entretanto, embora a identificação adequada não pudesse ser atribuída, a distribuição destes na filogenia e os níveis de divergência separando os mesmos, confirmam sua identificação como MOTU's (Molecular Operational Taxonomic Units) distintas. Este também foi o caso da fêmea identificada como *Z. poeyi* affinis, cuja similaridade com *Z. poeyi* pôde ser morfológicamente diagnosticada, e cuja diferenciação desta foi, posteriormente, confirmada em nível fenético/filogenético. A fêmea *H. thoracis* affinis 2, por outro lado, foi inicialmente identificada como *H. thoracis*, sendo sua diferenciação da espécie afim estabelecida pela análise dos fenogramas/filogenias.

Além disso, a diferenciação dos morfotipos *H. hirticornis* grupo, *H. morgani* affinis, *Mycodrosophila* sp. M001, *Z. apopoeyi* affinis, *Z. atriangula* affinis e *Z. festiva* affinis entre si, e para com os demais morfotipos aqui analisados, também foi suportada nos fenogramas/filogenias (BO = 100, PP = 1.00). O macho inicialmente identificado como *Z.*

prodispar affinis também revelou-se uma MOTU distante daquela identificada como *Z. prodispar*, confirmando sua independência com relação a esta.

Conforme já citado, os fenogramas/filogenias também permitiram a diferenciação de MOTU's crípticas dentro dos morfotipos inicialmente identificados como *H. thoracis* e *H. subgilva* affinis. Neste sentido, dentre os indivíduos agrupados dentro do morfotipo *H. thoracis*, foi revelada a presença de duas MOTU's distintas, além daquela representada pela fêmea *H. thoracis* affinis 2, já mencionada anteriormente. Da mesma forma, os espécimes de *H. subgilva* affinis distribuíram-se em dois clados distintos e distantes, não apenas entre si, como também com relação a *H. subgilva*, revelando a presença de duas MOTU's crípticas. Em ambos os casos, uma reavaliação dos caracteres morfológicos permitiu a atribuição de pequenas diferenças entre os agrupamentos mencionados, especialmente no que se refere aos machos, o que não foi possível para *H. thoracis* affinis 2, devido à amostragem única de fêmeas. Portanto, além de confirmar as diferenciações/identificações atribuídas com base em caracteres morfológicos, as análises moleculares, tanto com COI quanto com COII, permitiram a descoberta de níveis crípticos de biodiversidade, sempre atribuindo valores significativos de confiança para os agrupamentos intraespecíficos.

Além da monofilia recíproca das sequências apresentadas pelas diferentes espécies (com a exceção única de *M. dimidiata*), poucas relações interespecíficas foram devidamente suportadas, e tanto a filogenia de COI (Figura 3) quanto a filogenia de COII (Figura 4) mostram uma base politômica. Considerando como significativos apenas os agrupamentos que apresentam $BO \geq 70$ ou $PP \geq 95$, pode ser atribuído suporte apenas às seguintes relações: (1) *Z. dispar* e *Z. prodispar*, dois membros do subgrupo *dispar* do grupo *dispar* constituem espécies-irmãs tanto nas análises de COI ($PP = 0.98$), quanto nas análises de COII ($BO = 99$, $PP = 1.00$); (2) *Z. vittimaculosa* aparece agrupada com o morfotipo *Zygothrica* sp. Z002 na análise de COII ($BO = 100$ e $PP = 1.00$) e com o clado formado por este e *Zygothrica* sp. H011 na análise de COI ($BO = 100$ e $PP = 1.00$); (3) *H. morgani* affinis e *H. subgilva* affinis 1 encontram-se agrupadas em ambas filogenias ($BO=99$ e $PP = 1.00$ para os dois genes); (4) o clado formado por *M. projectans* e *H. thoracis* affinis 2 é suportado por ambos marcadores ($BO = 87$ e $PP = 1.00$ e $BO = 91$ e $PP = 1.00$), mas aparece agrupado ao clado composto por *M. claytonae* e *M. dimidiata_2* apenas na análise de COI ($PP = 0.98$); (5) na análise de COII, *M. claytonae* é suportada como espécie-irmã de *Mycodrosophila* sp. M001 ($PP = 0.97$). Merece especial destaque o fato de que em nenhum dos dois casos existe suporte para a monofilia de qualquer um dos três gêneros micófagos aqui analisados. Em nível de

subfamília, entretanto, embora COII não tenha sido capaz de recuperar a monofilia recíproca das duas subfamílias, Drosophilinae e Steganinae, a mesma foi recuperada com baixo suporte nas análises envolvendo a matriz de COI.

Na busca de uma melhor resolução para alguns pontos, foi realizada uma análise dos dados concatenados conforme Figura 5. Embora mais uma vez a monofilia dos três diferentes gêneros não tenha sido recuperada, o caráter monofilético da subfamília Drosophilinae foi significativamente suportado (PP = 0.95). Além disso, algumas novas relações puderam ser observadas, como por exemplo: (1) o agrupamento entre *H. thoracis*, *H. thoracis* affinis 1 e *H. hirticornis* grupo (PP = 0.98); (2) a afinidade evolutiva entre *H. mendeli*, *H. subgilva* affinis 2 e *H. subgilva* (PP = 0.98); (3) o posicionamento do clado formado por *Z. vittimaculosa* e *Zygothrica* sp. Z002 como irmão de *Z. dispar*/*Z. prodispar*. Além disso, os cladogramas formados por *H. morgani* affinis e *H. subgilva* affinis 1 (BO = 100 e PP = 1.00) e por *M. projectans* e *H. thoracis* affinis 2 (BO = 98 e PP = 1.00) foram novamente recuperados.

Figura 3: Árvore de consenso de maioria gerada através de Análise Bayesiana (AB) das sequências nucleotídicas do gene COI para as espécies estudadas. Junto aos nós internos, na parte superior, estão valores de bootstrap obtidos na análise de Neighbor-joining (NJ) e na parte inferior as probabilidades posteriores obtidas através da AB. Espécies com mais de um indivíduo amostrado tiveram clados reduzidos para a representação de dois únicos nós terminais. Os (*) indicam ausência de suporte de bootstrap para a referida relação.

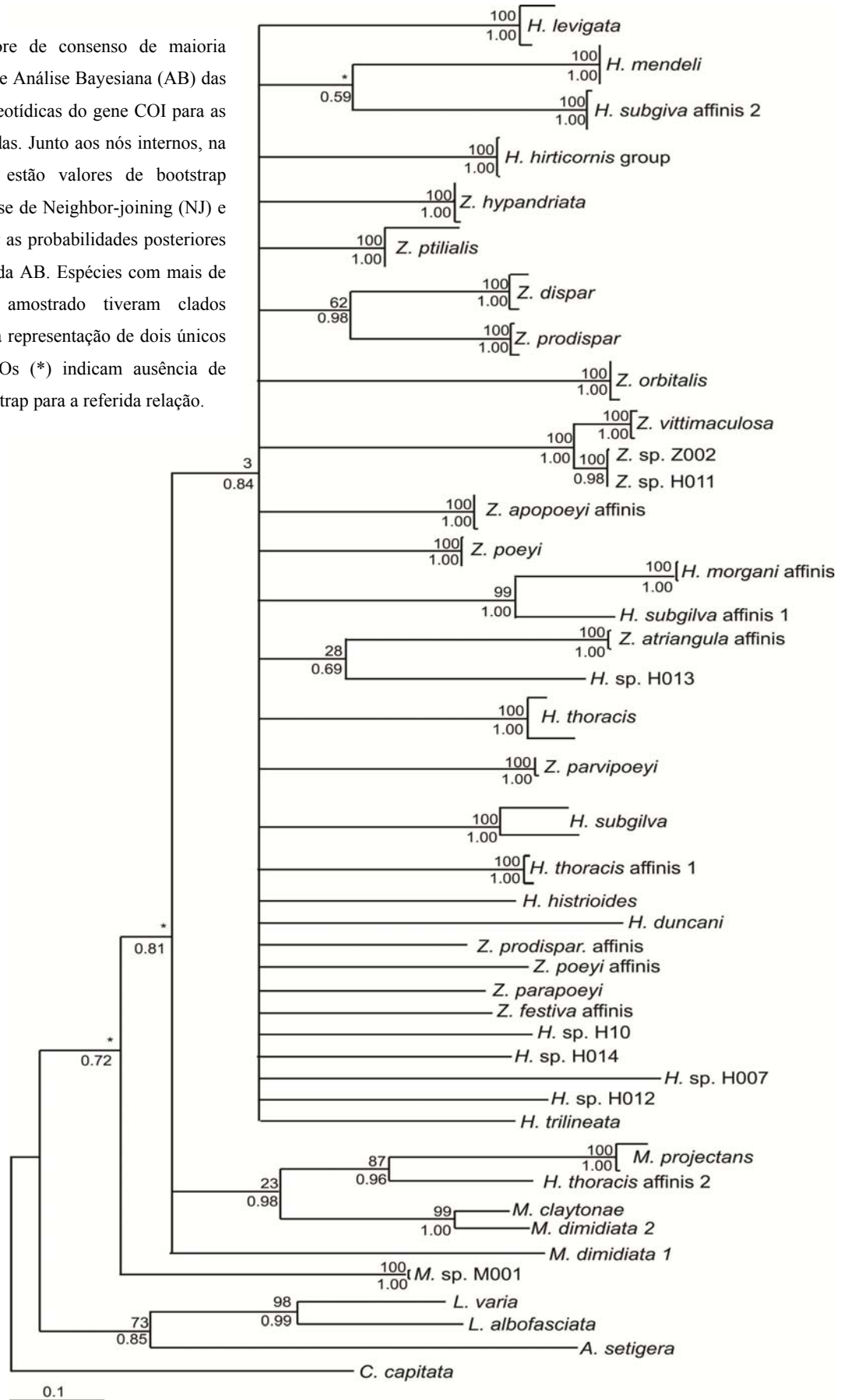


Figura 4: Árvore de consenso de maioria gerada através de Análise Bayesiana (AB) das sequências nucleotídicas do gene COII para as espécies estudadas. Junto aos nós internos, na parte superior, estão valores de bootstrap obtidos na análise de Neighbor-joining (NJ) e na parte inferior as probabilidades posteriores obtidas através da AB. Espécies com mais de um indivíduo amostrado tiveram clados reduzidos para a representação de dois únicos nós terminais. Os (*) indicam ausência de suporte de bootstrap para a referida relação.

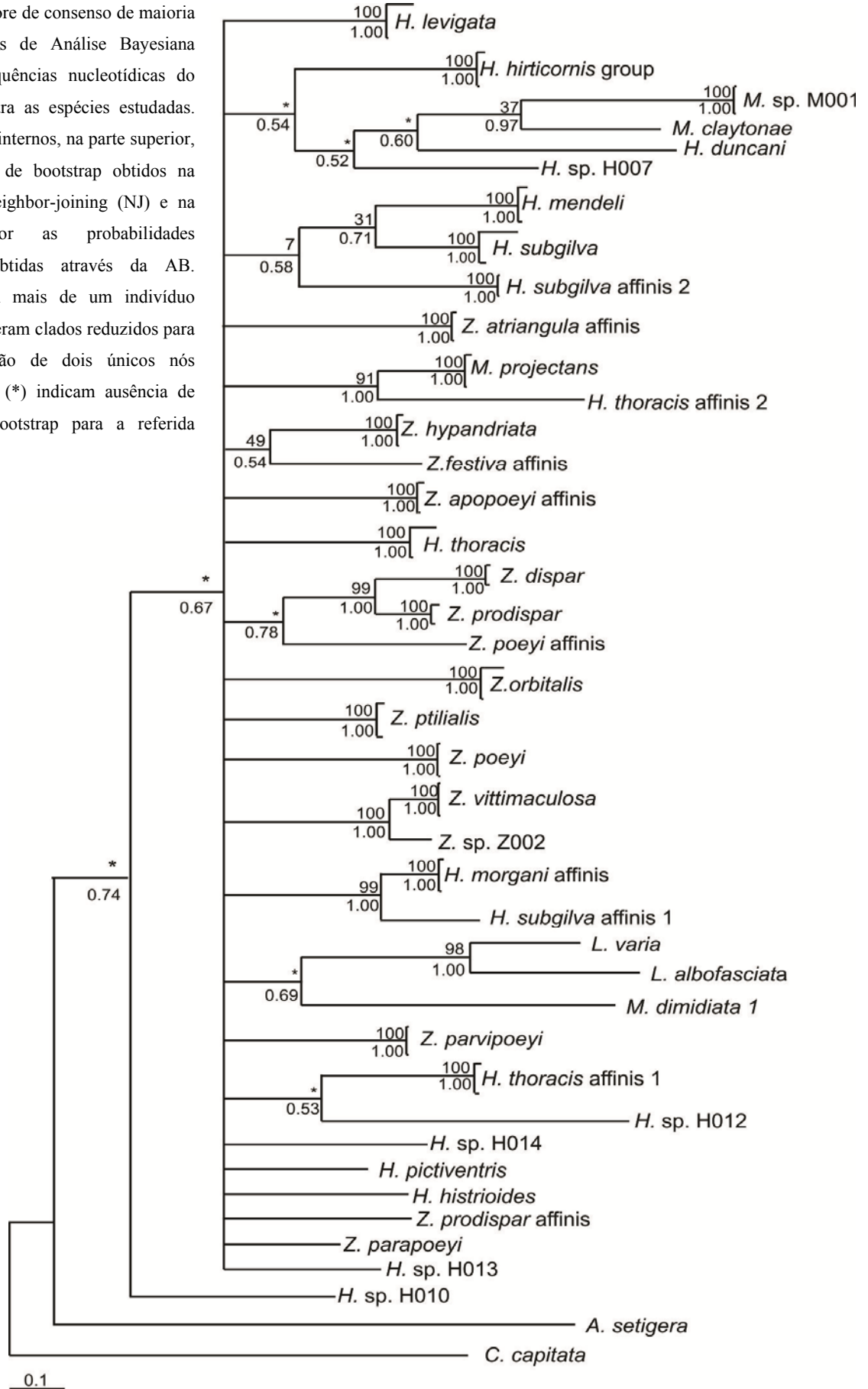
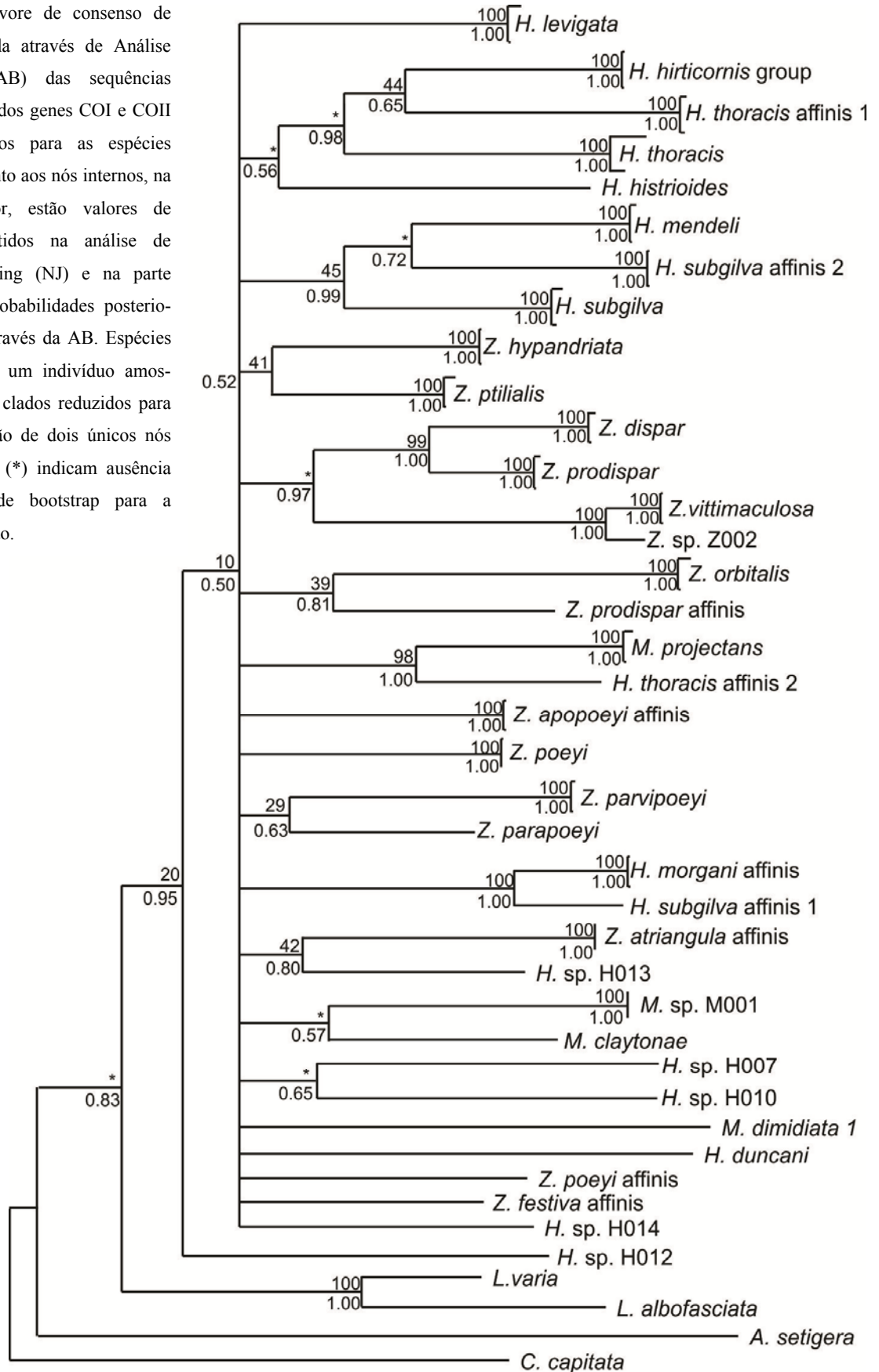


Figura 5: Árvore de consenso de maioria gerada através de Análise Bayesiana (AB) das sequências nucleotídicas dos genes COI e COII concatenados para as espécies estudadas. Junto aos nós internos, na parte superior, estão valores de bootstrap obtidos na análise de Neighbor-joining (NJ) e na parte inferior as probabilidades posteriores obtidas através da AB. Espécies com mais de um indivíduo amostrado tiveram clados reduzidos para a representação de dois únicos nós terminais. Os (*) indicam ausência de suporte de bootstrap para a referida relação.



4. DISCUSSÃO

A tecnologia do DNA *Barcode* foi designada para fornecer identificações rápidas, acuradas e automatizáveis, ao mesmo tempo em que ajuda a revelar a diversidade críptica (Hebert & Gregory, 2005). Esta metodologia depende do pressuposto de que a variação genética entre espécies excede a variação genética dentro das espécies (Hebert et al., 2003a), geralmente estabelecendo limiares para diferenciação entre distâncias intra e interespecíficas (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2004a; Ratnasingham & Hebert, 2007). Além disso, as matrizes de distância também costumam ser utilizadas na construção de fenogramas (Hebert et al., 2003a, 2004a, 2004b).

Entretanto, métodos que se baseiam na estimativa de distâncias par-a-par para a discriminação de espécies utilizam um conceito tipológico de espécie (Casiraghi et al., 2010) e não apresentam um forte suporte biológico (Meyer & Paulay, 2005), já que a ausência de um *Barcode gap* e a variação nos níveis de divergência entre espécies podem ser ocasionados por inúmeros fatores, como por exemplo, (1) pela variação de taxas evolutivas entre linhagens, (2) pela heterogeneidade nos mecanismos de especiação, (3) pela ausência de monofilia recíproca entre as espécies no que diz respeito ao marcador analisado, o que pode estar associado a fenômenos como introgressão ou *incomplete lineage sorting*, ou ao mecanismo de especiação *per se*. Por outro lado, métodos filogenéticos seguem um conceito filogenético de espécie (Casiraghi et al., 2010), o que pode ser problemático em organismos como *Drosophila* (Yassin et al., 2010), cuja taxonomia está especialmente fundamentada nos conceitos biológico e fenético de espécie.

A despeito da controvérsia, nossos resultados mostram níveis adequados e equivalentes de sucesso para os diferentes métodos e a maioria das espécies satisfaz ambos os critérios do DNA *Barcode* (1) agrupamentos intraespecíficos são, na grande maioria dos casos, reciprocamente monofiléticos entre si; (2) existe um *Barcode gap* geral separando a maior parte das divergências intraespecíficas da maior parte das divergências interespecíficas, embora num primeiro momento, as análises individuais demonstrem ausência deste *gap* para alguns gêneros isolados. De fato, o uso de muitos dos limiares previamente propostos na literatura fornece níveis satisfatórios de sucesso para nosso banco de dados.

A ferramenta apresentada pelo “*Barcode of Life Data System*” para a identificação de espécies (BOLD-IDS - <http://www.boldsystems.org/views/idrequest.php>) utiliza limiares de

1% de distância K2P para a discriminação universal de espécies de metazoários (Ratnasingham & Hebert, 2007). Por outro lado, Hebert et al. (2003a) sugere o uso de um limiar de 3% para a distinção de espécies, enquanto Hebert et al. (2004b) defende a utilização de estimativas grupo-específicas obtidas pela multiplicação da distância média intraespecífica por 10. Meier et al. (2006) também defende a atribuição de limiares grupo-específicos, pela estimativa do valor abaixo do qual estão 95% das distâncias intraespecíficas. O uso da regra estabelecida por Meier et al. (2006) para o nosso banco de dados converge para o valor de 3% sugerido por Hebert et al. (2003a), o que fornece 3,3% e 2,7% de falso-positivos com COI e COII, respectivamente, e 0,02% e 0,00% de falso-negativos. A regra de 10 vezes a distância média intraespecífica (Hebert et al., 2004b) leva a limiares de 7% (para COI) e 8% (para COII), valores associados à estimativas de erros ainda menores: 0,33% e 0,00% de falso-positivos com COI e COII, respectivamente, e 0,13% e 0,08% de falso-negativos. O limiar de 1%, por outro lado, diminui o sucesso de identificação, levando à estimativas de 15,13% e 27,27% de falso-positivos com COI e COII, respectivamente, e 0,02% e 0,00% de falso-negativos, com COI e COII, respectivamente. Assim, limiares obtidos pelo cálculo sugerido por Hebert et al. (2004b) parecem ser mais adequados para os gêneros micófagos *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, ao menos no que diz respeito ao nosso banco de dados.

Além disso, o sucesso da tecnologia do DNA *Barcode* para o nosso banco de dados pode ser também diagnosticado pela perfeita correspondência entre as espécies reconhecidas pelo uso de enfoques morfológicos e as designações baseadas em DNA *Barcode*. Nenhum macho posicionou-se em clados heteroespecíficos e em todos os casos em que a identidade de fêmeas não pode ser determinada com exatidão, a técnica de DNA *Barcode* levou ao posicionamento dentro de uma das espécies crípticas atribuídas, sempre com 100% de confiança. De fato, com exceção de *M. dimidiata*, todas as espécies com mais de um indivíduo amostrado foram definidas na forma de clados monofiléticos e suportados tanto por métodos fenéticos, quanto por métodos filogenéticos. Estes resultados divergem amplamente daqueles apresentados por Funk & Omland (2003), que detectaram que 23% das 2.319 espécies analisadas não são reciprocamente monofiléticas. Mais recentemente, Yassin et al. (2010) obteve valores similares de merofilia num estudo com 68 espécies pertencentes aos gêneros *Drosophila* e *Zaprionus*, ambos situados na subfamília Drosophilinae junto aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* (Bächli, 2011). Embora num primeiro momento as diferenças possam ser atribuídas a uma superestimativa dos níveis de monofilia e

do próprio *Barcode gap* no presente estudo, devido a não-inclusão de muitas espécies-irmãs e/ou à amostragem inadequada da distribuição geográfica das espécies (Moritz & Cícero, 2004; Linares et al., 2009), também é possível que os padrões aqui encontrados sejam um reflexo de peculiaridades evolutivas apresentadas pelas espécies estudadas. De fato, até mesmo espécies crípticas como *H. levigata*, *H. mendeli*, *H. subgilva* ou espécies-irmãs como *Z. dispar* e *Z. prodispar* foram posicionadas em clados relativamente distantes e independentes em todos os fenogramas/filogenias, o que sugere que os resultados aqui obtidos devem ser confirmados à medida que a distribuição e o número de espécie forem melhor amostrados.

Por outro lado, o presente trabalho também permitiu a detecção de 10 prováveis espécies novas, algumas das quais foram reveladas pela análise morfológica e confirmadas pelo DNA *Barcode*, enquanto outras foram diferenciadas inicialmente pela aplicação do DNA *Barcode*, como ocorreu com os indivíduos inicialmente determinados como *H. thoracis* e *H. subgilva* affinis. Neste caso, a detecção de MOTU's distintas facilitou a descoberta de variações morfológicas previamente não reconhecidas, embora em casos específicos esta diferenciação não tenha sido possível, dada a presença única de fêmeas. Além disso, algumas espécies com valores extremos de divergência intraespecífica, como *H. subgilva*, *Z. ptialialis*, *H. levigata*, *H. thoracis* e *M. projectans* podem estar encobrendo níveis ainda maiores de diversidade críptica. De fato, este trabalho se une a diversos outros que atestam a eficiência do DNA *Barcode* na descoberta de níveis crípticos de diversidade (Hebert et al., 2004a, 2004b; Yassin et al., 2008). Entretanto, conforme enfatizado por Hebert & Gregory (2005), é importante destacar que a tecnologia de DNA *Barcode* auxilia na delimitação de espécies, mas não é suficiente para descrever novos táxons. Novos estudos devem, pois, ser destinados à confirmação e à descrição destas novas espécies, preferencialmente em uma abordagem integrativa (DeSalle et al., 2005).

De qualquer forma, espera-se que este trabalho, em associação a outros que devem se seguir, estimulem os testes e a implementação da tecnologia do DNA *Barcode* na identificação de drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*, o que deve promover um aumento no número de estudos avaliando diferentes aspectos relacionados à biologia deste grupo, auxiliando na resolução de muitos de nossos *gaps* de conhecimento.

Entretanto, se por um lado a abordagem aqui utilizada sugere a efetividade do DNA *Barcode* na designação de espécies, a designação de gêneros por estes métodos parece ser amplamente dificultada. Nenhum dos fenogramas/filogenias apresentou qualquer indício de monofilia para os três gêneros estudados, além do que os valores de divergência interespecíficos congêneros e heterogêneros apresentaram ampla sobreposição. É difícil, no momento, inferir se estes resultados devem-se aos elevados níveis de saturação atingidos pelos genes estudados e/ou se os dados refletem padrões filogenéticos reais, com ausência de monofilia e divergência simultânea de diferentes grupos de espécies (de fato, algumas espécies pertencentes ao mesmo gênero avaliado divergem tanto entre si quanto divergem de espécies pertencentes ao gênero *Drosophila*). Independentemente desta resposta, que deve ser procurada com o delineamento de estudos filogenéticos utilizando um conjunto de marcadores distintos, os padrões aqui evidenciados sugerem que os drosofilídeos micófagos são alvos de uma grande conservação morfológica e/ou estão sujeitos a muitas convergências fenotípicas, já que grandes distâncias filogenéticas/fenéticas em nível molecular encontram-se, muitas vezes, associadas a incríveis níveis de similaridades em nível morfológico.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Ronaldo Golombiesky, pelos sequenciamentos, a Monica Blauth e Elvis Albert Wandscheer pela ajuda nas coletas, a Hermes José Schmitz, pelo envio de alguns representantes de *Z. dispar* e a Ana Lúcia de Paula Ribeiro pela identificação preliminar de alguns espécimes. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaike, H. **A new look at the statistical model identification.** IEEE Trans Automat Contr, vol. 19, p. 716–723, 1974.

Bächli, G., Vilela, C. R., Escher, S. A., Saura, A. **The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark.** Fauna Entomol Scand, vol. 39, p. 1-362, 2004.

Bächli, G. **TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, v. 1.03, Database 2009/04. <http://taxodros.unizh.ch/>. Last accessed on 01/02/2011.

Burla, H. **Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur *Drosophila*-untergattung *Hirtodrosophila*.** Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin, vol. 32, p. 189-321, 1956.

Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., De Mattia, F. **DNA Barcode: a six question tour to improve users' awarensis about the method.** Briefings in Bioinformatics, vol. 2, p. 440-453, 2010.

de Carvalho, M. R. de, Bockmann, F. A., Amorim, D. S., Vivo, M. de, Toledo-Piza, M. de, Menezes, N. A., Figueiredo, J. L. de, McEachran, J. D. **Revisiting the Taxonomic Impediment.** Science, vol. 307, p. 353, 2005.

DeSalle, R., Egan, M. G., Siddall, M. **The unholy trinity: taxonomy species delimitation and DNA Barcode.** Philosophical Transactions of the Royal Society, vol. 360, p. 905-916, 2005.

Felsenstein, J. **Confidence limits on phylogenies: an approaching using bootstrap.** Evolution, vol. 39, p. 783-791, 1985.

Funk, D. J., Omland, K. E. **Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA.** Annual Review Ecology Systematics. vol. 34, p. 397-423, 2003.

Frota-Pessoa, O. **Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera).** Arquivos do Museu Paranaense, vol. 10, p. 253-304, 1954.

Gaston, K. J., O'Neil, M. A. **Automated species identification: why not?** Philosophical Transaction Royal Society Biological Sciences, vol.359, p. 655-667, 2004.

Goldstein, P. Z., DeSalle, R. **Integrating DNA *barcode* data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description.** Bioessays, vol. 33, p. 135-147, 2010.

Gottschalk, M. S., Hofmann, P. R. P., Valente, V. L. S. **Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil.** Check List, vol. 4, p. 485–518, 2008.

Gottschalk, M. S., Bizzo, L., Döge, J. S., Profes, M. S., Hoffmann, P. R. P., Valente, V. L. S. **Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas.** Iheringia, vol. 99, p. 442 – 448, 2009.

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

Grimaldi, D., **Revision of *Zygothrica* (Diptera, Drosophilidae), Part II. The first African species. Two New Indo-Pacific groups, and the bilineata and samoensis species group.** Am. Mus. Novit., vol 2964, p. 1-31, 1990.

Hamilton, A. J., Basset, K. K., Grimbacher, P. S., Miller, S. E., Novotny, V., Samuelson, G. A., Stork, N. E., Weiblen, G. D., Yen, J. D. L. **Quantifying uncertainty in estimation of tropical arthropod species richness.** American Naturalist, vol. 176, p. 90-95, 2010.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. **Biological identifications through DNA *barcodes*.** The Royal Society, vol. 270, p. 313-321, 2003a.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. **Barcode animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.** The Royal Society, vol. 270, p. S96-S99, 2003b.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M., Zemlak, T. S., Francis, C. M. **Identification of birds through DNA barcodes.** PLoS Biology, vol. 2, 1657-1663, 2004a.

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. **Ten species in one: DNA Barcode reveal cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.** PNAS, vol. 101, 14812-14817, 2004b.

Hebert, P. D. N., Gregory, T. R. **The promise of DNA Barcode for taxonomy.** Systematic Biology, vol. 54, p. 852-85, 2005.

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

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

Lang, B. F., Gray, M. W., Burger, G. **Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes.** Genetics, vol. 33, p. 351-397, 1999.

Linares M.C., Soto-Calderon I.D., Lees D.C., Anthony N.M. **High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: a test of the DNA Barcode approach.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 50, p. 485-495, 2009.

Markow, T. A. & O'Grady, P. M. ***Drosophila* Biology in the Genomic Age.** Genetics, vol. 177, p. 1269-1276, 2007.

Meier, R., Shiyang, K., Vaidaya, G., Ng, K. L. **DNA Barcode and Taxonomy in Diptera: A tale of high intraespecif variability and low identification success.** Systematic Biology, vol. 55, p. 715-728, 2006.

Meyer, C. P., Paulay, G. **DNA Barcode: error rates based on Comprehensive sampling.** PLoS Biology, vol. 3, p. 2229-2238, 2005.

Moritz, C. & Cicero, C. **DNA Barcode: Promise and Pitfalls.** PLoS Biology, vol. 02, p. 1529-1531, 2004.

Nylander J. A. A. **MrModeltest v2. Program distributed by the author.** Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 2004.

Remsen, J., O'Grady, P. **Phylogeny of Drosophilinae (Diptera, Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 24, p. 249-264, 2002.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. **Bold: The barcode of life Data System.** Molecular Ecology Notes, vol. 7, p. 355-364, 2007.

Roe, A. & Sperling, F. A. H. **Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I e II DNA and implications for DNA Barcode.** Molecular Phylogenetics and evolution, vol. 44, p. 325-345, 2007.

Sepel, L. M. N.; R. M. Golombieski; M. Napp & E. L. S. Loreto. **Seasonal fluctuations of *D. cestri* and *D. incompta*, two species of the *flavopilosa* group.** Drosophila Information Service, vol. 83, p. 122– 126, 2000.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. **Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers.** Annals of the Entomological Society of America, vol. 87, p. 651-701, 1994.

Staden, R. **The Staden sequence analysis package**. Molecular Biotechnology, vol. 5, p. 233-241, 1996.

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

Val, F. C., Marques, M. D., Vilela, C. R. **Drosophilidae of Neotropical Region**. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN (eds) The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, New York, p. 123-167, 1981.

Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. **DNA Barcode for ecologists**. Trends in Ecology and Evolution, vol. 24, p. 110-116, 2008.

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

Vilela, C.R. & Bächli, G. **On two Chilean species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae)**. Mitt. Schweiz. Ent. Ges, vol. 77, p. 69-79, 2004.

Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., De Meyer, M. **Comparative performances of DNA Barcode across insect order**. BMC Bioinformatics, vol. 11, 2010.

Yotoko, K. S. C., Medeiros, H. F., Solferini, V. N., Klaczko, L. B. **A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation**. Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 28, p. 614-619, 2003.

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

Whitworth, T., Dawson, R. D., Magalon, H. & Baudry, E. **DNA Barcode reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora***. Proceedings of the Royal Society, vol. 274, p. 1731-1739, 2007.

Will, K. W., and Rubinoff, D. **Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification**. Cladistics, vol. 20, p. 47–55, 2004.

Yassin, A.; Capy, P.; Madi-Ravazzi, L.; Ogereau, D.; David, J.R. **Dna barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus***. Molecular Ecology Resources, vol. 8, p. 491-501, 2008.

Yassin, A.; Markow, T.A.; Narechani, A.; O'Grady, P.; DeSalle, R. **The genus *Drosophila* is a model for testing tree – and character – based methods of species identification using Dna Barcode**. Molecular Phylogenetics and Evolution. Doi: 10.1016/j.ympev.2010.08.020, 2010.

Material Suplementar

Tabela 1S: Identificação morfológica das espécies e seus respectivos números de identificação, locais de coleta e obtenção de dados moleculares e status atual relacionado à obtenção ou não das sequências de COI e COII.

Números	Espécies/Morfotipos	Local de coleta	Sequências de	Sequências de
			COI	COII
1	<i>Zygothrica ptilialis</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
2	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
3	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H002 – fêmea – <i>Hirticornis</i> grupo)	Bosque - UFSM	OK	OK
4	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (macho)	Jardim Botânico - UFSM	-	OK
6	<i>Mycodrosophila</i> sp. (M001 - fêmea)	Jardim Botânico - UFSM	OK	OK
7	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	OK	OK
8	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	OK	OK
10	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
11	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	-	OK
12	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (macho)	Jardim Botânico - UFSM	OK	OK
13	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (fêmea)	Jardim Botânico - UFSM	--	--

14	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (fêmea)	Jardim Botânico - UFSM	OK	OK
15	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
16	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
17	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
18	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
19	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
20	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
21	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
22	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
23	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
24	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
25	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
26	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
27	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Bosque - UFSM	--	--
28	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--
29	<i>Mycodrosophila</i> sp. (M001 - macho)	Bosque - UFSM	OK	OK
30	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	--	--

31	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Bosque - UFSM	-	OK
33.1	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H002 - macho– <i>Hirticornis</i> grupo)	Bosque - UFSM	OK	OK
33.2	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H002 - fêmea– <i>Hirticornis</i> grupo)	Bosque - UFSM	OK	OK
35	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva affinis</i> 2 (H004 - fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
36	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
37	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (H004 – fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
38	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (H004 - fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
39	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
40	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (H004 – fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
42	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (H004 - fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
43	<i>Hirtodrosophila subgilva</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	--	--
44	<i>Zygothrica hypandriata/ptilialis</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	*
45	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H007-fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
46	<i>Zygothrica orbitalis</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
47	<i>Hirtodrosophila mendeli</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
48	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (H004 - fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
49	<i>Zygothrica hypandriata</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK

50	<i>Hirtodrosophila subgilva</i> affinis 2 (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
51	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (fêmea - <i>Hirticornis</i> grupo	Cascata do Mezzomo	--	--
52	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
53	<i>Zygothrica parvipoeyi</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
54	<i>Zygothrica ptilialis</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
55	<i>Zygothrica parvipoeyi</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
56	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> affinis 2 (H004 - fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
57	<i>Zygothrica parvipoeyi</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
58	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
59	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	--	--
60	<i>Hirtodrosophila subgilva</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
61	<i>Hirtodrosophila mendeli/subgilva</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	--	--
62	<i>Hirtodrosophila subgilva/levigata</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
63	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Cascata do Mezzomo	--	--
64	<i>Zygothrica ptilialis/orbitalis</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
65	<i>Zygothrica ptilialis/orbitalis</i> (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
66.1	<i>Hirtodrosophila morgani</i> affinis (macho)	Cascata do Mezzomo	OK	OK

66.2	<i>Hirtodrosophila morgani</i> affinis (fêmea)	Cascata do Mezzomo	OK	OK
67	<i>Zygothrica hypandriata</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	OK
68	<i>Zygothrica hypandriata</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	OK
69	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
70	<i>Zygothrica hypandriata</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	OK
71	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H002 - fêmea– <i>Hirticornis</i> grupo)	Morro do Elefante	OK	OK
72	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
73	<i>Zygothrica hypandriata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
74	<i>Zygothrica hypandriata</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	OK
75	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	--	--
76	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
77	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	--	--
78	<i>Zygothrica poeyi</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	OK
79	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	--	--
80	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
81	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	--	--
82	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK

83	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	--	--
84	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Morro do Elefante	*	OK
85	<i>Zygothrica hypandriata/ptilialis</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
86	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	--	--
87	<i>Zygothrica poeyi</i> (fêmea)	Morro do Elefante	OK	OK
88	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	--	--
89	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	--	--
90	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	--	--
91	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	--	--
92	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	OK
93	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Morro do Elefante	OK	*
94	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Morro do Elefante	--	--
95	<i>Zygothrica vittimaculosa</i> (sexo não determinado)	São Marcos	OK	OK
105	<i>Zygothrica vittimaculosa</i> (sexo não determinado)	Viamão	OK	OK
106	<i>Zygothrica vittimaculosa</i> (sexo não determinado)	Viamão	OK	OK
107 V	<i>Zygothrica atriangula affinis</i> (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
107 N	<i>Zygothrica atriangula affinis</i> (fêmea)	Florianópolis	*	OK

108 V	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
108 N	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
109 a	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
109 b	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
109 c	<i>Zygothrica ptilialis</i> (macho)	Florianópolis	OK	OK
109 V	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H013 - fêmea)	Florianópolis	OK	OK
109 N	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (macho)	Florianópolis	OK	*
110 V	<i>Hirtodrosophila subgilva/levigata</i> (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
110 N	<i>Hirtodrosophila subgilva/levigata</i> (fêmea)	Florianópolis	OK	*
111 V	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Florianópolis	OK	OK
111 N	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Florianópolis	*	OK
113	<i>Zygothrica poeyi</i> affinis (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
114	<i>Hirtodrosophila subgilva</i> (macho)	Florianópolis	OK	OK
115 V	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Florianópolis	*	OK
115 N	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Florianópolis	*	OK
116V	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> affinis 1 (macho)	Florianópolis	OK	OK
116 N	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> affinis 1 (macho)	Florianópolis	OK	OK

117	<i>Zygothrica orbitalis</i> (macho)	Florianópolis	OK	OK
119	<i>Hirtodrosophila</i> sp (H010 - fêmea)	Florianópolis	OK	OK
120V	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (macho)	Florianópolis	OK	OK
120N	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (macho)	Florianópolis	OK	OK
121	<i>Zygothrica poeyi</i> (macho)	Florianópolis	OK	OK
122V	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
122N	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
122.1	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis	Florianópolis	*	OK
123V	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
123b	<i>Zygothrica apopoeyi</i> affinis (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
124V	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
124.1	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (fêmea)	Florianópolis	OK	OK
124.2	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (fêmea)	Florianópolis	*	OK
125.1	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
125.2	<i>Zygothrica atriangula</i> affinis (macho)	Florianópolis	*	OK
126	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Florianópolis	OK	OK
128	<i>Zygothrica</i> sp. (H011 - fêmea)	Florianópolis	OK	*

130xV	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Viamão	OK	OK
130N	<i>Mycodrosophila</i> sp. (M001 – fêmea)	Viamão	*	OK
130int.	<i>Mycodrosophila</i> sp. (M001 - fêmea)	Viamão	*	OK
130a	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Viamão	*	OK
131	<i>Zygothrica hypandriata</i> (macho)	Viamão	*	OK
135bV	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H012 - fêmea)	Viamão	OK	OK
135bN	<i>Zygothrica ptilialis</i> (macho)	Viamão	OK	OK
135dN	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Viamão	OK	OK
136a	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Viamão	-	-
136b	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Viamão	OK	OK
136c	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Viamão	OK	OK
136d.1	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Viamão	OK	*
136d.2	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Viamão	OK	*
138	<i>Hirtodrosophila</i> sp. (H014 – fêmea)	Ivoti	OK	OK
139	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (macho)	Ivoti	OK	OK
140	<i>Zygothrica</i> sp. (Z002 - fêmea)	Ivoti	OK	OK
141a	<i>Hirtodrosophila hirticornis</i> grupo (macho)	Ivoti	OK	OK

141b	<i>Hirtodrosophila hirticornis</i> grupo (fêmea)	Ivoti	OK	OK
142	<i>Zygothrica orbitalis</i> (macho)	Ivoti	OK	OK
143	<i>Zygothrica prodispar</i> affinis (macho)	Ivoti	OK	OK
144	<i>Zygothrica dispar</i> (fêmea)	Ivoti	OK	OK
145a	<i>Zygothrica prodispar</i> (fêmea)	Ivoti	OK	OK
145b	<i>Zygothrica prodispar</i> (macho)	Ivoti	OK	OK
150	<i>Zygothrica dispar</i> (fêmea)	Ivoti	OK	OK
151	<i>Zygothrica festiva</i> affinis (macho)	Ivoti	OK	OK
152	<i>Hirtodrosophila levigata</i> (fêmea)	Ivoti	OK	OK
153	<i>Zygothrica parapoeyi</i> (macho)	Ivoti	OK	OK
154	<i>Zygothrica poeyi</i> (macho/fêmea)	Ivoti	--	--
155	<i>Zygothrica poeyi</i> (fêmea)	Viamão	OK	OK
158	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> affinis 2 (fêmea)	Pejuçara	OK	OK
159	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (macho)	Pejuçara	*	OK
162	<i>Zygothrica dispar</i> (sexo não determinado)	Florianópolis	OK	OK
163	<i>Zygothrica dispar</i> (sexo não determinado)	Florianópolis	OK	*
164	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (macho)	Santiago	*	OK

165	<i>Hirtodrosophila thoracis</i> (fêmea)	Santiago	*	OK
172	<i>Mycodrosophila projectans</i> (fêmea)	Pejuçara	*	OK
175	<i>Hirtodrosophila hirticornis</i> grupo (macho)	Pejuçara	OK	OK
179	<i>Mycodrosophila projectans</i> (macho)	Pejuçara	*	OK
181	<i>Hirtodrosophila hirticornis</i> grupo (macho)	Pejuçara	*	OK
182	<i>Hirtodrosophila mendeli</i> (macho)	Santiago	OK	OK
183	<i>Hirtodrosophila <u>mendeli</u>/morgani</i> (fêmea)	Santiago	OK	OK
193	<i>Hirtodrosophila morgani</i> affinis (fêmea)	Santiago	OK	OK
194	<i>Hirtodrosophila subgilva</i> affinis (macho)	Santiago	OK	OK
196	<i>Hirtodrosophila <u>mendeli</u>/morgani</i> (fêmea)	Santiago	OK	OK
197	<i>Hirtodrosophila <u>mendeli</u>/morgani</i> (fêmea)	Santiago	OK	OK

Notas: (-) indica os indivíduos em que a amostra de DNA terminou sem que houvesse amplificação; (--) indica os indivíduos identificados, mas que não tiveram seu DNA extraído; (*) indica os indivíduos onde não ocorreu amplificação de um ou dos dois genes em questão. Fêmeas cuja identidade não pode ser inferida com exatidão com base em caracteres morfológicos têm ambas as possibilidades apresentadas na Tabela. Epítetos sublinhados indicam a definição da espécie obtida através da análise molecular.

CAPÍTULO 3 – CONCLUSÕES FINAIS

Estudos sobre a família Drosophilidae concentram-se principalmente na região Sudeste do Brasil, porém a região Sul, em especial o estado de Santa Catarina (Gottschalk et al., 2009) vem adquirindo uma importância cada vez maior neste cenário. Ainda assim, o conhecimento envolvendo outros gêneros além de *Drosophila*, ainda permanece bastante limitado (Gottschalk et al., 2008, 2009; Döge et al. 2007).

O presente trabalho foi designado, portanto, no sentido de auxiliar na compreensão e no estabelecimento de aspectos taxonômicos e evolutivos de gêneros pouco conhecidos de Drosophilidae ecologicamente associados a fungos, como *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*.

As coletas realizadas em nosso trabalho concentram-se no estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, mas foram capazes de evidenciar a ampla distribuição e a riqueza de espécies pertencentes aos gêneros micófagos *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* que se destacam por sua associação com fungos seja como sítio de alimentação ou para oviposição. Algumas espécies como *H. mendeli*, *H. subgilva*, *H. thoracis*, *H. levigata*, *M. projectans*, *Z. parapoeyi*, *Z. poeyi*, *Z. dispar*, *Z. prodipar*, *Z. hypandriata*, *Z. orbitalis*, e *Z. ptilialis* não apresentavam registro para esta região, principalmente no estado do Rio Grande do Sul.

Drosophilidae, como diversas famílias de vários organismos, apresenta como base para a identificação de suas espécies a análise morfológica, porém muitos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de testar a eficácia da técnica de DNA *Barcode* neste processo. DNA *barcode* foi proposto por Hebert et al. (2003a, 2003b, 2004a e 2004b) e apresenta como objetivos básicos 1) a identificação de espécimes a partir de espécies já descritas e 2) a descoberta de novas espécies. Para tanto são necessários pré-requisitos como o monofiletismo na identificação de espécies e a escolha de um limiar que possibilite a diferenciação de uma ‘nova’ espécie. Inicialmente o limiar de 3% foi proposto para a separação da variação intra e interespecífica (Hebert et al. 2003a). Mais tarde o limiar proposto seria dez vezes a variação média intraespecífica (Hebert et al. 2004a), porém Yassin et al. 2010 sugere que não há um limiar único a ser utilizado especialmente para drosofilídeos e Meier et al. (2006) afirma que o limiar utilizado deve ser aquele que separa 95% das distâncias intraespecíficas.

O critério do monofiletismo foi amplamente satisfeito por nossos dados, onde, com exceção de *M. dimidiata*, todas as espécies apresentaram alto suporte para o agrupamento de suas sequências. O caso de *M. dimidiata*, que se revelou polifilética, com duas sequências que apresentam uma média de 0,143 substituições por sítio, é, provavelmente, proveniente de erros de identificação em sequências disponíveis no NCBI, o que destaca a importância de um banco de referência acurado. Entretanto, é importante ressaltar que a propriedade de monofilia inicial das espécies amostradas pode ser futuramente refutada, à medida que novas populações em extremos de distribuição, bem como espécies crípticas proximamente relacionadas, forem amostradas.

Quanto ao critério do *Barcode gap*, nossos dados mostram que, em geral, existe um *gap* entre as variações intra e interespecífica o que possibilitaria a utilização de um limiar na descoberta de novas espécies. Porém é observada uma sobreposição entre as distâncias congênicas e intergenéricas, o que, associado ao fato de que nenhum dos três gêneros (*Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*) apresentou-se monofilético, sugere dificuldades na classificação. Para as sequências destes gêneros, adotando o limiar proposto inicialmente de 3% teríamos 2,7 - 3,3% de falsos-positivos e 0,0 - 0,02% de falsos-negativos para nosso banco de dados, enquanto que se adotarmos o limiar de dez vezes a média da variação intraespecífica (7 ou 8% , para COI e COII, respectivamente) encontraríamos 0,00 - 0,33% de falsos-positivos e 0,08 - 0,13% de falsos-negativos. Aplicando-se a regra de Meier et al. (2006) que atribui como limiar o valor abaixo do qual estão 95% das distâncias intraespecíficas percebe-se que esta coincide como limiar de 3% proposto por Hebert et al. (2003a). Dessa forma, embora Virgilio et al. (2010), destaque a existência de uma grande sobreposição nas distribuições das médias de divergências intraespecíficas e interespecíficas congênicas ao comparar diversas ordens de insetos, o que acaba por não validar o limiar proposto por Hebert et al (2004a) para o seu banco de dados, diferentes regras obtêm valores aceitáveis de erros para o nosso banco de dados. Em geral, entretanto, o limiar de dez vezes a média da variação intraespecífica representa uma otimização.

Neste sentido, a técnica de DNA *Barcode* também se mostrou ótima na discriminação de fêmeas e até mesmo descoberta de espécies crípticas como ocorreu em Hebert et al. (2004b) para lepidópteros, Yassin et al. (2008) para dípteros e Yassin et al. (2009b) para ortópteros. Muitos dos nossos espécimes femininos, pela análise morfológica, apresentavam morfotipos que não permitiam a clara diferenciação entre espécies crípticas como, por exemplo, as fêmeas 35 e 36, determinadas como *H. mendeli* ou *H. subgilva*; as fêmeas 62,

110V e 110N, determinadas como *H. subgilva* ou *H. levigata*; as fêmeas 196 e 197, determinadas como *H. mendeli* ou *H. morgani*; as fêmeas 64 e 65, determinadas como *Z. ptilialis* ou *Z. orbitalis*; e a fêmea 85, determinada como *Z. hypandriata* ou *Z. ptilialis*. Vem ao caso destacar que esta dificuldade na identidade dos espécimes não ocorria com os espécimes masculinos, já que a clara identificação se dá mediante observação da genitália masculina. Em todos os casos mencionados, os dados de COI e COII (livres ou concatenados) agruparam os espécimes com 100% de confiabilidade para os suportes de bootstrap e probabilidade posterior a uma das espécies atribuídas, de forma que as fêmeas 62 e 110N revelaram-se *H. levigata*; as fêmeas 35 e 56 revelaram-se *H. subgilva* affinis 2; a fêmea 110V agrupou com *H. subgilva*; as fêmeas 196 e 197 agruparam-se com *H. mendeli*; as fêmeas 64 e 65 foram ramificaram no clado de *Z. orbitalis*; e a fêmea 85 agrupou com outros espécimes de *Z. ptilialis*.

Além disso, os dados moleculares permitiram a detecção de três MOTU's com morfotipos similares a *H. thoracis* e duas MOTU's crípticas a *H. subgilva*, além de confirmar a diferenciação de uma MOTU similar a *Z. prodispar* e outra similar a *Z. poeyi*, com relação à espécie afim. Embora em alguns casos a ausência de indivíduos masculinos dificulte a identificação exata (como para *H. thoracis* affinis 2), em outros a diferenciação com relação às espécies previamente descritas é mais clara, o que evidencia o baixo índice de conhecimento destes gêneros. Certamente, a continuidade dos trabalhos relacionados ao teste da tecnologia do DNA *barcode* se faz importante para confirmar e estender muitas das inferências possibilitadas por este trabalho, por exemplo, pela coleta de machos pertencentes a alguns dos morfotipos amostrados cuja identificação permaneceu em aberto. Entretanto, a descrição das prováveis espécies novas uma vez que sua diferenciação seja comprovada pelo uso de uma taxonomia integrativa (DeSalle et al., 2005) é imprescindível para a ampliação dos impactos esperados para este trabalho.

Por outro lado, ainda que pela análise do gene COI e dos dados concatenados tenha sido possível distinguir as duas subfamílias de Drosophilidae, notamos que *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica* se apresentam reiteradamente polifiléticos. Robe et al. (2005 e 2010a) haviam demonstrado a parafilia do gênero *Drosophila* em relação à *Hirtodrosophila*, por exemplo. Embora não tenha sido apresentado nesta dissertação, estudos pilotos demonstraram que os marcadores mitocondriais COI e COII não são informativos no sentido de revelar o posicionamento destes gêneros com relação ao gênero *Drosophila*, e estudos

posteriores deverão ser conduzidos para auxiliar na compreensão do cenário evolutivo associado à origem e diversificação de todo este conjunto de espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrel, B. G.; deBbruijn, M.H.L.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R.; Yoing, I.G. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**. *Nature*, vol. 290, p. 457-465, 1981.

Akaike, H **A new look at the statistical model identification**. *IEEE Trans Automat Contr*, vol. 19, p. 716–723, 1974.

Bächli, G. TaxoDros: **The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, v. 1.03, Database 2010/2012. <http://taxodros.unizh.ch/>. Last accessed on 01/02/2011.

Bächli, G., Vilela, C. R., Escher, S. A., Saura, A. **The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark**. *Fauna Entomol Scand*, vol. 39, p. 1-362, 2004.

Baldo, L. Bordenstein, B.; Wernegreen, J. J.; Werren, J. Widespread **Recombination Throughout Wolbachia Genomes**. *Molecular Biology and Evolution*. vol. 23, p. 437-449, 2006.

Burla, H. **Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur *Drosophila*-untergattung *Hirtodrosophila***. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, vol. 32, p. 189-321, 1956.

Burns, J. M., Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W. **DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides**. *Journal Lepidoptera Society*, vol. 63, p. 138-153, 2007.

Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hajibabaei, M. **Genitalia, DNA barcodes, larval facies, and foodplants place the mimetic species *Neoxeniades molio* in *Rhinton* (Hesperiidae: Hesperinae)**. *Journal Lepidoptera Society*, vol. 64, p. 69-78, 2010.

Caterino, M. S., SOOWON, C., Sperling, F. A. H. **The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel.** Annual Rev. Entomol., v. 45, p. 1-54, 2000.

Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A. De Mattia, F. **DNA Barcode: a six question tour to improve users' awareness about the method.** Briefings in Bioinformatics, vol. 2, p. 440-453, 2010.

Cenzi de Ré, F., Loreto, E. L. S., Robe, L. J. **Gene and species trees reveal mitochondrial and nuclear discordance in the *Drosophila cardini* group (Diptera: Drosophilidae).** Invertebrate Biology, vol. 129, p. 353-367, 2010.

Costa, F. O., J. R. DeWaard, J. Boutillier, S. Ratnasingham, R. T. Dooh, M., Hajibabaei & P. D. N. Hebert. **Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 64, p. 272-295, 2007.

Crisp, M. D., Chandler, G. T. **Paraphyletic species.** Telopea. Vol. 6, p. 813-844, 1996.

Courtney, S. P.; Kibota, T. T., Singleton, T. A. **Ecology of mushroom-feeding Drosophilidae.** Advances in Ecological Research. vol. 20, p. 225-274, 1990.

de Carvalho, M. R. de, Bockmann, F. A., Amorim, D. S., Vivo, M. de, Toledo-Piza, M. de, Menezes, N. A., Figueiredo, J. L. de, McEachran, J. D. **Revisiting the Taxonomic Impediment.** Science, vol. 307, p. 353, 2005.

de Carvalho, M. R. de, Bockmann, F. A., Amorim, D. S., Brandão, C. R. F., Vivo, M. de, Figueiredo, J. L. de, Britski, H. A., Pinna, M. C. C. de, Menezes, N. A., Marques, F. P. L., Papavero, N., Canello, E. M., Crisci, J. V., McEachran, J. D., Schelly, R. S., Lundberg, J. G., Gill, A. C., Britz, R., Wheeler, Q. D., Stiassny, M. L. J., Parenti, L. R., Page, L. M., Wheeler, W. C., Faivovich, J., Vari, R. P., Grande, L., Humphries, C. J., DeSalle, R., Ebach, M. C., Nelson, G. J. **Taxonomic Impediment or Impediment to Taxonomy? A Commentary on Systematics and the Cybertaxonomic-Automation Paradigm.** Evol. Biol., vol.34, p. 140-143, 2007.

DeSalle, R., Egan, M. G., Siddall, M. **The unholy trinity: taxonomy species delimitation and DNA Barcode.** Philosophical Transactions of the Royal Society, vol. 360, p. 905-916, 2005.

Döge, J. S., Gottschalk, M. S., Bizzo, L. E. M., Oliveira, S. C., Schmitz, H. J., Silva, V. L., Hofmann, P. R. P. **The genus *Zygothrica* Wiedemann 1830 (Diptera, Drosophilidae) in Santa Catarina state, southern Brazil: distribution and ecological notes.** Biota Neotropica, vol. 7, p. 33-36, 2007.

Emery, V. J., Landry, J. F., & Eckert, C. G. **Combing DNA Barcode and morphological analysis to identify specialist floral parasites (Lepidoptera: Coleophoridae: Momphinae: Mompha).** Molecular Ecology Resources, vol. 9, p. 217-223, 2009.

Felsenstein, J. **Confidence limits on phylogenies: an approaching using bootstrap.** Evolution, vol. 39, p. 783-791, 1985.

Funk, D. J., Omland, K. E. **Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA.** Annual Review Ecology Systematics. Vol. 34, p. 397-423, 2003.

Frota-Pessoa, O. **Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera).** Arquivos do Museu Paranaense, vol. 10, p. 253-304, 1954.

Gaston, K. J., O'Neil, M. A. **Automated species identification: why not?** Philosophical Transaction Royal Society Biological Sciences, vol.359, p. 655-667, 2004.

Giangrande, A. **Biodiversity, conservation, and the 'Taxonomic impediment'.** Aquatic Conservation: marine and freshwater ecosystems, vol. 13, p. 451-459, 2003.

Goldstein, P. Z., DeSalle, R. **Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description.** Bioessays, vol. 33, p. 135-147, 2010.

Gottschalk, M. S., Hofmann, P. R. P., Valente, V. L. S. **Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil.** Check List, vol. 4, p. 485–518, 2008.

Gottschalk, M. S., Bizzo, L., Döge, J. S., Profes, M. S., Hoffmann, P. R. P., Valente, V. L. S. **Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas.** Iheringia, vol. 99, p. 442 – 448, 2009.

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

Grimaldi, D., **Revision of *Zygothrica* (Diptera, Drosophilidae), Part II. The first African species. Two New Indo-Pacific groups, and the bilineata and samoensis species group.** Am. Mus. Novit., vol 2964, p. 1-31, 1990.

Hamilton, A. J., Basset, K. K., Grimbacher, P. S., Miller, S. E., Novotny, V., Samuelson, G. A., Stork, N. E., Weiblen, G. D., Yen, J. D. L. **Quantifying uncertainty in estimation of tropical arthropod species richness.** American Naturalist, vol. 176, p. 90-95, 2010.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. **DNA Barcode: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetic.** Trends in Genetics, vol. 23, p. 167-172, 2007.

Hatadani, L. M., McInerney, J. O., Medeiros, H. F., Junqueira, A. C. M., Azeredo-Espin, A. M., Klaczko, L. B. **Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related groups (Diptera: Drosophilidae).** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 51, p. 595-600, 2010.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. **Biological identifications through DNA barcodes.** The Royal Society, vol. 270, p. 313-321, 2003a.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. **Barcode animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.** The Royal Society, vol. 270, p. S96-S99, 2003b.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M., Zemplak, T. S., Francis, C. M. **Identification of birds through DNA barcodes.** PLoS Biology, vol. 2, 1657-1663, 2004a.

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. **Ten species in one: DNA Barcode reveal cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.** PNAS, vol. 101, 14812-14817, 2004b.

Hebert, P. D. N., Gregory, T. R. **The promise of DNA Barcode for taxonomy.** Systematic Biology, vol. 54, p. 852-85, 2005.

Herre, E. A. **Barcode helps biodiversity fly.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, p. 3949-3950, 2006.

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

Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M. **Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts.** Proceedings of the Royal Society of London. Series B, vol. 272, p. 1525-2534, 2005.

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

Kwiatowski, J., Ayala, F. J. **Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses.** Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 13, p. 319-328, 1999.

Lang, B. F., Gray, M. W., Burger, G. **Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes.** Genetics, vol. 33, p. 351-397, 1999.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. **Clustal W and Clustal X version 2.0**. *Bioinformatics*, vol. 23, p. 2947-2948, 2007.

Lefébure, T., Douady, C. J., Gouy, M., Gibert, J. **Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation**. *Molecular Phylogenetic Evolution*, vol. 40, p. 435–447, 2006.

Linares M.C., Soto-Calderon I.D., Lees D.C., Anthony N.M. **High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: a test of the DNA Barcode approach**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 50, p. 485-495, 2009.

Maekawa, K., Kitade, O., Matsumoto, T. **Molecular phylogeny of orthopteroid insects based on the mitochondrial cytochrome oxidase II gene**. *Zoological Science*, v.16, p.175-84, 1999.

Markow, T. A. & O’Grady, P. M. ***Drosophila: A guide to species identification and use***. London, Academic. 259p., 2005.

Markow, T. A. & O’Grady, P. M. ***Drosophila Biology in the Genomic Age***. *Genetics*, vol. 177, p. 1269-1276, 2007.

Meier, R., Shiyang, K., Vaidaya, G., Ng, K. L., **DNA Barcode and Taxonomy in Diptera: A tale of high intraespecif variability and low identification success**. *Systematic Biology*, vol. 55, p. 715-728, 2006.

Meyer, C. P., Paulay, G. **DNA Barcode: error rates based on Comprehensive sampling**. *PloS Biology*, vol. 3, p. 2229-2238, 2005.

Miller, K. B., Alarie, Y., Wolfe, G. W., Whiting, M. F. **Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae)**. Systematic Entomology, vol. 30, p. 499-509, 2005.

Moritz, C. & Cicero, C. **DNA Barcode: Promise and Pitfalls**. PLoS Biology, vol. 02, p. 1529-1531, 2004.

Mota, N. R., Robe, L. J., Valente, V. L. S., Budnik, M., Loreto, E. L. S. **Phylogeny of the *Drosophila mesophragmatica* group (Diptera, Drosophilidae): an example of Andean evolution**. Zoolog Sci, vol. 25, p. 526–532, 2008.

McEvey, S. F., M. Schiffer, J-L. Da Lage, J. R. David, Jr., F. Lemunier et al., **Comments on the proposed conservation of the usage of the generic name of *Drosophila* Falle'n, 1823 (Insecta, Diptera) 6 (Case 3407)**. Bull. Zool. Nomen. vol. 65, p. 147, 2008.

Nylander J. A. A. **MrModeltest v2. Program distributed by the author**. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 2004.

Ohno, S., Ishikawa, Y., Tatsuki, S., Hoshisaki, S. **Variation in mitochondrial COII gene sequences among two species of Japanese knotweed-boring moths, *Ostrinia latipennis* and *O. ovalipennis* (Lepidoptera: Crambidae)**. Bull. Entomol. Res., vol. 96, p. 243-249, 2006.

Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C. & Hanner, R. **DNA Barcode and the mediocrity of morphology**. Molecular Ecology Resources, vol. 9, p. 42-50, 2009.

Parsons, P. A. **Biodiversity conservation under global climatic change: the insect *Drosophila* as a biological indicator?** Global Ecology and Biogeography Letters, vol. 1, p. 77-83, 1991.

Pereira, S.L. **Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics**. Genetics and Molecular Ecology, vol.23, p. 745-751, 2000.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. **Bold: The *barcode* of life Data System.** Molecular Ecology Notes, vol. 7, p. 355-364, 2007.

Remigio, E. A., Hebert, P. D. N. **Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 29, p. 641-647, 2003.

Remsen, J., O'Grady, P. **Phylogeny of Drosophilinae (Diptera, Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 24, p. 249-264, 2002.

Remsen, J. DeSalle, R. **Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 9, p. 225-235, 1998.

Robe, L.J. ; Silva, L. B.; Loreto, E. L. S. **Phylogenetic relationships among four species of the guarani group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) as inferred by molecular and morphological analyses.** Revista Brasileira de Entomologia, vol. 46, n. 4, p. 515-519, 2002.

Robe, L. J., Valente, V. L. S., Budnik, M., Loreto, E. L. S. **Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 36, p. 623-640, 2005.

Robe, L. J, Loreto, E. L. S., Valente, V. L. S. **Radiation of the "Drosophila" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics.** J Zool Syst Evol Res. 2010a. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2009.00563.x

Robe, L.J., Valente, V.L.S., Loreto, E.L.S. **Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* "radiation" (Diptera: Drosophilidae).** Genetica, vol. 138, p. 725-735, 2010b.

Robe, L. J., Cordeiro, J., Loreto, E. L. S., Valente, V. L. S. **Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae).** *Genética*, vol. 138, p. 601-617, 2010c. DOI 10.1007/s10709-009-9432-5.

Roe, A. & Sperling, F. A. H. **Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I e II DNA and implications for DNA *Barcode*.** *Molecular Phylogenetics and evolution*, vol. 44, p. 325-345, 2007.

Seabra, S. G., Pina-Martins, F., Marabuto, E., Yurtsever, S., Halkka, O., Quartau, J.A., Paulo, O. S. **Molecular phylogeny aand DNA bracoding in the meadow-spittlebug *Philanenus spumarius* (Hemiptera, Cercopidae) and its related species.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 56, p. 462-467, 2010.

Seberg, O. **The future os sistematycs: Assembling the tree of life.** *The Systematist*, vol. 23, p. 2-8, 2004.

Sena, L., Vallinoto, M., Sampaio, I., Schneider, H., Ferrari, S. F., Schneider, M. P. C. **Mitochondrial COII Gene Sequences Provide New Insights into the Phylogeny of Marmoset Species Groups (Callitrichidae, Primates).** *Folia Primatol*, vol. 73, p. 240-251, 2002.

Sepel, L. M. N.; R. M. Golombieski; M. Napp & E. L. S. Loreto. **Seasonal fluctuations of *D. cestri* and *D. incompta*, two species of the *flavopilosa* group.** *Drosophila Information Service*, vol. 83, p. 122– 126, 2000.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. **Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers.** *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 87, p. 651-701, 1994.

Staden, R. **The Staden sequence analysis package.** *Molecular Biotechnology*, vol. 5, p. 233-241, 1996.

Stahulhud, J.; Desjardins, C.; Clarck, m.; Baldo, L.; Russel, J.; Werren, J.; Jaenike, J. **The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of Wolbachia.** *Molecular Ecology*, vol.19, p.1940-1952, 2010.

Stoeckle, M.; Waggoner, P. E. Ausubel, J. **O código de Barras da Vida, ilustrado.** The Rockefeller University, 2005. (traduzido por Cristina Miyaki, Universidade de São Paulo, 2007).

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

Tatarenkov, A., Kwiatowski, J., Skarecky, D., Barrio, E., Ayala, F. J. **On the evolution of Dopa decarboxylase (Dde) and *Drosophila* systematics.** *Journal of Molecular Evolution*, vol. 48, p. 445-462, 1999.

Tatarenkov, A., Ayala, F.J. **Phylogenetic relationships among species groups of the *virilis-repleta* radiation of *Drosophila*.** *Mol. Phylogenet Evol.* vol. 21, p. 327–331, 2001.

Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R.; Vogler, A. P. **A plea for DNA taxonomy.** *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 18, p. 70-74, 2003.

Throckmorton L. H. **The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*.** In: King, R. C. (ed) **Handbook of Genetics.** Plenum, New York, pp 421-469, 1975.

Toda, M. J. **DrosWLD-Species: Taxonomic Information Database for World Species of Drosophilidae.** <http://bioinfo.lowtem.hokudai.ac.jp/db/modules/stdb/>. Last accessed on 15/08/2007.

van der Linde, K., Bächli, G., Toda, M. J., Zhang, W., -X., Katoh, T., Hu, Y., Spicer, G. S. ***Drosophila* Fallen, 1823 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage.** *Bulletin of Zoological Nomenclature*, vol. 64, p. 238-342, 2007.

van der Linde, K., Houle, D. **A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and closely related genera.** *Insect systematics and Evolution*, vol. 39, p. 241-267, 2008.

van der Linde, K., Houle, D., Spicer, G. S. **A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae.** *Genetic Research*, vol 92, p. 25-38, 2010.

Val, F. C., Marques, M. D., Vilela, C. R. **Drosophilidae of Neotropical Region.** In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, New York, p. 123-167, 1981.

Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. **DNA Barcode for ecologists.** *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 24, p. 110-116, 2008.

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

Vilela, C.R., Bächli, G. **On two Chilean species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae).** *Mitt. Schweiz. Ent. Ges*, vol. 77, p. 69-79, 2004.

Yassin, A.; Capy, P.; Madi-Ravazzi, L.; Ogereau, D.; David, J.R. **Dna barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*.** *Molecular Ecology Resources*, vol. 8, p. 491-501, 2008.

Yassin, A., Amédégnato, C., Cruaud, C., Veuille, M. **Molecular taxonomy and species delimitation in Andean *Schistocerca* (Orthoptera: Acrididae).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 53, p. 404–411, 2009.

Yassin, A.; Markow, T.A.; Narechani, A.; O'Grady, P.; DeSalle, R. **The genus *Drosophila* is a model for testing tree – and character – based methods of species identification using**

DNA Barcode. Molecular Phylogenetics and Evolution. Doi: 10.1016/j.ympev.2010.08.020, 2010.

Yeates, D. K., Wiegmann, B. M. **Congruence and Controversy: Towards a higher-level phylogeny of Diptera.** Annuals Review of Entomology, vol. 44, p. 397-428, 1999.

Yotoko, K. S. C., Medeiros, H. F., Solferini, V. N., Klaczko, L. B. **A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation.** Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 28, p. 614-619, 2003.

Webb, K. E., Barnes, D. K. A., Clark, M. S., Bowden, D. A. **DNA Barcode: a molecular tool to identify Antarctic marine larvae.** Deep Sea Res. Part II, vol. 53, p. 1053-1060, 2006.

Will, K. W., and Rubinoff, D. **Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification.** Cladistics, vol. 20, p. 47-55, 2004.

Werren, J. H.; Zhang, W.; Guo, L. R. **Evolution and Phylogeny of Wolbachia: Reproductive Parasites of Arthropods.** Proceedings of the Royal Society, vol. 261, p. 55-71, 1995.

Wheeler, M. R. **The Drosophilidae: a taxonomic overview.** In: Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson, J. N. J. (eds) The genetics and biology of *Drosophila*. Academic Press, Orlando, p. 1-97, 1981.

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

Whitworth, T., Dawson, R. D., Magalon, H. & Baudry, E. **DNA Barcode reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora*.** Proceedings of the Royal Society, vol. 274, p. 1731-1739, 2007.