

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



**Genética, Ecologia e Evolução
de drosofilídeos (Insecta, Diptera) associados a flores**

Hermes José Schmitz

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Vera Lúcia da Silva Valente Gaiiesky

Porto Alegre

Abril de 2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de *Drosophila*, Departamento de Genética,
Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq).



Agradecimentos

Bom, pessoal.

A tese enfim tá pronta.

E agora, com esse simples monte de papel impresso, é inevitável pensar:

“Que contraste entre o custo, o tamanho da aparelhagem e o produto final - essa simples folha de papel onde se desenhava uma curva, um esquema ou um quadro de figuras! É sobre ela que se debruçavam os pesquisadores em busca de um ‘significado’.”

(Bruno Latour & Steve Woolgar, A Vida de Laboratório – a produção dos fatos científicos)

O que me leva a lembrar ainda que:

“Existe uma teoria que diz que, se um dia alguém descobrir exatamente para que serve o Universo e por que ele está aqui, ele desaparecerá instantaneamente e será substituído por algo ainda mais estranho e inexplicável.

Existe uma segunda teoria que diz que isso já aconteceu.”

(Douglas Adams, O Restaurante no Fim do Universo)

Agradeço e dedico esta tese a todas as pessoas que costumam se debruçar comigo sobre qualquer coisa em busca de um significado, por mais estranho e inexplicável que seja nosso universo.

Em especial:

à Vera, pela sua Valentia; pelo seu constante estímulo, apoio e deslumbramento; pelo carinho e parceria; pelo vasto conhecimento pronto a ser compartilhado, pela ampla visão que tem das coisas; pela especiação, pela genética ecológica, pela evolução...; por saber como dizer as coisas; pelas histórias...

Três pessoas foram meus grandes colaboradores nesta tese e partes essenciais do trabalho não teriam saído sem elas. Portanto, têm um merecimento especial na divisão de créditos:

- Cão (Marco Gottschalk), pela colaboração na taxonomia. São todas dele as pranchas com ilustrações de terminália masculina desta tese. Sou um grande fã delas. São a parte essencial das descrições e sua qualidade o meu maior estímulo para trabalhar com taxonomia.

- Liz (Lizandra Robe), a parceria com as seqüências e as análises filogenéticas.

- Mário (Mário Josias Müller), nas análises de comportamento de corte.

Esta tese foi acima de tudo um trabalho que só pode ser realizado pela existência de uma equipe formada por várias pessoas que juntas congregam uma variedade muito grande de conhecimentos, das quais tentei extrair um pouco de cada. Em especial, porque cada membro desta equipe esteve disposto a compartilhar, somar e multiplicar esses conhecimentos, seja com idéias, discussões, mão na massa e parcerias de todo o tipo. Neste Grupo Valente, ou polivalente, várias pessoas estiveram presentes em diferentes períodos neste grupo durante a execução desta tese: Mary, Juliana Cordeiro, Juliana WG, Mário, Carol, Bibiana, Cleverton, Dirleane, Gisele, Gilberto, Maríndia, Adriana Ludwig, Gabriela, Ferreira, Marco, Monica, Lizandra, Nina, Gilson, Jonas, Sabrina, Adriana Sassi, Ronaldo, Fabiano, Cláudia, Ana, Grazia, Victor, Élgion.

O Laboratório de *Drosophila* da UFRGS foi o local ideal para essa troca de experiências. Em especial Mary, WG, Jujuba, Mário Josias, Bibs, Carol, Ludwig, Maríndia, Dirleane forneceram apoio cotidiano, em especial com as técnicas que não me eram familiares (e Mary!, com a providencial ajuda nos últimos momentos), e fizeram do lab um ambiente ótimo para se trabalhar.

Fui muito bem recebido com cama, mesa e banho na casa de diversas pessoas durante as viagens a trabalho para esta tese, que como se não bastasse, ainda ajudaram bastante nas coletas e análises: Monica Blauth, em Pelotas, Marco Gottschalk, em Belém, Cláudia Rohde, em Recife, e Lizandra, em Santa Maria. Ana Cristina Garcia também ajudou em campo e José Ferreira dos Santos, Tania Rieger, Evilis Monte e Luciana de Souto gentilmente me enviaram moscas e flores coletadas por eles. Paulo Hofmann (UFSC), Victor Hugo Valiati (Unisinos) e Elgion Loreto (UFSM) cederam espaço e equipamentos de seus laboratórios.

Lilian Mentz, João André Jarenkow (UFRGS), Luiz Carlos Lobato, Francismeire Bonadeu da Silva e Ana Kelly Kock (Museu Paraense Emílio Goeldi) forneceram valiosas identificações de algumas espécies de plantas.

A equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS auxiliou nas análises de ultra-estrutura dos ovos.

Finalmente, mas não menos importante:

Elmo, Helen e galera dos laboratórios vizinhos, por assuntos aleatórios.

Paulo Hofmann, pelo eterno estímulo e pelo papel fundamental na minha formação.

Minha família, pelo estímulo que sempre veio de casa. Porque filho do pai e da mãe *tinha* que ir pra universidade. E não foram poucos: seis filhos, seis diplomas.

Um amigo meu, o Hércules...

Devo também à obra pioneira de Danko Brncic, sempre inspiradora.

Sumário

Resumo	06
Abstract	08
Capítulo I	
Introdução	10
Objetivos	35
Capítulo II	
The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the Brazilian fauna	36
Capítulo III	
<i>Rhinoleucophenga joaquina</i> sp. nov. (Diptera, Drosophilidae) from the Neotropical Region ..	67
Capítulo IV	
On the cryptic diversity in the <i>bromeliae</i> group of <i>Drosophila</i> (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of three new species	73
Capítulo V	
Sobre moscas e flores: uma multi-abordagem evolutiva	114
Capítulo VI	
Discussão Geral.....	155
Conclusões	160
Perspectivas	162
Referências	164
Anexos	177

A presente tese trata de espécies de drosofilídeos (Insecta, Diptera, Drosophilidae) associadas a flores, baseando-se em uma multiabordagem com informações morfológicas, ecológicas, biogeográficas, comportamentais e moleculares sobre estes organismos. Um inventário da biodiversidade de drosofilídeos associados a flores foi realizado em várias localidades do Brasil, com um amplo esforço amostral, que compreendeu amostras de flores de 125 espécies de plantas, de 47 famílias. Deste total, 56 espécies de plantas, de 18 famílias, se mostraram hospedeiras de drosofilídeos, revelando uma fauna ainda grandemente desconhecida. Das 28 espécies encontradas, 12 foram consideradas de ecologia restrita a flores, seis de biologia incerta e 10 como oportunistas. Cerca de 40% (12 espécies) da diversidade encontrada constituiu-se de espécies não descritas. Esta proporção sobe para 2/3 ao se excluir as espécies oportunistas. Entre as oportunistas foram encontradas nove espécies de *Drosophila* Fallén, 1823 e uma de *Zaprionus* Coquillett, 1901. Entre as de biologia incerta estão duas espécies de *Cladochaeta* Coquillett, 1900, uma de *Rhinoleucophenga* Hendel, 1917 e três de *Scaptomyza* Hardy, 1849. Já em relação às espécies de ecologia restrita a flores, estiveram representadas oito espécies do grupo *bromeliae* de *Drosophila*, duas espécies do subgênero *Phloridosa* Sturtevant, 1942, também de *Drosophila*, e duas espécies de *Zygothrica* Wiedemann, 1830. Uma lista completa das localidades onde foram encontradas cada uma das espécies é fornecida, incluindo vários novos registros. Também são listadas as plantas hospedeiras de cada espécie.

Quatro espécies novas de Drosophilidae são formalmente descritas: *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov., *Drosophila anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. e *D. jurubeba* sp. nov. Adicionalmente, complementos de descrição nos moldes modernos são fornecidos para *D. bromeliae* Sturtevant, 1921 e *D. bromelioides* Pavan & Cunha, 1947.

O grupo *bromeliae* de *Drosophila* foi o táxon mais representativo, tanto em número de espécies como em número de indivíduos. Oito espécies foram encontradas, seis das quais originalmente não descritas. Graus variados de amplitude de nicho foram observados, com espécies polífagas (*D. bromelioides* e *D. bromeliae*), oligófagas (*D. anaeterrae* sp. nov. e tipo III') e monófagas (*D. solani* sp. nov., *D. jurubeba* sp. nov., tipo IV' e tipo VI). As espécies monófagas apresentaram ecologia especializada em flores de *Solanum*. Estas diferenças ecológicas estiveram associadas a diferenças morfológicas, sendo observado um aumento de tamanho do ovipositor e uma redução (ou modificação) dos filamentos respiratórios dos ovos com o aumento do grau de especialização. As espécies deste grupo também puderam ser divididas em dois grupos geográficos: espécies de distribuição predominantemente meridional (*D. bromelioides*, *D. anaeterrae* sp. nov.,

D. solani sp. nov. e *D. jurubeba* sp. nov.) e espécies de distribuição predominantemente setentrional (*D. bromeliae*, tipo III', tipo IV' e tipo VI).

Experimentos de cruzamento com três espécies do grupo (*D. bromeliae*, *D. bromelioides* e *D. anaeterrae* sp. nov.) demonstraram que estas apresentam isolamento reprodutivo completo e diferenças marcantes no padrão de som de corte do macho, fator que pode estar funcionando como mantenedor do isolamento pré-zigótico entre elas.

Análises de *barcode* baseadas em seqüências de *COI* se mostraram bastante eficientes na correta discriminação de sete espécies do grupo *bromeliae* e duas espécies do subgênero *Phloridosa* (*D. denieri* Blanchard, 1938 e *D. lutzii* Sturtevant, 1916). Esta abordagem, portanto, fornece uma importante ferramenta para a identificação destas espécies, em especial de fêmeas, já que neste caso a diferenciação por morfologia se torna difícil.

Análises filogenéticas realizadas com dados moleculares, obtidos para estas espécies pela primeira vez nesta tese, a partir de seqüências dos genes mitocondriais *COI* e *COII*, sugeriram que o subgênero *Phloridosa* tenha se originado na radiação *immigrans-tripunctata* do subgênero *Drosophila* Fallén, 1823, contrariando estudos anteriores baseados em caracteres morfológicos. Os resultados aqui obtidos, entretanto, encontram respaldo em uma reavaliação da morfologia destas espécies, baseada na terminália masculina.

Por fim, análises filogenéticas com os mesmos marcadores para o grupo *bromeliae* sugerem a monofilia do grupo, sendo que as linhagens basais são representadas pelas espécies especialistas em *Solanum*, seguidas de um clado composto pelas espécies generalistas, onde as duas espécies polífagas formam as primeiras ramificações deste clado e as duas espécies oligófagas representam espécies-irmãs na extremidade terminal. A justaposição das relações filogenéticas das espécies deste grupo com as informações morfológicas e ecológicas sobre elas nos permitiram a formulação de um potencial cenário sobre a história evolutiva do grupo.

This thesis is a study on flower-breeding species of drosophilids (Insecta, Diptera, Drosophilidae) based on a multi-approach with morphological, ecological, biogeographic, behavioural and molecular information on such organisms. A biodiversity inventory of flower-breeding drosophilids was carried out in several localities in Brazil, with a broad sampling effort, comprising samples of flowers of 125 plant species, from 47 families. Overall, 56 plant species, from 18 families, showed to be hosts for drosophilid species, revealing a fauna still mostly unknown. Twenty-eight species were found, 12 of them being considered restrict flower-breeding species, six of uncertain biology and 10 opportunists. Approximately 40% (12 species) of the diversity found comprised undescribed species. This proportion raises to 2/3 if opportunist species are excluded. Within the opportunist species, nine species of *Drosophila* Fallén, 1823 and one of *Zaprionus* Coquillett, 1901 were found. The species of uncertain biology were represented by two species of *Cladochaeta* Coquillett, 1900, one of *Rhinoleucophenga* Hendel, 1917 and three of *Scaptomyza* Hardy, 1849. The restrict flower-breeding drosophilids constituted of eight species of the *bromeliae* group of *Drosophila*, two species of the subgenus *Phloridosa* Sturtevant, 1942 of *Drosophila* and two species of *Zygothrica* Wiedemann, 1830. A complete list of localities where each species was found is provided, including various new records. A list of host plants is also presented for each species.

Four species of Drosophilidae were formally described: *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov., *Drosophila anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov. Additionally, complements of description in a modern taxonomic view are provided for *D. bromeliae* Sturtevant, 1921 e *D. bromelioides* Pavan & Cunha, 1947.

The *bromeliae* group of *Drosophila* was the most representative taxon, both in number of species and individuals. Eight species were found, six of them undescribed. Varying levels of niche breadth were observed, with polyphagous (*D. bromelioides* and *D. bromeliae*), oligophagous (*D. anaeterrae* sp. nov. and type III') and monophagous (*D. solani* sp. nov., *D. jurubeba* sp. nov., type IV' and type VI) species. The monophagous species showed a specialisation in *Solanum* flowers. Such ecological differences were linked with morphological differences, with bigger oviscapts and reduced (or modified) respiratory egg filaments with the increasing of the level of specialisation. Species of this group also could be divided in two geographic groups: species with a predominantly southern distribution (*D. bromelioides*, *D. anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov.) and species with a predominantly northern distribution (*D. bromeliae*, type III', type IV' and type VI).

Crossing-experiments with three species of the group (*D. bromeliae*, *D. bromelioides* and *D. anaeterrae* sp. nov.) demonstrated that they have complete reproductive isolation and marked differences in the pattern of male courtship songs, what can be keeping premating isolation between them.

A barcode analysis based on *COI* sequences was successful in the correct discrimination between seven species of the *bromeliae* group and between two species of the subgenus *Phloridosa* (*D. denieri* Blanchard, 1938 and *D. lutzii* Sturtevant, 1916). This analysis, therefore, provides an important tool for the identification of these species, especially for females, which presents a difficult morphological discrimination.

Phylogenetic analysis performed with molecular data, obtained for the first time for these species in this thesis, based on sequences of the mitochondrial genes *COI* and *COII*, suggested that the subgenus *Phloridosa* is related to the *immigrans-tripunctata* radiation of the subgenus *Drosophila* Fallén, 1823, contrarily to previous studies based on morphological characters. The results obtained in this study, therefore, find additional support on a re-evaluation of the morphology of these species, based on the male terminalia.

Finally, phylogenetic analysis based on the same molecular markers for the *bromeliae* group suggested the monophyly of the group, with the basal lineages constituting the *Solanum*-specialised species, followed by a clade comprising the generalist species, with the polyphagous species representing the early offshoots and the oligophagous ones as a terminal pair of sister-species. The superimposition of the phylogenetic relationships of this species with the information based on morphology and ecology of these species permitted a formulation of a potential scenario of the evolutionary history of the group.

CAPÍTULO I

Introdução

Introdução

***Drosophila*, tradição, conhecimento e desconhecimento**

Há mais de um século, as moscas do gênero *Drosophila* ocupam uma posição de vanguarda no desenvolvimento do conhecimento científico na área das Ciências Biológicas. Dos trabalhos clássicos de Thomas Morgan e sua equipe com *D. melanogaster* no início do século XX, que lançaram as bases da então ainda nascente disciplina da Genética, até a genômica comparada do início do século XXI (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), poucos organismos, se é que algum, foram tão largamente utilizados como organismo-modelo para uma diversidade tão grande de experimentos e linhas de pesquisa.

Em meados do século XX, a drosófila, até então o animal preferido apenas dos geneticistas, passou a ser objeto de um grande número de pesquisas em Biologia Evolutiva, em especial através dos trabalhos liderados por Theodosius Dobzhansky. Além do grande legado que este pesquisador deixou para a Biologia, incluindo papel ativo na consolidação e na divulgação da síntese evolutiva, sua atuação foi de especial interesse para o desenvolvimento da Ciência no Brasil, já que foi em território brasileiro que grande parte de suas pesquisas foi realizada, fazendo uso da grande diversidade de drosofilídeos presente em nossos ambientes naturais. Além disso, desde sua primeira visita, em 1943, muitos pesquisadores foram formados, seja como alunos em seus cursos ou participando ativamente em seus projetos de pesquisa. Seus alunos estabeleceriam mais tarde destacados grupos de pesquisa no Brasil, em especial nas áreas de Genética e Biologia Evolutiva (Pavan & Cunha, 2003; Araújo, 2004).

Atualmente, uma rápida pesquisa na base de dados PubMed, do NCBI, usando a palavra “*Drosophila*” recupera mais de 70 mil publicações. Esta enorme quantidade de trabalhos, entretanto, pode trazer a falsa impressão de que pouco resta a conhecer sobre esses organismos. Diferentemente disto, muitos aspectos de sua biologia permanecem obscuros, em especial aqueles ligados à ecologia de populações naturais. Se por um lado a drosófila é facilmente vista como um animal de laboratório e objeto de pesquisas para a Genética, a Biologia Molecular e a Biologia do Desenvolvimento, entre outras, com muito menos freqüência ela é associada a disciplinas como Zoologia e Ecologia, e seu lugar na natureza, longe dos laboratórios, permanece relativamente negligenciado. A própria taxonomia da família Drosophilidae está longe de estar completa. Atualmente, no Taxodros (Bächli, 2010), a principal base de dados sobre taxonomia de Drosophilidae, estão listadas 4.105 espécies. Revisões taxonômicas ainda são largamente necessárias para organizar essa diversidade tão grande. A identidade de muitas espécies descritas antigamente permanece pouco definida, requerendo descrições taxonômicas modernas, em especial

de caracteres da terminália masculina, que são os mais diagnósticos para o reconhecimento e discriminação das espécies, em especial nos abundantes casos de espécies crípticas. Um grande número de espécies ainda aguarda por uma descrição formal. Esforços neste sentido têm sido realizados por pesquisadores como Gerhard Bächli, Carlos Vilela, Shane McEvey, David Grimaldi, Leónidas Tsacas e Masanori Toda.

Normalmente associados ao nome popular “mosca-das-frutas”, os membros da família Drosophilidae apresentam, entretanto, uma diversidade de nichos ecológicos muito mais ampla. Carson (1971) define os drosofilídeos como consumidores primários de microorganismos, leveduras e bactérias, associados a estágios iniciais de decomposição de plantas. Este mesmo autor cita frutos, flores, cactos, cascas de árvore, folhas, caules e raízes em decomposição, fluxos de seiva, fungos carnosos e flores vivas como sítios de alimentação ou oviposição para drosofilídeos, além de casos de minadores de folhas e simbioses (com caranguejos e cercopídeos, por exemplo). Ashburner (1981) cita exemplos adicionais de drosofilídeos vivendo como inquilinos ou predadores de outros animais, especialmente insetos, e Tosi *et al.* (1990) relatam a utilização de guano de morcego por uma espécie de *Drosophila*.

Enquanto a maior parte dos estudos com drosofilídeos enfoca espécies atraídas a armadilhas com iscas artificiais e que utilizam frutos como recurso de alimentação e oviposição, grande parte da diversidade que ocupa outros nichos ecológicos, como a oviposição em flores vivas, permanece muito pouco conhecida. Relatos sobre drosofilídeos em flores, no entanto, são antigos, no mínimo desde de Meijere (1914), que descreveu *Colocasiomyia cristata* e *C. crassipes*, originadas, respectivamente, de flores de *Colocasia antiquorum* (Araceae) e *Michelia champaca* (Magnoliaceae), na Indonésia. Tornou-se mais conhecido, entretanto, o relato feito por Sturtevant (1921), que descreveu *Drosophila florae* e *D. lutzii* a partir de espécimes emergidos de várias flores na América Central. Carson (2001), no entanto, conta que mesmo conhecendo o trabalho de Sturtevant, muitos anos mais tarde, nas décadas de 1940 e 1950, não se suspeitava ainda que flores frescas não fermentadas pudessem servir de hospedeiras para várias espécies de drosofilídeos selvagens, sendo que o conhecimento convencional permanecia o de que drosofilídeos utilizavam de forma relativamente indiscriminada material vegetal em decomposição, especialmente frutos. Este mesmo autor acrescenta ainda que poucos relatos, se é que algum, haviam sido feitos sugerindo uma forte especificidade em sítios de oviposição.

Danko Brncic, flores e moscas

Esta história começou a mudar a partir da década de 1960, em especial pelo trabalho de um pesquisador chileno, Danko Brncic. Com uma série de estudos (Brncic, 1962a, 1966, 1967, 1968,

1972), este pesquisador mostrou o que seria provavelmente a descrição mais detalhada até então da biologia de uma espécie de *Drosophila* de nicho ecológico restrito, demonstrando a estreita relação entre uma espécie monófaga, *D. flavopilosa*, e flores de *Cestrum parqui* (Solanaceae).

De acordo com estes estudos, os adultos desta espécie apresentam uma coloração amarelada críptica com as flores que habitam, e podem ser vistos voando, descansando, se alimentando, se acasalando e ovipositando nas flores de sua planta hospedeira, onde as larvas se desenvolvem, consumindo pólen e, provavelmente, seiva floral, até se transformarem em pupas. No Chile, onde estes estudos tiveram início, esta espécie foi encontrada exclusivamente em *C. parqui*, embora na Argentina ela tenha sido encontrada também em *C. euanthes*. As flutuações populacionais de *D. flavopilosa* no Chile central acompanham a floração da planta hospedeira, que vai da primavera ao outono, atingindo um máximo no verão. Poucos indivíduos são vistos no inverno. As fêmeas apresentam fecundidade baixa e ovipositam em geral um único ovo por botão floral, com o embrião já em estágio avançado de desenvolvimento. Os oviposidores apresentam importantes adaptações morfológicas, sendo fortes e salientes, com espinhos rígidos nas margens, o que deve representar um instrumento para a escarificação dos botões florais onde são colocados os ovos. O tempo de desenvolvimento ovo-adulto foi estimado entre 19 e 21 dias. Nenhuma outra espécie de *Drosophila* é capaz de explorar esta planta, sendo provavelmente uma espécie de tripe, *Thrips tabaci* (Thysanoptera), seu principal competidor, observando-se um declínio na viabilidade das larvas em locais onde a densidade destes insetos era maior. Outros insetos a interagirem com *D. flavopilosa* são *Opius trimaculatus* e *Ganaspis* sp. (Hymenoptera), duas espécies de vespas parasitóides que atacam seus estágios pré-adultos. Através de larvas coletadas diretamente dos sítios naturais de criação, este pesquisador foi capaz de descrever a estrutura cromossômica desta espécie, tanto caracterizando o cariótipo mitótico quanto elaborando um mapa dos cromossomos politênicos de glândulas salivares. Com os cromossomos politênicos, foram caracterizadas várias inversões cromossômicas, que variam em frequência em diferentes populações, com variações altitudinais, geográficas e sazonais. Budnik *et al.* (1987) também encontraram variações altitudinais na morfologia das asas desta espécie no Chile central, com machos e fêmeas respondendo diferentemente em relação à altitude: os machos apresentaram maiores asas nas regiões de altitude elevada, enquanto as fêmeas com as maiores asas estavam nas altitudes intermediárias.

Trabalhando também no Brasil, mais precisamente no Rio Grande do Sul, Brncic (1978) novamente encontrou *D. flavopilosa* associada exclusivamente a flores de *C. parqui*. No entanto, três outras espécies do grupo *flavopilosa* também foram encontradas, *D. incompta* e duas espécies até então novas para a ciência e descritas pelo pesquisador na ocasião, *D. cestri* e *D. cordeiroi*. Assim como *D. flavopilosa*, estas três espécies relacionadas também apresentam nicho ecológico

restrito a flores de *Cestrum*, embora possam explorar outras espécies além de *C. parqui*, como *C. calycinum*. Observou-se que, embora tais espécies possam ocorrer micro-simpatricamente nas mesmas flores, apresentam comportamentos de oviposição ligeiramente diferenciados: enquanto *D. flavopilosa* e *D. cestri* ovipositam em escarificações produzidas na base do botão floral, *D. incompta* oviposita na flor já aberta, em porções mais distais.

Ainda no Rio Grande do Sul, Napp & Brncic (1978) estudaram a variabilidade eletroforética de alozimas de duas espécies, *D. cestri* e *D. incompta*. Os resultados indicaram uma baixa similaridade entre as duas espécies, além de um alto polimorfismo, contrariando a idéia de que espécies de ecologia restrita apresentariam baixa variabilidade genética. Já Hofmann & Napp (1984) investigaram aspectos ecológicos e genéticos de *D. incompta* em *C. calycinum*. Foi observado que, em quase todas as flores ocupadas, apenas uma larva se desenvolvia, e que um grande número de flores não era explorado. Mais uma vez, foi encontrado um grande polimorfismo em locos alozímicos, sendo caracterizadas ainda flutuações sazonais nas frequências alélicas, bem como variações espaciais, incluindo microgeográficas. Mais recentemente, Sepel *et al.* (2000) acompanharam a dinâmica populacional de *D. cestri* e *D. incompta* em flores de *C. calycinum* no Rio Grande do Sul e observaram que a primeira foi mais comum nos períodos mais frios e úmidos e a segunda nos períodos mais quentes e secos. Foi observada ainda uma taxa de ocupação de 20% das flores, sugerindo que competição entre as duas espécies não deve ser um fator importante, já que elas parecem se alternar em abundância e grande parte do nicho permanece vago.

No estado de São Paulo, Vilela (1984a), Vilela & Pereira (1992) e Santos & Vilela (2005) também encontraram espécies do grupo *flavopilosa* em várias espécies de *Cestrum* e de uma espécie de *Sessea* (um gênero proximoamente relacionado, possivelmente sinônimo), aumentando o número de plantas hospedeiras registradas para o grupo. Como foi mostrado por estes estudos, estão presentes no estado *D. cestri*, *D. cordeiroi*, *D. incompta* e, apesar de *D. flavopilosa* estar ausente, foram encontradas duas espécies novas, *D. mariaehelenae* e *D. hollisae*, que foram descritas pelos autores. Nestes estudos, ainda se verificou que *D. cestri* e *D. cordeiroi* são as primeiras espécies a emergir das flores, seguidas de *D. incompta*, sendo as demais espécies mais raras. Adicionalmente, os trabalhos de Vilela (1984a) e Vilela & Pereira (1992) foram especialmente importantes por realizar uma revisão taxonômica das espécies brasileiras do grupo.

Apesar de representar ainda um dos modelos mais bem conhecidos de especificidade ecológica em Drosophilidae, o grupo *flavopilosa* permanece muito pouco conhecido fora do Chile ou dos estados brasileiros do Rio Grande do Sul e São Paulo. Espécies deste grupo estão presentes em toda a região neotropical, e as plantas hospedeiras de algumas delas ainda são desconhecidas.

Mais flores, mais moscas

O grupo *flavopilosa* de *Drosophila* está longe de ser apenas uma curiosa exceção dentro da família Drosophilidae em sua relação com flores. Em uma revisão sobre o assunto, Brncic (1983) listou 140 espécies de drosofilídeos relacionadas a flores como recurso de oviposição ou alimentação, em várias partes do mundo. Haja visto que esta revisão foi feita há mais de 25 anos e que estudos abordando o assunto são relativamente escassos, o número real de espécies deve ser muito maior. Ainda de acordo com Brncic (1983), é importante notar graus variados de especificidade, desde espécies que utilizam flores de forma oportunista, apenas como recurso ocasional ou secundário, passando por aquelas que apresentam uma preferência por flores, porém não são exclusivas, até aquelas que apresentam ecologia completamente restrita às flores, dependendo exclusivamente delas para completar seu ciclo de vida. Além disso, flores vivas e flores em decomposição constituem-se em recursos bastante diferentes, podendo atrair espécies diferentes de drosofilídeos: em geral, flores em decomposição atraem espécies mais oportunistas, enquanto a colonização de flores vivas requer uma performance mais especializada. Existe na literatura uma série de relatos sobre a presença de espécies de drosofilídeos em flores de forma não especializada. Estas espécies são tidas como oportunistas, de nicho amplo, por vezes referidas como *ground-feeders*, em contraposição àquelas de ecologia realmente restrita a flores. Nem sempre está claro também a natureza da interação inseto/planta nestes casos, não sendo sempre reportado se tais espécies foram realmente encontradas usando as flores vivas ou em decomposição, e se como recurso de oviposição e desenvolvimento larval ou apenas de alimentação e local de encontro de espécimes adultos.

Drosofilídeos antofílicos estão presentes em várias regiões biogeográficas. Um padrão macrogeográfico observado por Brncic (1983), entretanto, é que estes tendem a se concentrar nas regiões tropicais. Ele sugere que isto poderia ser resultado dos mesmos fatores que levam a um maior número de espécies com alto grau de especialização em outros grupos de seres vivos nos trópicos, como a maior complexidade estrutural do ambiente, a competição aumentada, a maior estabilidade climática e a grande produtividade. Muitas espécies de ecologia restrita a flores poderiam ser capazes de sobreviver nos trópicos devido à grande disponibilidade de recursos e longos períodos de floração das espécies hospedeiras. Brncic (1983) ainda chama a atenção sobre o fato de que algumas plantas cultivadas e ornamentais, introduzidas em grande parte do globo, são exploradas por espécies de drosofilídeos apenas nos trópicos, mesmo que presentes também nas regiões temperadas.

Região Neotropical

O grupo *flavopilosa*, já discutido anteriormente, permanece sem dúvida o grupo de drosofilídeos antofílicos mais bem estudados da região Neotropical. No entanto, podem ser destacados também os estudos desenvolvidos por duas pesquisadoras: Sarah Pipkin e Alice Hunter.

Pipkin (1964, 1966) coletou e descreveu várias espécies novas de *Drosophila* das florestas tropicais do Panamá, pertencentes aos grupos *xanthopallescens* e *tripunctata*, além de várias espécies de afinidade desconhecida, encontradas em flores dos gêneros *Aphelandra* (Acanthaceae), *Calathea* (Marantaceae), *Dimerocostus* (Costaceae), *Hedychium* (Zingiberaceae) e *Heliconia* (Heliconiaceae). Em um outro estudo (Pipkin *et al.*, 1966), de abordagem mais ecológica, um levantamento em flores de uma variedade de plantas nas florestas tropicais do Panamá e da Colômbia encontrou várias espécies de drosofilídeos, com uma ampla gama de níveis de especialização. Os autores concluíram que espécies monófagas tendem a explorar plantas com grandes períodos de floração e apresentam adaptações na coloração do corpo e na morfologia dos ovos e do ovipositor, enquanto espécies polífagas tendem a usar plantas com períodos de floração mais curtos e não apresentam adaptações especializadas.

Heed *et al.* (1960) foram os primeiros a reportar a presença de várias espécies de drosofilídeos não descritas em flores de diversas plantas na Colômbia. No entanto, estas espécies esperariam ainda alguns anos para serem descritas e estudadas em mais detalhe por Hunter (1979, 1988, 1992). No total, ela descreveu 13 novas espécies do grupo *onychophora* de *Drosophila*, que forma um grupo de espécies associado especialmente a flores de Asteraceae nos páramos, savanas e florestas montanas das regiões de altitude elevada da Colômbia. Segundo a autora, estas espécies não foram encontradas em estudos anteriores na região que envolveram coletas com iscas artificiais e redes entomológicas. Este grupo de moscas também apresenta um conjunto de adaptações normalmente associadas à especialização a flores, como ovos sem filamentos, viviparidade e ovipositores com morfologias não usuais. Neste caso, os ovipositores apresentam as placas bastante alargadas e cobertas lateralmente por uma porção de espinhos fortes e curtos. A autora conta ainda que não encontrou leveduras no tubo digestivo das larvas e se declara da opinião de que estas estariam consumindo os tecidos vegetais. Também foi registrada a ocorrência de *D. acroria* e outras espécies não descritas do grupo *flavopilosa* em flores de *Cestrum*, destacando-se o fato de que, mesmo onde plantas de *Cestrum* e Asteraceae ocorriam lado a lado, os grupos *flavopilosa* e *onychophora* ocorriam cada um em sua planta hospedeira correspondente.

Outros casos de drosofilídeos antofílicos na região neotropical foram estudados de forma muito menos detalhada, em geral, em estudos isolados. *Drosophila aracea* é uma espécie de afinidade desconhecida descrita por Heed & Wheeler (1957) a partir de indivíduos coletados em

inflorescências de Araceae na América Central. Posteriormente, Tsacas & Chassagnard (1992) estudaram a interação entre esta espécie e a arácea *Xanthosoma robustum*, no México, dando detalhes da morfologia tanto da mosca quanto da planta. Segundo este estudo, os ovos de *D. aracea* são colocados nas flores femininas do espádice, onde as larvas se desenvolvem, enquanto a pupa ocorre no chão. Os autores observaram que esta espécie, embora seja encontrada exclusivamente em flores de aráceas, não apresenta adaptações típicas à especialização em flores, o que os fez formular a hipótese de que ela tenha se especializado a partir de uma forma generalista apenas recentemente.

Por sua vez, o gênero *Zapriothrica* pode ser encontrado nas grandes flores de *Brugmansia* (citado na literatura como *Datura*), em especial em áreas de altitude elevada na América Central e norte da América do Sul (Wheeler, 1956, 1959, 1968), embora Heed *et al.* (1960) levantem dúvidas se neste caso as flores são usadas mesmo como sítios de oviposição ou apenas como local de acasalamento, haja visto que apesar de um grande número de indivíduos deste gênero serem encontrados nas referidas flores, poucos ou nenhum indivíduo emerge delas. O gênero *Laccodrosophila* também é reportado para flores (Wheeler, 1957, Heed *et al.*, 1960). Adicionalmente, Grimaldi *et al.* (2003) descreveram dois novos gêneros, *Palmomyia* e *Palmophila*, a partir de coletas em flores de palmeiras (Arecaceae) no Equador. A biologia de todos estes gêneros, entretanto, é bastante desconhecida. Em *Drosophila*, o subgênero *Siphlodora* também parece estar ligado a flores, no caso a inflorescências de gramíneas (Poaceae). Este táxon é composto por duas espécies: *D. sigmoides*, neártica, em *Tripsacum dactyloides* (Butler & Mettler, 1963), e *D. flexa*, neotropical, no milho (*Zea mays*) (Vilela & Bächli, 2000). Outros gêneros não exclusivamente antofílicos, mas esporadicamente relatados em flores na região neotropical são *Cladochaeta* (Grimaldi & Nguyen, 1999) e *Scaptomyza* (Brncic, 1983), assim como vários casos em *Zygothrica* (Malogolowkin, 1952; Vilela, 1984a; Grimaldi, 1987; Sepel *et al.*, 2000; Santos & Vilela, 2005).

No Brasil, a fauna de drosofilídeos associada a flores permanece ainda grandemente desconhecida. Um estudo pequeno, embora pioneiro, foi apresentado por Frota-Pessoa (1952), que coletou flores de algumas espécies de plantas de várias famílias no Rio de Janeiro, encontrando *Drosophila ananassae*, *D. bromelioides*, *D. cardinoides*, *D. denieri*, *Zygothrica dispar* e *Z. prodispar*. Bem mais tarde, Schmitz & Hofmann (2005) coletaram flores de várias espécies de *Ipomoea* (Convolvulaceae), *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) e *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, encontrando *D. bromelioides*, *D. denieri* e *D. lutzii*. Grandes levantamentos de fauna em uma ampla variedade de potenciais plantas hospedeiras ainda não foram realizados.

A maior parte dos estudos da fauna brasileira, entretanto, foi realizada com o grupo *flavopilosa*, nos estados do Rio Grande do Sul (Brncic, 1978; Napp & Brncic, 1978; Hofmann, 1984; Sepel *et al.*, 2000) e São Paulo (Vilela, 1984a; Vilela & Pereira, 1992; Santos & Vilela, 2005), como já discutidos anteriormente. Também há relatos sobre *D. flexa* em inflorescências de milho (Vilela & Bächli, 2000) e a ocorrência de algumas espécies de *Zygothrica* em *Cestrum* e *Brunfelsia* (Solanaceae) (Malogolowkin, 1952; Vilela, 1984a; Sepel *et al.*, 2000; Santos & Vilela, 2005).

Outros táxons importantes para a região neotropical, com registro no Brasil, embora apenas esparsamente abordados, são o grupo *bromeliae* e o subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*. Como estes dois táxons irão ocupar uma posição central nesta tese, cada um merecerá aqui uma seção especial.

O grupo *bromeliae* de *Drosophila*

Este grupo é atualmente composto por apenas cinco espécies de ecologia restrita a flores. Apresenta distribuição Neotropical e, a despeito de seu nome, ocorre em uma ampla gama de plantas hospedeiras. Foi proposto por Patterson & Stone (1952), inicialmente no subgênero *Sophophora*, embora posteriormente tenha sido transferido para o subgênero *Drosophila* (Throckmorton, 1962), para incluir *D. bromeliae*, *D. bromelioides* e, provavelmente, *D. florum*. Esta última foi descrita por Sturtevant (1916) a partir de espécimes da América Central. Infelizmente, nenhum outro espécime foi seguramente relacionado a ela desde então, e esta espécie ainda requer uma descrição taxonômica moderna, faltando em especial aspectos-chave como a morfologia da terminália masculina. *Drosophila bromeliae* também foi descrita a partir de indivíduos da América Central, por Sturtevant (1921), e desde então tem sido apenas esporadicamente reportada (Heed, 1956, 1957; Clayton & Wasserman, 1957; David, 1973; Lachance *et al.*, 2001). Da mesma forma, esta espécie também requer uma descrição moderna, em especial a respeito da terminália masculina. *Drosophila bromelioides* foi descrita mais tarde, no Brasil, por Pavan & Cunha (1947), tendo sido revista por Val (1982), que ilustrou a terminália masculina da espécie. Mais duas espécies foram descritas posteriormente e adicionadas ao grupo. Val & Marques (1996) descreveram *D. aguape* a partir de espécimes coletados no Pantanal brasileiro, enquanto Silva & Martins (2004) descreveram *D. speciosa* na Amazônia.

Drosophila bromelioides é registrada em vários estados brasileiros: na Bahia (Malogolowkin, 1951; Roque & Tidon, 2008), em Goiás (Chaves & Tidon, 2008), Minas Gerais (Vilela & Mori, 1999), Rio de Janeiro (Frota-Pessoa, 1952), São Paulo (Pavan & Cunha, 1947), Santa Catarina (De Toni *et al.*, 2001, 2007; Gottschalk *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2007) e no Rio Grande do Sul (Petersen, 1960; Schmitz & Hofmann, 2005). É uma espécie polífaga, encontrada em

uma grande variedade de plantas (Pavan & Cunha, 1947; Frota-Pessoa, 1952; Schmitz & Hofmann, 2005; Schmitz *et al.*, 2007). A despeito disto, esta espécie nunca recebeu um estudo detalhado sobre sua biologia.

Sobre as demais espécies do grupo, pouco se sabe sobre plantas hospedeiras. *Drosophila aguape* foi encontrada na flor do aguapé, *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) (Val & Marques, 1996), *D. bromeliae* em *Ipomoea* (Lachance *et al.*, 2001), *D. florum* em *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) e *Brugmansia* (Solanaceae) (Sturtevant, 1921) e *D. speciosa* em *Theobroma speciosum* (Malvaceae) e *Passiflora edulis* (Passifloraceae) (Silva & Martins, 2004).

Estudos ecológicos sobre este grupo são escassos. David (1973) verificou, em experimentos de laboratório, que *D. bromeliae* é sensível a baixíssimas concentrações de álcool e sugeriu que na natureza esta espécie possa estar associada a leveduras que não produzem álcool. Val & Marques (1996) reportam viviparidade para *D. aguape*. Sakai (2002), em um estudo sobre polinização de *Aristolochia inflata* e *A. maxima* (Aristolochiaceae) no Panamá, encontrou várias espécies de Drosophilidae nas flores destas plantas, incluindo espécimes referidos como *D. aff. bromeliae* e *D. aff. florum*. Esta autora concluiu que uma das espécies, *A. maxima*, é polinizada por *Drosophila*. Os indivíduos são atraídos por odores e ovipositam nos tecidos da flor, carregando pólen. Esta relação mutualística, no entanto, não é especializada.

O subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*

Este pequeno subgênero congrega sete espécies nominais restritas a flores.

Drosophila lutzii é a espécie mais bem conhecida, tendo uma ampla distribuição na Região Neotropical, do sul dos Estados Unidos até o Uruguai. Foi descrita originalmente por Sturtevant (1916), recebendo redescrições nos moldes modernos de Vilela (1984b), Vilela & Bächli (1990) e Chassagnard & Tsacas (1992). Apresenta um comportamento polífago, sendo reportada para flores de diversas famílias, entre plantas nativas e exóticas: *Allamanda* (Apocynaceae), *Cucumis melo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae), várias espécies de *Ipomoea* (Convolvulaceae), *Zantedeschia* (Liliaceae), *Bombax cyathophorum*, *Gossypium*, *Hibiscus sabdariffa*, *Hibiscus* sp. (Malvaceae), *Brugmansia arborea*, *B. candida?*, *B. suaveolens* e *Solandra nitida?* (Solanaceae) (Sturtevant, 1916, 1921, 1942; Patterson & Mainland, 1944; Hardy, 1982; Chassagnard & Tsacas, 1992; Schmitz & Hofmann, 2005; Roque & Tidon, 2008).

A despeito de sua grande distribuição no Neotrópico, a biologia desta espécie muito raramente tem sido estudada em detalhe. É seguro afirmar que sua ecologia foi muito melhor abordada no Havaí, onde ela está presente como uma espécie exótica (Hardy, 1982; Montague & Kaneshiro, 1982; Montague, 1984, 1989; Starmer & Bowles, 1994; como discutido mais adiante),

do que na área de sua distribuição nativa. Na Região Neotropical, Chassagnard & Tsacas (1992) estudaram a relação desta espécie com *Ipomoea tiliacea* no México. Os autores observaram que, em geral, as moscas colocam apenas um ovo em cada flor, na base desta. Cerca de 70% das flores analisadas por eles abrigavam ovos ou larvas. Os adultos também podem ser encontrados nas flores, mas de maneira mais agregada do que os ovos. No Brasil, a ocorrência desta espécie tem sido apenas esparsamente registrada. Schmitz & Hofmann (2005) encontraram um grande número de indivíduos em várias espécies de *Ipomoea* e em *Brugmansia suaveolens* nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Posteriormente, Roque & Tidon (2008) também encontraram esta espécie no estado de Mato Grosso, desta vez em flores de *Bombax cyathophorum* e *Hibiscus sabdariffa*. É provável, no entanto, que esta espécie seja largamente distribuída no país.

Outra espécie presente no Brasil é *Drosophila denieri*. Esta espécie foi descrita para o norte da Argentina (Blanchard, 1938) e posteriormente coletada apenas por Frota-Pessoa (1952) no Rio de Janeiro, Goñi *et al.* (1998) no Uruguai, Schmitz & Hofman (2005) no Rio Grande do Sul e Santa Catarina e Blauth & Gottschalk (2007) no Mato Grosso. Também é uma espécie polífaga. Blanchard (1938) a encontrou em *Gossypium* (Malvaceae), Frota-Pessoa (1952) em *Cordia superba* (Boraginaceae), *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) e *Brugmansia arborea* (Solanaceae), Goñi *et al.* (1998) em *C. pepo*, Schmitz & Hofmann (2005) em *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) e *C. pepo*, e Blauth & Gottschalk (2007) em Convolvulaceae. A série-tipo foi revista e redescrita por Vilela (1986).

As demais espécies são ainda menos conhecidas. *Drosophila alei* foi descrita por Brncic (1962b) e parece ter uma distribuição andina, entre o Chile e o Peru (Brncic, 1962b; Pílares & Suyo, 1982). Também foi encontrada em *Brugmansia* e *Ipomoea* (Brncic, 1962b). As demais espécies são conhecidas apenas pelo material-tipo. *Drosophila alfari* foi descrita por Sturtevant (1921), com indivíduos originados de *Brugmansia arborea* da Costa Rica. *Drosophila merzi* foi descrita apenas recentemente, por Vilela & Bächli (2002a), para o México. Os indivíduos foram coletados com rede sobre flores, mas não há informação sobre a espécie da planta. *Drosophila tristani* foi encontrada em *Ipomoea*, na Costa Rica (Sturtevant, 1921). *Drosophila cuzcoica* foi descrita por Duda (1927), para o Peru. Não há informação sobre plantas hospedeiras desta espécie. Com exceção de *D. tristani*, estas espécies receberam redescritões taxonômicas modernas (Vilela, 1984b; Vilela & Bächli, 1990, 2002b). No entanto, como *D. cuzcoica* e *D. tristani* são conhecidas apenas pelo holótipo fêmea e os principais caracteres taxonômicos de Drosophilidae são baseados na terminália masculina, sua identidade permanece obscura.

Além da Região Neotropical, importantes casos de interação drosofilídeos/flores podem ser

encontrados no Havaí, na Austrália, na Ásia, em Papua Nova Guiné e na África, como visto a seguir.

Havaí

No Havaí, que apresenta uma diversidade bastante grande de drosofilídeos, as espécies mais especializadas a flores pertencem ao subgênero *Exalloscapteromyza* de *Scapteromyza*, além de alguns outros membros dos gêneros *Scapteromyza* e *Drosophila*, que utilizam flores como recurso secundário (Magnacca *et al.*, 2008). Adicionalmente, a espécie neotropical *D. (Phloridosa) lutzii*, também é reportada para o arquipélago. Esta espécie foi registrada pela primeira vez por Hardy (1982), que a encontrou de forma abundante em flores de abóbora (*Cucurbita pepo*, Cucurbitaceae) e sugeriu que ela havia sido introduzida por meio de suas plantas hospedeiras. No entanto, Hampton Carson já teria encontrado esta espécie em uma ilha do arquipélago em 1963 (Montague & Kaneshiro, 1982).

A biologia de *S. caliginosa* foi estudada em detalhe por Montague & Kaneshiro (1982) e Montague (1984, 1989), em especial em relação a aspectos reprodutivos desta espécie em flores de *Ipomoea acuminata*. Estes mesmos estudos abordaram também a espécie introduzida *D. lutzii*, que ocorre nas mesmas flores. Montague & Kaneshiro (1982) verificaram que adultos de ambas espécies eram encontrados em maiores números nas flores expostas ao sol, mas uma maior densidade de ovos era encontrada nas flores à sombra. A espécie introduzida apresentou maior fecundidade que a nativa, embora o tamanho dos ovos fosse menor. O maior potencial reprodutivo de *D. lutzii*, segundo os autores, poderia ser assim contrabalanceado pelo maior potencial competitivo das larvas de *S. caliginosa*, maiores e mais precoces, o que poderia tornar possível a coexistência das duas espécies, naquele momento em estágio inicial de simpatria. Outro fato que facilitaria a coexistência delas no arquipélago seria a sobreposição de nicho incompleta entre elas, já que *D. lutzii* também colonizava flores de abóbora, não utilizadas por *S. caliginosa*. Mais tarde, Montague (1984) viria a observar não apenas uma maior densidade de ovos como também uma maior taxa de sobrevivência dos estágios pré-adultos de *S. caliginosa* em flores de *I. acuminata* em relação à sua potencial competidora. O número máximo de ovos observado por flor foi de seis. O tempo de desenvolvimento ovo-adulto das duas espécies foi similar, em torno de 13 dias. Uma série de experimentos em laboratório revelaram ainda que o tamanho dos adultos foi afetado pelas condições de umidade e densidade larval nas flores, enquanto o tempo de desenvolvimento foi afetado pela densidade larval e a taxa de sobrevivência dos pré-adultos foi afetada pela umidade. Nenhum destes aspectos foi afetado pela quantidade de pólen ou leveduras. Em outro estudo, Montague (1989) relatou que adultos de *S. caliginosa* apresentam comportamento agregado nas

flores de *I. acuminata*, onde ocorre a corte e a cópula. A dispersão dos ovos nas flores também mostrou um padrão de agregação. Foi estimado um tempo de desenvolvimento em torno de 3-4 dias para o desenvolvimento larval, 9-10 dias para o estágio de pupa e 4-5 dias de desenvolvimento ovariano nas fêmeas adultas precedente à primeira oviposição. Por fim, Starmer & Bowles (1994) voltaram a estudar este sistema alguns anos depois, e comparando seus dados com os produzidos cerca de uma década antes, verificaram um aumento na abundância de *D. lutzii*, sem ser observada, entretanto, diminuição nas populações de *S. caliginosa*. Observaram ainda que as duas espécies tendem a ocupar flores diferentes.

Austrália

A fauna australiana de drosofilídeos é dominada pelo gênero *Scaptodrosophila* e seus representantes antofílicos mais bem estudados são o par de espécies *S. hibisci* e *S. acclinata*.

Scaptodrosophila hibisci foi descrita pela primeira vez por Cook *et al.* (1977). Segundo estes autores, todos os estágios de vida desta espécie podem ser abundantemente encontrados em várias espécies nativas de *Hibiscus* na Austrália, embora não sejam detectados por nenhum método tradicional de coleta. Starmer *et al.* (1997) estudaram em mais detalhe as características reprodutivas desta espécie na costa leste australiana e não encontraram nenhuma relação entre o tamanho das fêmeas, o tamanho dos ovos e o número de ovariolos com o tamanho ou massa das flores, mas detectaram uma clina latitudinal no número de ovariolos, que serve como uma medida de fecundidade, sendo que as fêmeas de latitudes mais elevadas (no caso, mais meridionais) se mostraram mais fecundas, independentemente de efeitos alométricos. Estudando estas diferenças entre as populações, Starmer *et al.* (1998) sugeriram um padrão complexo em sua determinação, envolvendo efeitos genéticos aditivos, epistáticos e maternos, efeitos ambientais como temperatura e precipitação e interações genótipo/ambiente. Wolf *et al.* (2000b) também encontraram efeitos genéticos aditivos e epistáticos significantes na determinação da largura das asas nesta espécie. No entanto, experimentos posteriores sobre a fecundidade, com enfoque intra-populacional (Starmer *et al.*, 2000) trouxeram resultados contrastantes, indicando significativos efeitos genéticos aditivos, mas não epistáticos ou maternos. Também constatou-se uma alta herdabilidade nesta característica, juntamente com uma grande variação intra-populacional, sugerindo substanciais efeitos microambientais. Adicionalmente, a fecundidade de novas amostras provindas de localidades mais setentrionais da costa leste australiana e do Território do Norte não se ajustou à clina latitudinal observada pelos estudos anteriores (Wolf *et al.*, 2000a). Ao invés disto, uma nova clina em U teve de ser postulada, com as populações meridionais e setentrionais apresentando maiores fecundidades do que as populações do centro da distribuição. Fatores climáticos como temperatura e precipitação

foram levantados como potenciais causadores desta variação.

McEvey & Barker (2001) revelaram, entretanto, a existência de duas espécies de distribuição disjunta: enquanto *S. hibisci* estava restrita à costa leste australiana, as populações do Território do Norte se constituíam, na verdade, em uma segunda espécie até então não descrita, *S. acclinata*. Estes autores demonstraram ainda que as duas espécies são parcialmente interférteis e não apresentam preferências pelas diferentes espécies de *Hibiscus* utilizadas como hospedeiras.

Através de microssatélites, Barker (2005) estudou a estrutura populacional das duas espécies e concluiu que a divergência entre as duas teria ocorrido há 40.000 anos. *Scaptodrosophila acclinata* apresentou uma variabilidade genética menor que *S. hibisci*. Adicionalmente, foi verificado que populações de *S. hibisci* em diferentes plantas hospedeiras em localidades próximas apresentavam graus de divergência similares a populações da mesma planta hospedeira em localidades distantes, sugerindo a formação de raças incipientes em diferentes plantas hospedeiras (*host-races*).

Um detalhe interessante na biologia reprodutiva de *S. hibisci* foi revelado por Polak *et al.* (1998, 2001): a presença de um tampão genital (*mating plug*), com o qual o macho preenche o útero da fêmea após a cópula, com as funções de inibir novas cópulas e manter seu esperma próximo aos órgãos reservatórios da fêmea, facilitando assim a fertilização. Foi verificado que machos sexualmente ativos falharam em obter a cópula com fêmeas recém copuladas, mostrando a eficiência do tampão genital em evitar cópulas rivais. Além disso, fêmeas virgens tendem a manter o tampão genital por mais tempo, enquanto fêmeas maduras são capazes de expelir o esperma e o tampão genital assim que um oócito maduro alcança o útero, o que pode acontecer poucos instantes após a cópula. Em resposta a isso, os machos preferem fêmeas jovens e virgens, e aumentam a duração da cópula quando cruzam com fêmeas mais velhas.

Wilson *et al.* (2002, 2006) descreveram marcadores de microssatélites para esta mesma espécie, e através deles e de análises citogenéticas encontraram dois eventos raros em Drosophilidae: recombinação meiótica nos machos e a formação de um neo-Y, sugerindo a fusão do cromossomo Y com um cromossomo autossômico.

A outra espécie australiana de ecologia restrita a flores é um representante do grupo *melanogaster* de *Drosophila*. *Drosophila flavohirta* foi descrita por Malloch (1924), mas sua ecologia só foi brevemente discutida muito mais tarde, por Bock (1976). Este autor sugeriu que esta espécie se constituiria em uma forma especializada em flores de espécies de eucalipto (*Eucalyptus*, Myrtaceae). Ele destacou a coloração desta espécie, que é única no grupo *melanogaster*, completamente amarelada, incluindo as cerdas, o que a torna críptica com as flores de eucalipto que habita. Tribe (1991) observou que a maior parte das flores de eucalipto abrigam apenas um indivíduo e as pupas aderem sobre o estilete ou as anteras. As larvas se alimentam de néctar e

normalmente precisam migrar de uma flor para outra, dependendo portanto de florações em massa. São predadas por formigas e parasitadas por duas espécies de micro-himenópteros, *Aprostocetus* sp. (Eulophidae) e uma espécie de Eucoilidae (Hymenoptera). Curiosamente, esta espécie é pouco conhecida na Austrália e foi mais estudada no sul da África, onde tanto ela como sua planta hospedeira foram introduzidas (como discutido adiante).

Bock & Parsons (1981) relataram ainda a existência de *Scaptodrosophila minimeta* em flores de *Solanum torvum* e *S. mauritianum* (Solanaceae). Outras espécies australianas de *Scaptodrosophila*, *Drosophila* e *Leucophenga* usam flores como recurso não exclusivo (van Klinken & Walter, 2001).

Ásia

Na Ásia, destacam-se como os principais táxons antofílicos de Drosophilidae, o subgrupo *elegans* do grupo *melanogaster* de *Drosophila* e o gênero *Colocasiomyia*.

O subgrupo *elegans* caracteriza-se por espécies antofílicas polífagas, ocorrendo em várias plantas hospedeiras, como *Ipomoea* (Convolvulaceae) e *Brugmansia* (Solanaceae) (Prakash & Sreerama Reddy, 1979; Okada & Carson, 1982a; Sultana *et al.*, 1999; Suwito *et al.*, 2002). *Drosophila elegans* apresenta grande distribuição geográfica no extremo oriente, enquanto *D. gunungcola* está restrita a regiões de altitude elevada na Indonésia. Adicionalmente, três espécies possuem distribuição no subcontinente indiano, *D. neoelegans*, *D. subelegans* e *D. sahyadrii*. Todavia, estas últimas permanecem muito pouco conhecidas.

Drosophila gunungcola foi descoberta apenas recentemente, por Sultana *et al.* (1999). Estes autores mostraram que esta espécie estava restrita a regiões acima de 1.000 m de altitude na Indonésia (*gunung* é a palavra indonésia para montanha). *D. elegans*, que é largamente distribuída, também ocorre naquele país, em uma ampla faixa altitudinal, incluindo trechos de simpatria com *D. gunungcola*. Resultados experimentais mostraram que esta nova espécie é mais resistente ao frio e menos resistente ao calor que *D. elegans*. Dando prosseguimento a estes experimentos, Suwito *et al.* (2002) observaram que traços da história de vida destas duas espécies, como tempo de desenvolvimento pré-imaginal, tamanho dos adultos, produção de ovos, tolerância a dessecação e a fome, reagem diferentemente a condições de frio e calor em cada espécie, sendo que *D. elegans* é mais generalista em relação à temperatura, enquanto a espécie das montanhas está claramente mais adaptada a baixas temperaturas.

Kimura & Hirai (2001) estudaram detalhes da atividade de *D. elegans* em flores de *Ipomoea cairica*. Os autores encontraram resultados que sugeriram que os adultos passam a noite em flores murchas e se deslocam para novas flores recém-abertas no período da manhã. Machos apresentam

comportamento de territorialidade nessas flores novas, mostrando agressividade com outros machos e cortejando as fêmeas. Machos maiores mostraram superioridade na defesa territorial. Todavia, o aumento da abundância de moscas ao longo do dia torna a manutenção do território insustentável. As fêmeas colocam os ovos durante o dia, exclusivamente nas flores novas. A distribuição dos ovos é aleatória. Ao final do dia, as moscas permanecem nas flores mas se tornam inativas.

Drosophila elegans tem recebido atenção dos pesquisadores por apresentar dois morfos geográficos: um marrom, ao sul (Nova Guiné, Indonésia, Filipinas e China meridional), e um preto, ao norte (Taiwan e ilhas Okinawa). Em uma série de cruzamentos experimentais, Hirai & Kimura (1997) estabeleceram que esta diferença é devida a alelos autossômicos proximamente ligados, sendo o híbrido de cor intermediária. Sob o efeito de irradiação, o morfo preto sofreu maior aumento de temperatura corporal, mas não houve diferenças em relação à tolerância ao frio, ao calor e à dessecação. Também detectaram um isolamento reprodutivo incipiente entre os dois morfos, através de efeitos fracos pré e pós-zigóticos. Hirai *et al.* (1999) verificaram ainda que a duração da cópula no morfo preto é significativamente maior do que no morfo marrom. O controle genético destas diferenças também foi investigado. O reconhecimento sexual entretanto, não está relacionado com a coloração. Ishii *et al.* (2001) mostraram que o reconhecimento parece estar ligado a diferentes concentrações de pentacosenos na cutícula das fêmeas. Ishii *et al.* (2002) mostraram ainda que, embora os machos discriminem eficientemente as fêmeas dos dois morfos, eles são menos eficientes em discriminar as fêmeas do morfo oposto das fêmeas de *D. gunungcola*. Esta última espécie, segundo os autores, apresenta concentrações de pentacosenos cuticulares intermediários aos dois morfos. Em um outro estudo Yeh *et al.* (2006) estudaram o padrão de herança de dois caracteres sexuais do macho de *D. elegans*: uma mancha preta no ápice da asa e um típico comportamento de corte (*wing display*). Machos da espécie relacionada, *D. gunungcola*, não apresentam esses caracteres. Híbridos interespecíficos foram obtidos em laboratório e foi demonstrado que ambos caracteres tinham herança poligênica, embora a mancha apical da asa era condicionada principalmente por locos no cromossomo X e o comportamento de corte por locos autossômicos.

O gênero *Colocasiomyia*, por sua vez, é composto exclusivamente por espécies monófagas. A maior parte delas apresenta estreita relação com Araceae, e outras com Arecaceae e Magnoliaceae. As primeiras espécies pertencentes atualmente a este gênero, que passou por extensa modificação nomenclatural (Okada, 1988), foram descritas por de Meijere (1914) e Duda (1923; 1924), mas foi apenas a descoberta da singular ecologia deste gênero que estimulou uma série de estudos a partir do início da década de 1980. As espécies deste gênero comumente ocorrem como pares de espécies microalopátricas, dividindo a mesma inflorescência de aráceas, mas com uma

divisão de nicho, onde cada uma ocupa posições diferentes entre a parte superior, estaminada (masculina) e a parte inferior, pistilada (feminina) da inflorescência. Esta relação se repete, com diferentes pares de espécies em diferentes plantas hospedeiras e diferentes localidades. Em Papua Nova Guiné, *C. stamenicola* e *C. pistilicola* ovipositam na inflorescência de *Colocasia esculenta* com uma pequena separação de nicho, que é completa nos estágios de larva de terceiro ínstar e pupa, com *C. stamenicola* na porção estaminada e *C. pistilicola* na porção pistilada (Carson & Okada, 1980). Uma relação similar foi encontrada entre *C. alocasiae* e *C. xenalocasiae* em *Alocasia odora* em Taiwan e nas ilhas Okinawa (Okada, 1980) e na China meridional (Sultana *et al.*, 2006), entre *C. colocasiae* e *C. diconica* em *Colocasia esculenta* na Birmânia (Toda & Okada, 1983) e em Sabah, Malásia (Sultana *et al.*, 2006), entre *C. baechlii* e *C. bogneri*, em *Homalomena lancifolia* na Malásia (porção peninsular), entre *C. colocasiae* e *C. iskandari* em *Colocasia esculenta* em Java, Indonésia (Okada, 1986), *C. sp.* e *C. sulawesiana* em *Alocasia macrorrhiza* em Sulawesi, Indonésia (Okada & Yafuso, 1989) e *C. heterodonta* e *C. xanthogaster* em *Aglaonema pictum* e *Homalomena spp.*, em Java, Indonésia (Yafuso & Okada, 1990), sendo que, em cada par, a primeira espécie citada ocupa a porção estaminada e a segunda a porção pistilada da inflorescência.

Okada (1990) sugeriu que, aparentemente, há uma tendência de que espécies estamenícolas apresentem uma coloração abdominal mais clara, enquanto as espécies pistilícolas apresentam uma coloração abdominal mais escura. Segundo o autor, isto poderia ser uma adaptação ao microambiente que cada uma ocupa, já que o microambiente das estamenícolas é mais aberto e claro, enquanto o das pistilícolas é mais fechado e escuro. Em alguns casos, porém, algum membro de cada par de espécies ocorre sozinho, ou há associações de mais de duas espécies (Sultana *et al.*, 2006). Uma espécie pelo menos, *C. steudnerae*, ocorre exclusivamente sozinha em sua planta hospedeira, *Stuednera colocasiifolia*, na China, e usa tanto a porção estaminada como a pistilada da inflorescência (Takenaka *et al.*, 2006). Sultana *et al.* (2006) afirmam, entretanto, que muitas espécies adicionais têm sido encontradas no sudeste asiático, havendo mais de 40 espécies não descritas, contrastando com pouco mais de 20 descritas.

Colocasiomyia atua como polinizador de suas plantas hospedeiras, pelo menos em alguns casos. Okada (1986) relata que espécimes com pólen preso no corpo são comuns. Miyake & Yafuso (2003) comprovaram que *Alocasia odora* é polinizada pelas espécies de *Colocasomyia* que abriga. Segundo os autores, as moscas são atraídas pelos odores liberados pelo apêndice, a porção terminal do espádice que não produz flores. Embora o desenvolvimento pré-imaginal ocorra microalopatricamente, adultos das duas espécies se alimentam e acasalam na parte feminina da inflorescência, que floresce primeiro, e posteriormente, na parte masculina, que floresce depois.

Após isto, as moscas procuram outra planta e, neste movimento, as moscas acabam levando o pólen e promovendo a fecundação cruzada. Takenaka *et al.* (2006) também mostraram que *C. steudnerae* é o principal polinizador de *Stuednera colocasiifolia*, e a ecologia reprodutiva do inseto e da planta estão intimamente relacionadas. Na primeira manhã, ocorre a antese feminina e a espata que cobre o espádice se abre permitindo o acesso das moscas à parte feminina, que libera um odor atrativo. As moscas se alimentam, acasalam e ovipositam. Na manhã seguinte, ocorre a antese masculina e a liberação do pólen, enquanto a espata se abre mais e dá acesso para esta parte às moscas. Além disso, a temperatura da região masculina se eleva cerca de 2,5°C. Assim, as moscas se movem para esta região e são cobertas por pólen. Posteriormente, procuram outra inflorescência, carregando os grãos de pólen. A polinização por *Colocasiomyia* também foi comprovada em outra arácea asiática, *Furtadoa sumatrensis* (Mori & Okada, 2001).

O padrão de evolução de espécies estamenícolas e pistilícolas dentro do gênero é complexo. Semelhanças morfológicas entre espécies de diferentes localidades concordantes com o hábito estamenícola ou pistilícola foram observadas, sugerindo que um par de espécies ancestral teria desenvolvido a microalopatria e posteriormente especiado alopaticamente (Okada, 1980). No entanto, os padrões evolutivos se tornam mais obscuros assim que a grande diversidade do gênero vai sendo descoberta. Okada (1986) e Yafuso & Okada (1990) propuseram várias rotas de dispersão do gênero acompanhando as espécies hospedeiras no sudeste asiático. Sultana *et al.* (2006) encontraram evidências de que a evolução da separação de nicho microalopátrica tenha acontecido mais de uma vez dentro do gênero, pelo menos uma vez dentro do grupo *cristata* e outra no grupo *toshiokai*. Outro aspecto interessante apontado por estes últimos autores é que cada grupo de *Colocasiomyia* apresenta uma certa especialização a diferentes tribos de Araceae: o grupo *cristata* é especializado em *Colocasieae*, o grupo *toshiokai* é especializado em Homalomeneae, com utilização subsidiária de Aglaonemateae, e o grupo *baechlii* em Schismatoglottideae e Homalomeneae. Dois outros grupos são encontrados em outras famílias, o grupo *crassipes* em Magnoliaceae (gênero *Michelia*) e o grupo *zeylanica* em Arecaceae (gênero *Pinanga*).

Arengomyia é outro gênero relacionado a flores na Ásia, sendo reconhecido apenas recentemente, por Yafuso *et al.* (2008). Anteriormente, suas espécies eram classificadas como *Colocasiomyia*, mas análises cladísticas mostraram claramente se tratar de uma linhagem não relacionada (Sultana *et al.*, 2006). Yafuso *et al.* (2008) contam que as espécies pertencentes a este gênero são encontradas na Indonésia, visitando flores de palmeiras do gênero *Arenga* (Arecaceae). Apenas as flores masculinas são visitadas e não se sabe se as flores são usadas como substrato de oviposição.

Papua Nova Guiné

A fauna de drosofilídeos deste país se mostrou surpreendentemente rica em espécies antofílicas. Em uma série de quatro artigos (Carson & Okada, 1980; Okada & Carson, 1980; Okada & Carson, 1982a,b), foram descritas 37 novas espécies, a maior parte associada a flores. Entre elas, se encontra o interessante caso de *Colocasiomyia stamenicola* e *C. pistilicola*, discutido anteriormente. Os autores também relataram que após a utilização das inflorescências de *Colocasia esculenta* por estas duas espécies, as flores em estágio de decomposição ainda eram colonizadas por *Dettopsomyia repletoides* e *D. formosa*. Segundo os autores, estas espécies, especialmente a segunda, não aparentam ser altamente especializadas no recurso. No entanto, este é um bom exemplo de como as flores podem oferecer diferentes nichos para drosofilídeos, tanto microespacialmente como ao longo do tempo. No entanto, a maioria das espécies antofílicas de Papua Nova Guiné pertence ao gênero *Scaptodrosophila*, cujas principais plantas hospedeiras são as monocotiledôneas, das famílias Araceae, Marantaceae, Musaceae e Zingiberaceae. Do gênero *Drosophila*, a mais comum foi *D. spinula*, ocorrendo em várias espécies de plantas. Também estiveram presentes em Papua Nova Guiné, *D. elegans*, representante da fauna asiática, em *Ipomoea*, e *S. hibisci*, comum na Austrália, em *Hibiscus*.

África

O grupo *aterrima* de *Scaptodrosophila* forma um táxon composto por seis espécies exclusivamente antofílicas, de distribuição ampla pelo continente africano. Estas espécies são polífagas, ocorrendo em um grande número de plantas hospedeiras, sendo citadas para *Cryptostegia* (Apocynaceae), *Canna* (Cannaceae), *Ipomoea*, *Merremia* (Convolvulaceae), *Lilium* (Liliaceae), *Gossypium*, *Hibiscus*, *Sparmannia* (Malvaceae), *Datura* (*Brugmansia*?) (Solanaceae) e Cucurbitaceae (Tsacas *et al.*, 1988; Chassagnard *et al.*, 1997). Sua biologia ainda é pouco conhecida, embora pareçam ser os mais comuns habitantes de flores entre os drosofilídeos africanos. Tsacas *et al.* (1988) chamaram a atenção para uma aparente morfoclina entre as espécies deste grupo, em relação ao ovipositor da fêmea e a terminália masculina. Como os autores mostraram, as espécies cujas fêmeas exibem uma proporção maior da parte denteada do ovipositor também apresentam machos com surstilos maiores. Como estas duas estruturas entram em contato durante a cópula, é esperada uma co-adaptação entre elas. Em espécies antofílicas, a morfologia do ovipositor costuma ser reflexo das pressões seletivas relacionadas ao substrato onde são colocados os ovos, de forma que, segundo os autores, a morfologia do surstilo sofreria as pressões seletivas impostas pela modificação dos ovipositores, sendo, portanto, uma adaptação de segundo grau às condições do ambiente floral.

Outras espécies do mesmo gênero que parecem estar associadas a flores na África são *S. ebenea* e *S. pseudoebenea*, duas espécies relacionadas que foram descobertas por Graber (1957) em flores de *Hibiscus*. Outra interação drosofilídeos/flores descrita por este mesmo autor que infelizmente não foi estudada posteriormente envolve duas espécies de plantas do gênero *Momordica* (Cucurbitaceae). Segundo este pesquisador, *M. foetida* e *M. runzorica* são espécies similares que ocorrem juntas em encostas de vulcões na África central, mas são colonizadas por diferentes espécies de drosofilídeos: *Drosophila momortica* usa *M. foetida* como hospedeira, enquanto *Zaprionus momorticus* usa *M. runzorica*.

Lachaise & Tsacas (1983) ainda citam outras espécies do gênero *Zaprionus* que parecem estar exclusivamente associadas a flores nas florestas tropicais da África central. *Zaprionus vrydaghi* parece ser especialista em espécies de *Costus* (Costaceae). Esta planta produz grandes e duradouras inflorescências, com um longo eixo central onde uma grande quantidade de flores vai sendo produzida sucessivamente. Isto permite o desenvolvimento de várias gerações desta mosca. *Zaprionus badyi* e *Z. neglectus* exploram as flores de *Rothmannia whitfieldii* (Rubiaceae). Os ovos são colocados na porção apical do estigma, que forma uma estrutura ampla e gelatinosa. *Zaprionus neglectus* também é encontrada em *Crinum jagus* (Amaryllidaceae), colocando os ovos na base do pedúnculo estaminado e da corola.

D. flavohirta, a mosca australiana do eucalipto, parece ter sido introduzida na África do Sul na década de 1970, encontrando terreno favorável para a sua proliferação, haja vista a grande disponibilidade de sua planta hospedeira, também introduzida na região. Embora grandemente desconhecida em sua terra natal, na África esta espécie despertou grande interesse por se tornar competidora das abelhas no consumo de néctar e causar grande impacto econômico com o declínio na produção de mel daquele país (Lachaise & Tsacas, 1983). Posteriormente, ela foi encontrada também em Madagascar, novamente em flores de eucalipto, e desta vez também em outra mirtácea, *Eugenia jambos* (McEvey *et al.*, 1989).

Unindo morfologia, ecologia e genética: em busca de uma melhor compreensão do processo evolutivo

Powell (1997) diz estar convencido que um grande avanço para o entendimento da evolução seria obtido com a integração de conhecimentos de vários aspectos da biologia de um organismo. Este autor acrescenta ainda que *Drosophila* tem grande chance de ser o organismo ideal para este trabalho. E salienta, ainda, a importância dos estudos empíricos como a principal força condutora do desenvolvimento de princípios teóricos e gerais para o entendimento dos processos evolutivos. Além disso, defende que não é possível entender completamente a evolução de uma espécie

estudando-a isoladamente e sim, tentando entender cada espécie dentro de um contexto histórico no qual ela se insere em um grupo de espécies relacionadas unidas por um passado comum. Em suma, este autor afirma que a investigação horizontal é crucial para a biologia evolutiva, sendo a variação, e não a constância, a base da pesquisa evolutiva.

Brncic (1983) chama a atenção sobre a oportunidade que espécies de drosofilídeos com nicho ecológico restrito oferecem para o entendimento da evolução. Segundo ele, estudar essas espécies pode ser vantajoso porque permite relacionar sua estrutura genética com sua ecologia sob variáveis mais simples. As extensas pesquisas que este cientista realizou com o grupo *flavopilosa* de *Drosophila* (Brncic, 1966 e outros, como discutido anteriormente), ilustram bem esta multiabordagem envolvendo aspectos morfológicos, ecológicos e genéticos de um grupo de organismos relacionados, a fim de se tentar compreender os processos evolutivos.

Espécies cactofílicas de *Drosophila* também têm sido utilizadas como um interessante modelo para estudos focados na Genética Ecológica. Na América do Norte, quatro espécies endêmicas do deserto de Sonora e especializadas na exploração de cactos, *D. nigrospiracula*, *D. mojavensis*, *D. mettleri* (grupo *repleta*) e *D. pachea* (grupo *nannoptera*), têm recebido relativamente bastante atenção (Ward *et al.*, 1975; Heed & Mangan, 1986; Breitmeyer & Markow, 1998; Pfeiler & Markow, 2001; Hurtado *et al.*, 2004; Matzkin *et al.*, 2006; Castrezana & Markow, 2008; Bono & Markow, 2009). Na América do Sul, espécies do complexo *buzzatii* do grupo *repleta* formam um equivalente ecológico semelhante. Ao todo, sete espécies cactofílicas ocorrem ao longo de formações xerofíticas do continente, em especial nos domínios morfoclimáticos do Chaco, Cerrado e Caatinga, e na costa atlântica brasileira. Entre elas, está *D. buzzatii*, uma espécie de ampla distribuição geográfica, introduzida em várias partes do mundo junto com sua planta hospedeira, e um grupo de espécies crípticas de distribuição endêmica, originadas aparentemente após eventos de especiação dirigidos por fenômenos de expansão e retração geográfica de suas plantas hospedeiras (Silva & Sene, 1991; Ruiz *et al.*, 2000; Fanara & Hasson, 2001; Tidon-Sklorz & Sene, 2001; Moraes & Sene, 2002; Moraes *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2006; Manfrim & Sene, 2006; Soto *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2009).

Até mesmo *D. melanogaster*, uma espécie paradigma, recentemente tem sido melhor compreendida ao se estudar espécies relacionadas, pertencentes ao chamado subgrupo *melanogaster* (Lachaise *et al.*, 2000; Coyne *et al.*, 2002; Sawamura & Tomaru, 2002; David *et al.*, 2007; McBride *et al.*, 2007; Whiteman & Pierce, 2008). Este táxon inclui nove espécies próximas, mas com diferentes distribuições geográficas e requisitos ecológicos. Algumas tem distribuição cosmopolita (*D. melanogaster* e *D. simulans*), outras apresentam distribuição mais restrita no continente africano (*D. erecta*, *D. orena*, *D. teissieri* e *D. yakuba*) e outras ainda são endêmicas de

ilhas (*D. mauritiana*, *D. santomea* e *D. sechellia*). Além disso, embora a maior parte das espécies apresente uma ecologia generalista, três delas evoluíram para formas especializadas a determinados recursos (*D. erecta*, *D. santomea* e *D. sechellia*).

A integração entre disciplinas como Taxonomia e Biologia Molecular tem levado ao desenvolvimento de novas abordagens como a Sistemática Molecular e o DNA *barcode*. Esta técnica tem sido recentemente proposta como uma forma rápida, acurada e automatizada de identificação de espécies pelo uso de seqüências genéticas curtas e padronizadas. Como uma técnica nova, ela é apresentada como uma promessa para a solução de vários problemas, como a crise na taxonomia clássica, a enorme porção da biodiversidade ainda desconhecida, a existência de muitos casos de espécies crípticas não discriminadas por métodos tradicionais e diversos usos para ecologistas, conservacionistas e evolucionistas (Blaxter, 2003; Hebert *et al.*, 2003; Tautz *et al.*, 2003; Hebert & Gregory, 2005; Hebert *et al.*, 2009), mas ainda estão em debate sua real validade, aspectos metodológicos, aplicações, avanços e limitações (Will & Rubinoff, 2004; DeSalle *et al.*, 2005; Ebach & Holdredge, 2005; Frézal & Leblois, 2008). Em Drosophilidae, o *barcode* ainda tem sido pouco empregado, embora tenha sido fundamental para o descobrimento de duas espécies endêmicas da África, crípticas a *Zaprionus indianus*, uma espécie invasora e semicosmopolita (Yassin *et al.*, 2008).

A porção 5' do gene da citocromo oxidase I (*COI*) tem sido a seqüência mais amplamente utilizada nos projetos de *barcode*. Este gene, assim como outras seqüências mitocondriais, é comumente utilizado na análise filogenética (Simon *et al.*, 1994). Na filogenética molecular de Drosophilidae, além do *COI*, também são comumente empregadas seqüências dos genes mitocondriais *COII* (citocromo oxidase II), *COIII* (citocromo oxidase III), *Cyt-b* (citocromo b), *16S* (RNA ribossomal 16S), *ND1*, *ND2* e *ND5* (NADH desidrogenase subunidades 1, 2 e 5) (Gleason *et al.*, 1997; Remsen & DeSalle, 1998; O'Grady, 1999; O'Grady & Kidwell, 2002; Remsen & O'Grady, 2002; Perlman *et al.*, 2003; Yotoko *et al.*, 2003; Robe *et al.*, 2005, Silva-Bernardi *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; Hatadani *et al.*, 2009). A adição de genes nucleares, entretanto, tem sido fundamental para o aperfeiçoamento das reconstruções filogenéticas. Exemplos de genes nucleares usados freqüentemente na sistemática filogenética de Drosophilidae são: *28S* (RNA ribossomal 28S), *Adh* (álcool desidrogenase), *Amd* (alfa-metildopa), *Amyrel* (relacionado à alfa-amilase), *Ddc* (dopa-decarboxilase), *Gpdh* (glicose-3-fosfato desidrogenase) e *Sod* (superóxido desidrogenase) (Pélandakis & Solignac, 1993; Russo *et al.*, 1995; Kwiatowski & Ayala, 1999; Tataronkov *et al.*, 1999, 2001; Tataronkov & Ayala, 2001; Katoh *et al.*, 2000; Remsen & O'Grady, 2002; O'Grady & Kidwell, 2002; Robe *et al.*, 2005, 2010; Da Lage *et al.*, 2007).

Boa parte da diversidade de Drosophilidae, entretanto, permanece à parte da filogenética

molecular devido à falta de coletas de campo e ao seu desconhecimento taxonômico. As espécies neotropicais associadas a flores são um bom exemplo disto. Nenhuma informação molecular é conhecida sobre os grupos *onychophora*, *xanthopallescens* e o subgênero *Phloridosa*, por exemplo. *Drosophila aracea* é citada apenas por Da Lage *et al.* (2007) e o grupo *flavopilosa* por Robe *et al.* (2005, 2010). Do grupo *bromeliae*, *D. bromeliae* é a única espécie com algumas seqüências disponíveis (Ruiz-Linares *et al.*, 1991; Péralandakis & Solignac, 1993; Tatarenkov & Ayala, 2001; Remsen & O'Grady, 2002; Da Lage *et al.*, 2007).

Anteriores aos trabalhos moleculares, dois amplos estudos filogenéticos da família Drosophilidae se destacam. Throckmorton (1975) usou dados morfológicos, ecológicos e biogeográficos para inferir a filogenia da família. Grimaldi (1990) realizou amplo levantamento de caracteres morfológicos para uma análise cladística. As conclusões dos dois estudos, no entanto, freqüentemente não são congruentes.

Quanto ao posicionamento filogenético dos táxons neotropicais de drosofilídeos antofílicos, *D. aracea* foi relacionada à radiação *immigrans-tripunctata* do subgênero *Drosophila* (Da Lage *et al.*, 2007). Embora Grimaldi (1990) tenha apresentado uma conclusão diferente, Throckmorton (1975) e Robe *et al.* (2005, 2010) concordam em posicionar o grupo *flavopilosa* na radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila*, entre os táxons basais à radiação *repleta*. Sobre o grupo *bromeliae*, os estudos moleculares (Péralandakis & Solignac, 1993; Tatarenkov & Ayala, 2001; Remsen & O'Grady, 2002; Da Lage *et al.*, 2007; van der Linde & Houle, 2008; Robe *et al.*, 2010) também concordam com Throckmorton (1975) sobre o posicionamento deste grupo na radiação *virilis-repleta*. De forma geral, este parece ser um dos últimos táxons a se ramificar antes da radiação *repleta*, e seria relacionado ao grupo *nannoptera*. No entanto, as relações internas do grupo *bromeliae* não são conhecidas, já que apenas uma espécie foi analisada.

Já para o subgênero *Phloridosa*, os únicos dois estudos que incluíram este táxon em uma análise filogenética forneceram dados bastante incongruentes. Segundo Throckmorton (1975), este é mais um táxon a se inserir na radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila*. Já Grimaldi (1990) posicionou *Phloridosa* em uma posição basal à divergência dos subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*. Neste caso, *Phloridosa* seria grupo-irmão do subgênero *Spinodrosophila*, posteriormente transferido para o grupo *nigrosparsa* do subgênero *Drosophila* (Bächli *et al.*, 2004). A obtenção de seqüências moleculares, ainda ausentes para este táxon, poderia representar uma boa ferramenta para se tentar reavaliar seu posicionamento filogenético, dada a existência de duas hipóteses tão conflitantes a partir dos dados morfológicos.

A pré-história desta tese

As primeiras coletas de flores, cujos resultados mais tarde seriam o primeiro passo para o projeto desenvolvido nesta tese, foram feitas ainda com o objetivo de se tentar verificar que potenciais recursos tróficos poderiam ser aproveitados por drosofilídeos nos manguezais na ilha de Santa Catarina. Com certeza tais coletas não ajudaram muito na compreensão da grande diversidade de drosofilídeos coletada com armadilhas nos manguezais naquele momento (Schmitz *et al.*, 2007), exceto talvez, a respeito de *Drosophila mediostriata*, abundante tanto nos manguezais como nas flores de *Hibiscus pernambucensis*, planta típica das periferias daquele ambiente. Mas serviram para encontrar uma parte da diversidade que permanecia sem ser detectada pelos levantamentos baseados em armadilhas com iscas artificiais, a despeito de grandes esforços amostrais.

A descoberta de *Drosophila bromelioides* em abundância em flores de *H. pernambucensis* e *Ipomoea cairica* e, especialmente, de *D. lutzii*, pertencente a um subgênero, *Phloridosa*, nunca antes registrado no sul do Brasil, em flores de *I. cairica*, motivaram a obtenção de mais amostras, incluindo um maior número de espécies de *Ipomoea*, em outros ambientes e localidades. Além disso, a suspeita de se encontrar uma outra espécie do subgênero *Phloridosa* levou à procura de outras plantas. Se *D. denieri* havia sido coletada na Argentina (Blanchard, 1938), no Uruguai (Goñi *et al.*, 1998) e no Rio de Janeiro (Frota-Pessoa, 1952), ela não deveria estar presente também no sul do Brasil, geograficamente entre estes três locais? A suspeita se concretizaria de forma mais próxima do que se poderia imaginar, para ser exato, no quintal de casa. Os resultados deste pequeno esforço de coleta foram sumarizados em uma pequena publicação (Schmitz & Hofmann, 2005). Eles seriam, entretanto, logo a seguir, o ponto de partida para um Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação na Universidade Federal de Santa Catarina (Barbosa, 2006), focando ainda apenas a exploração do recurso representado por flores de *Ipomoea*.

Depois de extensos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com a fauna de drosofilídeos atraída por armadilhas com isca de banana (De Toni & Hofmann, 1995; De Toni *et al.*, 2007; Gottschalk *et al.*, 2007; Döge *et al.*, 2008; Bizzo *et al.*, no prelo; Oliveira *et al.*, não publicado), a procura pelos substratos naturais destes insetos se constituiu em uma extensão natural da pesquisa. Resultados com frutos (De Toni *et al.*, 2001; Gottschalk *et al.*, não publicado) e fungos (Gottschalk *et al.*, 2009) já estavam sendo produzidos.

Assim, decidiu-se pela realização do projeto que deu origem a esta tese. O primeiro objetivo passou a ser a realização de um amplo inventário da biodiversidade de Drosophilidae associada a flores, incluindo um grande esforço amostral e englobando uma grande variedade de espécies vegetais, possibilitando assim, o reconhecimento da amplitude de nicho e das plantas hospedeiras de cada espécie de drosofilídeo. Este inventário passou a ser realizado em um primeiro momento

nas cidades de Porto Alegre e Florianópolis e seus arredores, mas acabou se expandindo para outras localidades posteriormente. Inicialmente, os demais objetivos do presente projeto se concentravam no estudo da biologia reprodutiva, da dinâmica populacional e de outros aspectos das espécies já registradas. Os resultados do inventário, todavia, desde cedo levaram o projeto em outra direção, enfocando a diversidade, a taxonomia de uma fauna ainda grandemente desconhecida e a evolução, em especial, do grupo *bromeliae* de *Drosophila*, não mais representado apenas por *D. bromelioides*, mas por um complexo de espécies crípticas. A formação prévia em Zoologia e Ecologia capacitou a realização das etapas iniciais deste trabalho e a posterior formação como geneticista habilitou a abordagem da variabilidade genética e das relações evolutivas deste grupo de espécies.

A apresentação desta tese

O Capítulo II desta tese apresenta os resultados do inventário de drosofilídeos que utilizam flores como sítio de oviposição, revelando uma diversidade ainda grandemente desconhecida, tanto taxonomicamente quanto ecologicamente, incluindo uma grande proporção de espécies ainda não descritas. É fornecida uma lista completa das respectivas plantas hospedeiras registradas para cada espécie encontrada, assim como de localidades, incluindo vários primeiros registros.

Os capítulos III e IV desta tese são esforços para se aprimorar o pobre conhecimento taxonômico desta fauna. Assim, o Capítulo III descreve formalmente uma nova espécie do gênero *Rhinoleucophenga*, denominada aqui de *R. joaquina*, encontrada em flores de *Dyckia encholirioides* nas dunas da Joaquina, em Florianópolis, Santa Catarina. Já o Capítulo IV enfoca o grupo *bromeliae* de *Drosophila*, propondo a descrição taxonômica de três novas espécies encontradas no sul do Brasil. *Drosophila bromeliae* e *D. bromelioides* recebem um complemento de descrição nos moldes da taxonomia moderna, para fins comparativos e diagnósticos. Uma análise comparativa entre os principais caracteres discriminantes entre as cinco espécies crípticas é apresentada.

O Capítulo V apresenta uma análise comparativa de múltipla abordagem sobre o táxon mais representativo em nossas coletas, o grupo *bromeliae*, e em menor escala, o subgênero *Phloridosa*. São apresentadas novas espécies do grupo *bromeliae* não tratadas no Capítulo IV. São fornecidos dados reprodutivos, comportamentais, moleculares e filogenéticos sobre algumas espécies, de modo que, aliados às informações morfológicas e ecológicas, possam constituir em uma base para um melhor entendimento da evolução de táxons representativos da diversidade neotropical de drosofilídeos associados a flores.

Por fim, o Cap. VI apresenta uma discussão geral e apresenta um potencial cenário evolutivo para o grupo *bromeliae*, bem como as principais conclusões e perspectivas deixadas por esta tese.

Objetivos

Os objetivos desta tese, portanto, são:

- Realizar um amplo inventário da diversidade de Drosophilidae associada a flores em várias localidades do Brasil, registrando a amplitude de nicho e as plantas hospedeiras de cada espécie (Cap. II);

- Fornecer a descrição taxonômica de quatro espécies de drosofilídeos novas para a ciência, descobertas no inventário realizado, além de complementos de descrição para *D. bromeliae* e *D. bromelioides* dentro de uma abordagem taxonômica moderna (Cap. III e IV);

- Realizar uma múltipla abordagem com informações morfológicas, ecológicas, comportamentais, biogeográficas e moleculares sobre o táxon mais representativo de drosofilídeos antofílicos no Brasil, o grupo *bromeliae* de *Drosophila*, a fim de se estabelecer a história evolutiva do grupo, assim como fornecer informações filogenéticas moleculares sobre o subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*, para um melhor entendimento da evolução de drosofilídeos antofílicos neotropicais (Cap. V).

CAPÍTULO II

The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the Brazilian fauna

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Entomological Science*

The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the Brazilian fauna

Hermes J. Schmitz^{1,2} and Vera L. S. Valente^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, Av. Bento Gonçalves 9500, Bloco B, Prédio 43323, sala 210, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

² hj.schmitz@gmail.com

³ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; vera.gaiesky@ufrgs.br

Abstract

Diptera is a megadiverse order, reaching its peak of diversity in Neotropics, although our knowledge of dipteran fauna of this region is grossly deficient. This applies even for the most studied families, as Drosophilidae. Despite its position of evidence, most aspects of the biology of these insects are still poorly understood, especially those linked to natural communities. Field studies on drosophilids are highly biased to fruit-breeders species. Flower-breeding drosophilids, however, are worldwide distributed, especially in tropical regions, although being mostly neglected. The present paper shows results of a biodiversity inventory of flower-breeding drosophilids carried out in Brazil, based on samples of 125 plant species, from 47 families. Drosophilids were found in flowers of 56 plant species, of 18 families. The fauna discovered showed to be highly unknown, comprising 28 species, 12 of them (>40%) still undescribed. Not taking in account opportunist species, two thirds of the diversity exclusive from flowers were undescribed. The *bromeliae* group of *Drosophila* was the most representative taxon, with eight species (six undescribed), including four polyphagous and four *Solanum*-specialised species. Different, although morphologically and ecologically similar species were found from northern and southern localities. Other taxa of restrict flower-breeding drosophilids were the subgenus *Phloridosa* of *Drosophila* and the genus *Zygothrica*. Some specimens of the genera *Cladochaeta*, *Rhinoleucophenga* and *Scaptomyza* were found, but its relation to flowers is unclear. Additionally, ten species of ample niche were found using flowers opportunistically. Localities and host plants are recorded for all species collected.

Key words: Arthropoda, flower-breeding drosophilids, host plants, Insecta, Neotropical Region, new localities, specialisation

INTRODUCTION

Dealing with the huge diversity of living forms are one of the major challenges for biological sciences. Estimates range from three to 100 millions species, 5-10 millions being the more plausible ones, and a great portion of this biodiversity is experiencing high levels of human-caused threats (Myers *et al.*, 2000; May, 2010). The invertebrate, and especially, insect diversity account for a great proportion of the total biodiversity. Almost one million species of insects are formally described worldwide and Brazil, with a huge territory and an outstanding environmental heterogeneity, is a key country in this context, housing the highest insect diversity of the world. Estimates indicate that Brazilian fauna harbours 500 thousands to one million insect species, around 10% of the insect diversity of the Earth (Rafael *et al.*, 2009).

Diptera is one of the megadiverse orders, comprising alone about 10% of the world's biodiversity. Neotropics appear to be the most diverse region in these insects, although our knowledge of Neotropical dipteran fauna remains grossly deficient (Brown, 2005). This is not untrue even for the most studied families, as Drosophilidae. For more than one century, species of this family are largely used as model organisms for a variety of studies, especially in genetical research. This undoubtedly has brought an exceptional attention for this group of organisms, stimulating early studies on taxonomy and natural history of the family (Sturtevant, 1916, 1921; Duda, 1925, 1927). In spite of this position of evidence, most aspects of the biology of these insects are poorly understood, especially those linked to natural communities.

The diversity of the family is also barely assessed. This family is one of the larger in Diptera, possessing more than 4,000 described species (Bächli, 2010), besides a great number waiting for recognition. The Brazilian fauna of drosophilids has for long being researched (Dobzhansky & Pavan, 1943, 1950; Pavan & Cunha, 1947). The number of drosophilid species currently recorded for Brazil is 304 (Gottschalk *et al.*, 2008). Although a big number, it represents, therefore, an underestimate of the total diversity. Records of drosophilids in Brazilian territory are strikingly concentrated to some regions, and inventories for most regions are still lacking (Chaves & Tidon, 2008; Gottschalk *et al.*, 2008). Furthermore, samples are greatly biased to fruit-breeders and species attracted to banana-baited traps.

Brncic (1983) listed 140 species of drosophilids associated to flowers in some manner worldwide. This number includes from very generalist species, which use flowers opportunistically, to specialised species, which depend on the flowers in all stages of life cycle. These last species are rarely detected in the traditional samples taken with fruit baits. In Neotropics, the best well-studied flower-specialised species belong to the *flavopilosa* group of *Drosophila* Fallén, 1823 (Brncic,

1962, 1966, 1978; Hofmann & Napp, 1984; Sepel *et al.*, 2000; Santos & Vilela, 2005), restrict to flowers of plants of the genus *Cestrum*. Other notable flower-breeding taxa in Neotropical Region are the groups *bromeliae*, *onychophora*, *xanthopallescens* and the subgenus *Phloridosa* Sturtevant, 1942, all belonging to the genus *Drosophila* (Pipkin, 1964; Hunter, 1979; Chassagnard & Tsacas, 1992; Val & Marques, 1996; Silva & Martins, 2004). Flower-breeding drosophilids, therefore, are present worldwide, especially in tropical regions. Noteworthy examples are the *aterrima* group of *Scaptodrosophila* Duda, 1923, in Africa (Tsacas *et al.*, 1988), the subgenus *Exalloscapteromyza* Hardy, 1965 of *Scapteromyza* Hardy, 1949, in Hawaii (Montague & Kaneshiro, 1982; Starmer & Bowles, 1994), *Scaptodrosophila hibisci* (Bock, 1977) and *S. aclinata* (McEvey & Barker, 2001), in Australia (Cook *et al.*, 1977; McEvey & Barker, 2001), the *elegans* subgroup of the *melanogaster* group of *Drosophila* (Sultana *et al.*, 1999; Suwito *et al.*, 2002), the genus *Colocasiomyia* de Meijere, 1924 (Carson & Okada, 1980; Okada, 1986; Sultana *et al.*, 2006) and the genus *Arengomyia* Yafuso and Toda, 2008 (Yafuso *et al.*, 2008), in Asia.

Flower-breeding species are greatly neglected by the investigations in Neotropical Region and represent a good example of the still unknown fauna of drosophilids. So, we report here, a diversity inventory of the Brazilian drosophilid fauna associated with flowers, based on an ample sampling effort on a variety of plants, providing information on host plants, localities, including many new records, and the discovery of a highly unknown diversity, comprising mainly undescribed species.

MATERIAL AND METHODS

This survey was conducted in several localities throughout the Brazilian territory (Figure 1). Most of the collections were carried out in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, the two southernmost Brazilian states. Additional samples were taken from the states of Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco and Pará.

Flowers of 125 species of plants, from 47 families, were collected. They were detached during anthesis directly from the plants, or collected as recently fallen flowers on the ground. They were put in plastic bags and taken to laboratory, where they were transferred to vials with vermiculite, closed with foam stoppers and kept at 25°C, being inspected for the emergence of drosophilid imagines. In this case, the specimens were aspirated, aged for few days in standard culture medium and identified by external morphology and terminalia, consulting specialised literature. For analysis of terminalia, postabdomens were prepared following Bächli *et al.* (2004), with minor modifications. Voucher specimens will be pinned (double-mounted) and deposited in the Museu de Ciências Naturais (MCNZ), Porto Alegre, RS, Brazil.

Plant species were identified after Souza and Lorenzi (2005) and other specialised literature. Eventually, some plants were identified by specialists. The taxonomic classification follows APG II (2003), Souza and Lorenzi (2005) and other literature, when appropriate.

RESULTS

Fauna and flora

From the 125 species of plants sampled, 56 proved to be host for flower-breeding drosophilids, spread in 18 botanical families. Plant species with no emergence of drosophilids in our collections are listed in Appendix S1 in Supporting Information. The presence of drosophilids in these plant species can not, however, be discarded.

All over, 28 species of drosophilids were found. The species found were divided, *grosso modo*, in three categories: (1) “restrict” - species which were caught repeatedly and seems to use living flowers as an exclusive or at least constant breeding site (Table 1); (2) “uncertain biology” - species of genera with obscure or unknown biology and collected only occasionally (Table 2); and (3) “opportunists” - species known to be mainly fruit-breeders, using flowers only incidentally or as a secondary resource, and preferentially fallen flowers (Table 3).

Localities

The localities where which species was found are listed below. They are given from North to South, in the following format: State: Municipality, Locality (coordinates).

(1) “Restrict” flower-breeding species

bromeliae group of *Drosophila*

***D. bromeliae* Sturtevant, 1921.** Pará: Belém, Reserva do Mocambo (01°26'34.35”S; 48°24'35.59”W, 40m); Pernambuco: Recife, UFPE campus (08°03'14”S; 34°57'00”W); Recife, UFRPE campus (08°00'45”S; 34°56'57”W); Vitória de Santo Antão, IFPE/Campus Vitória (08°06'04.1”S; 35°17'41.3”W; 152m).

***D. bromelioides* Pavan and Cunha, 1947.** São Paulo: Águas de Lindóia, Morro do Cruzeiro (22°28'43”S; 46°37'34”W); Paraná: Guarapuava, Parque do Lago (25°24'9.099”S; 51°28'30.82”W); Santa Catarina: Governador Celso Ramos, Anhatomirim Island (27°25'38.09”S; 48°33'53.89”W); Florianópolis, Ratoes Grande Island (27°28'20.20”S; 48°33'43.00”W); Antônio Carlos, Centro (27°31'03.373”S; 48°46'18.23”W); Florianópolis, Ponta do Coral (27°34'23”S; 48°31'41”W); Florianópolis, Santa Mônica (27°35'34”S; 48°30'53”W); Florianópolis, Morro da Lagoa da Conceição (27°35'40.9”S; 48°28'41.6”); Florianópolis, UFSC campus (27°36'08.127”S; 48°31'30.39”W); Florianópolis, Joaquina (27°36'43.9”S; 48°26'36.3”W); Rio Grande do Sul: Caxias do Sul, Grupo de Escoteiros Saint Hilaire (29°09'38.2”S; 51°08'31.7”W, 706m); Caxias do Sul, Marcopolo/BR-116

road (29°11'06.4"S; 51°10'23.8"W, 695m); Porto Alegre, Parque Farroupilha (30°02'13.0"S; 51°13'06.0"W); Porto Alegre, Parque Maurício Sirotsky Sobrinho (30°02'34"; 51°13'55"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Porto Alegre, Parque Gabriel Knijnick (30°06'12"S; 51°12'08"W); Pelotas, Balneário dos Prazeres (31°43'28.4"S; 52°11'59.5"W; 15m, and 31°44'06.5"S; 52°12'54.1"W; 21m); Pelotas, near Laranjal (31°45'28.4"S; 52°15'42.8"W; 15m); Pelotas, Fragata (31°45'18.3"; 52°23'01.1"W; 62m); Pelotas, Fragata, near Arroio Fragata (31°45'29.5"S; 52°24'05.05"W; 62m).

Type III. Santa Catarina: Antônio Carlos, Rachadel (27°29'52.8"S; 48°47'38.6"W); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Marinha do Brasil (30°03'16.3"S; 51°13'57.8"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Pelotas, Balneário dos Prazeres (31°43'28.4"S; 52°11'59.5"W; 15m).

Type III'. Pernambuco: Recife, UFPE campus (08°03'14"S; 34°57'00"W).

Type IV. Santa Catarina: Florianópolis, Córrego Grande (27°35'37.6"S; 48°29'37.0"W); Rio Grande do Sul: Cruz Alta, CEPPA (28°34'11"S; 53°36'53"W) (*D. type IV of Hochmüller et al.*, submitted); Flores da Cunha, RS-122 road (29°01'27.9"S; 51°11'41.0"W; 729m, and 29°01'37.4"S; 51°11'43.7"W; 733m); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

Type IV'. Bahia: Itaparica, Itaparica Island, (12°54'18"S; 38°40'01"W); Minas Gerais: Monte Sião, Centro (22°25'36.16"S; 46°34'10.43"W); São Paulo: Águas de Lindóia, Morro do Cruzeiro (22°28'43"S; 46°37'34"W); Paraná: São José dos Pinhais, Águas Belas (25°32'09.71"S; 49°10'52.87"W); Santa Catarina: Antônio Carlos, Rachadel (27°29'48.02"S; 48°47'39.70"W).

Type V. Santa Catarina: Florianópolis, Córrego Grande (27°35'37.6"S; 48°29'37.0"W); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Pelotas, Balneário dos Prazeres (31°43'28.4"S; 52°11'59.5"W; 15m, and 31°44'06.5"S; 52°12'54.1"W; 21m).

Type VI. Pará: Belém, Reserva do Mocambo (01°26'34.35"S; 48°24'35.59"W, 40m).

Subgenus *Phloridosa* Sturtevant, 1942 (*Drosophila*)

***D. denieri* Blanchard, 1938.** Santa Catarina: Antônio Carlos, Centro (27°31'03.373"S; 48°46'18.23"W); Florianópolis, Ponta do Coral (27°34'23"S; 48°31'41"W); Rio Grande do Sul: Caxias do Sul, Marcopolo/BR-116 road (29°11'01.3"S; 51°10'14.4"W, 701m, and 29°11'06.4"S; 51°10'23.8"W, 695m); Porto Alegre, Parque Maurício Sirotsky Sobrinho (30°02'34"; 51°13'55"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Pelotas, Fragata (31°45'18.3"; 52°23'01.1"W; 62m); Pelotas, Fragata, near Arroio Fragata (31°45'29.5"S; 52°24'05.05"W; 62m).

***D. lutzii* Sturtevant, 1916.** São Paulo: Águas de Lindóia, Centro (22°28'17"S; 46°37'36"W); Águas de Lindóia, Morro do Cruzeiro (22°28'43"S; 46°37'34"W); Paraná: Guarapuava, Parque do Lago

(25°24'9.099"S; 51°28'30.82"W); Santa Catarina: Governador Celso Ramos, Anhatomirim Island (27°25'38.09"S; 48°33'53.89"W); Florianópolis, UFSC campus (27°36'08.127"S; 48°31'30.39"W); Rio Grande do Sul, Caxias do Sul, Marcopolo/BR-116 road (29°11'01.3"S; 51°10'14.4"W, 701m); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Maurício Sirotsky Sobrinho (30°02'34"; 51°13'55"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

Genus *Zygothrica* Wiedemann, 1830

***Z. dispar* (Wiedemann, 1830).** Santa Catarina: Florianópolis, Morro da Lagoa da Conceição (27°35'40.9"S; 48°28'41.6"W, 200m); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

Z. sp.1. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

(2) "Uncertain biology"

***Cladochaeta bupeo* Grimaldi and Nguyen, 1999.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

Cladochaeta sp.1. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Farroupilha (30°02'13.0"S; 51°13'06.0"W).

***Rhinoleucophenga joaquina* Schmitz et al., 2009.** Santa Catarina: Florianópolis, Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Joaquina (27°38'S; 48°28'W).

Scaptomyza sp.1. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque da Marinha (30°03'40.75"S; 51°13'40.75"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

Scaptomyza sp.2. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

Scaptomyza sp.2. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

(3) "Opportunists"

***D. cardinoides* Dobzhansky and Pavan, 1943.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. griseolineata* Duda, 1927.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. mediotriata* Duda, 1925.** Santa Catarina: Florianópolis, Ponta do Coral (27°34'23"S; 48°31'41"W).

***D. mediovittata* Frota-Pessoa, 1954.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. melanogaster* Meigen, 1830.** Pernambuco: Recife, UFPE campus (08°03'14"S; 34°57'00"W); Santa Catarina: Florianópolis, UFSC campus (27°36'08.127"S; 48°31'30.39"W).

***D. paulistorum* Dobzhansky and Pavan, 1949.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. simulans* Sturtevant, 1919.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. sticta* Wheeler, 1957.** Santa Catarina: Antônio Carlos, Centro (27°31'03.373"S; 48°46'18.23"W); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. tripunctata* group sp.1.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Farroupilha (30°02'13.0"S; 51°13'06.0"W).

***Zaprionus indianus* Gupta, 1970.** Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Farroupilha (30°02'13.0"S; 51°13'06.0"W).

DISCUSSION

The flower-breeding drosophilid fauna of Brazil proved to be strikingly unknown. From the 28 species found, 12 were still undescribed at the moment of collection, *i. e.*, > 40%. The ignorance in respect to this fauna is still more pronounced if one takes by side the opportunist fruit-breeders species and considers only the exclusive fauna of the flowers (our “restrict” and “uncertain biology” categories): 12 undescribed species out of 18, *i. e.*, two thirds of them. Undescribed species of drosophilids in Brazilian fauna are not uncommon, even in surveys based on banana-baited traps. Medeiros and Klaczko (2004) estimated that half of the *Drosophila* species of the state of São Paulo, the best sampled Brazilian state, was still undescribed. A high number of undescribed species was also collected in Santa Catarina, other relatively well-studied state, by Gottschalk *et al.* (2007) and Döge *et al.* (2008). The diversity of flower-breeding drosophilids, although clearly lower than that associated to fruits, appears to be still more unknown. This is especially astonishing considering that Drosophilidae is one of the most studied taxa of Diptera. Brown (2005) estimated that for the largest Diptera families, the rate of new described species is only 7.6 per year in the Neotropical region, and more than 1,000 years would be necessary to describe all species of Diptera in the world. Furthermore, a described species does not mean necessarily a well-known species: several described species found in the present survey are recorded for the first time in some Brazilian states or even in South America. In fact, drosophilid records in Brazil are strongly biased towards fruit-feeding species of *Drosophila*, especially in southeastern and southern localities (more exactly, near the main universities); moreover, about one third of the species recorded in Brazil are known for a single locality (Gottschalk *et al.*, 2008).

The restrict flower-breeding species

The species included here are thought to breed exclusively or preferentially in flowers. They are

never or rarely attracted to fruit-baited traps. The most representative taxon in this category was the *bromeliae* group of *Drosophila*.

***bromeliae* group**

This group showed to be the most speciose, with the greatest number of individuals and widespread, found in all sites surveyed (Figure 1). Altogether, eight species were found, with marked differences in geographical distribution (Figure 2) and host species (Table 1), from very generalist to ecologically specialised species. All this species are cryptic in respect to external morphology, but can be clearly discriminated by aedeagus morphology. Individuals of the polyphagous species start to emerge from flowers around 10-13 days after the field collection. The *Solanum*-specialised species take a little longer, around 13-16 days.

Drosophila bromelioides was the most conspicuous species and proved to be widely generalist, recorded in 42 host species, from 16 botanical families. Although rarely, this species is sometimes caught at low numbers even in banana-baited traps (De Toni *et al.*, 2007; Gottschalk *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2007) and under constant attention can be reared in banana-agar medium in laboratory. However, living flowers are clearly its preferred breeding site. It presented a southern distribution, in the states of Rio Grande do Sul (new southernmost locality in Pelotas), Santa Catarina, Paraná (first record) and São Paulo. Other studies have recorded it also in Goiás, Minas Gerais and Bahia (Vilela & Mori, 1999; Chaves & Tidon, 2008; Roque & Tidon, 2008). A morphologically similar species, *D. bromeliae*, was found in northern localities (Pernambuco and Pará states, first record to both) and seems to have also a similar ecology. Previously it was known only for Central America, Colombia and the Brazilian state of Mato Grosso (*Drosophila* sp.1 of Blauth & Gottschalk, 2007). It showed to be a polyphagous species, found in five host species, of five families, and also can be reared in banana-agar medium. As our sampling effort in northern Brazilian regions was lower, these numbers can not be directly compared to those of *D. bromelioides*. Future samplings in the region are necessary to clear the extent of the niche breadth of this species. It is probable that various other hosts can be found.

The other six species of the *bromeliae* group found were undescribed¹, and are mentioned herein as types III, III', IV, IV', V and VI.

Based on morphology, types III and III' are thought to be related species. The type III was found in the southern states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, while the type III' was found in the northeastern state of Pernambuco. Although also polyphagous, being found in six host species

1 Três delas são formalmente descritas no Cap. IV desta tese: as espécies mencionas aqui como “types III, IV e V” são nominadas, respectivamente, como *Drosophila anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. e *D. jurubeba* sp. nov. As demais, mencionadas aqui como “types III', IV' e VI”, embora ainda não descritas formalmente, são vistas em mais detalhe no Cap. V desta tese.

from five families, the type III exploits a very less variety of host plants comparing to the sympatric *D. bromelioides*. In turn, the type III' was found in only one host species, being more restrict that the sympatric species *D. bromeliae*. However, future sampling probably must find other host plants for it, as *Thunbergia grandiflora* is a cultivated exotic plant. Presumably, it may occupy a similar niche to its southern sibling type III, *i. e.*, polyphagous but not so generalist as *D. bromelioides* and *D. bromeliae*. Both types III and III' can be reared, although difficultly, from banana-agar medium in laboratory.

In southern localities, *D. bromelioides* and type III can occur in some hosts both sympatrically and synchronically, although seemingly with some different preferences. A great number of type III specimens were reared from *Brugmansia suaveolens*, where it generally outnumbered *D. bromelioides*. *Ipomoea alba* was an exception in its genus for apparently representing an important host for type III, whereas other species of the genus host almost exclusively *D. bromelioides*. The type III' was also found co-occurring with the more generalist *D. bromeliae* in *Thunbergia grandiflora* flowers in Pernambuco. All four species showed to be able to exploit exotic elements, suggesting that host shifts are commonplace in this group.

Contrasting to their more generalist siblings, four monophagous species complete the group, all of them using exclusively species of *Solanum* as host species. Despite some effort, no one of these species could be reared in artificial culture media in laboratory, even when some kind of *Solanum* flower juice was added to the medium. These species are being called here as types IV, IV', V and VI.

The types IV and IV' are morphologically similar and presented a north/south pattern of distribution. Despite *Solanum* sampling in northern states, the type IV was found only in the southern states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Northwards, the type IV' seems to occupy its place, being found in Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná and Santa Catarina. Santa Catarina state may represent a contact zone between the two species, where they occur sympatrically or at least parapatrically. The two localities where each species were found are distant from each other just 31,5 kilometers.

Additionally, the type V was found in the southern states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. This species share some hosts with type IV, although the two species seem to have some different host preferences. Both species exploits *Solanum paniculatum*, separately or together; in the other hand, type IV occurs solely in *S. mauritianum*, while type V is the only found in *S. sisymbriifolium*. Other *Solanum* species were less sampled, but they also shared *S. sanctaecatharinae*. The type V showed to have a niche slightly more ample, being found in six species of *Solanum*, while the type IV was found in three species. Some specimens of the generalist

D. bromelioides was reared from *Solanum* flowers, but in a few occasions and at low numbers, suggesting that these genus does not represent a main host for it. Finally, in a sample taken in the northern state of Pará, other species was found, the type VI. Its host plant, *S. stramonifolium* does not occur in southern Brazil.

Solanum is a large and worldwide distributed genus, especially in tropical and subtropical regions (Mentz & Oliveira, 2004). Species sampled in the present survey are native from Neotropics and are mostly ruderal plants, occurring in pioneer types of vegetation, in roadsides, fields and forest borders. However, no equivalent *Solanum*-specialised drosophilid is known in other parts of the world. The only literature record known by us is on the occurrence of *Scaptodrosophila minimeta* in flowers of *S. torvum* and *S. mauritianum* in Australia (Bock & Parson, 1981), but the ecology of this species is poorly known. It can be supposed that this species uses other natural resource, as both species of *Solanum* are native from Neotropics and introduced in Australia.

Figure 2 summarises the known geographical distribution of the species treated here and illustrates the north/south pattern of distribution presented by pairs of morphologically and ecologically similar species (*D. bromeliae* and *D. bromelioides*, types III and III', types IV and IV', respectively with a northern and a southern distribution).

Phloridosa

This small subgenus comprises only Neotropical flower-breeding species. Two species were represented in our samples, *D. denieri* and *D. lutzii*. Their time for emergence of adults was around 10-13 days after the flowers were collected. *Drosophila lutzii* are widespread in Southern United States, Mexico, Central America (Sturtevant, 1921; Chassagnard & Tsacas, 1992), and introduced in Hawaii (Montague & Kaneshiro, 1982), but only scattered recorded in South America (Pilares & Suyo, 1982, in Peru; Vilela, 1984, in Argentina; Acurio & Rafael, 2009, in Ecuador). It was recorded in Brazil for the first time only recently, by Schmitz and Hofmann (2005), in the southern states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, followed by Roque and Tidon (2008) in the states of Mato Grosso and Goiás, in central Brazil. In the present survey it is recorded for the first time in the states of São Paulo and Paraná. In turn, *D. denieri* seems to be restrict to South America, being referred for northern Argentina (Blanchard, 1938), Uruguay (Goñi *et al.*, 1998) and in the Brazilian states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina (Schmitz & Hofmann, 2005), Rio de Janeiro (Frota-Pessoa, 1952) and Mato Grosso (Blauth & Gottschalk, 2007). Both species are polyphagous. In the present survey, while *D. denieri* occurred in a wider variety of botanical families, including exotic elements, most specimens of *D. lutzii* occurred in *Ipomoea*. However, this species is also recorded for different botanical families (Chassagnard & Tsacas, 1992; Roque & Tidon, 2008). The two

species co-occurred in *Brugmansia suaveolens*, but generally *D. denieri* was the most common species in this plant. In the other hand, *D. lutzii* was the most common species found in all species of *Ipomoea*, except *I. alba*. Interestingly, in Pelotas, the southern locality surveyed by us, *D. lutzii* was absent, and *D. denieri* apparently took its place, occurring in *I. cairica* and *I. indica* with higher numbers of individuals when compared to localities closely northwards (Porto Alegre, Florianópolis), when it was only rarely found in such hosts. These two species, wherever found, almost always shared their host plants with species of the *bromeliae* group.

Zygothrica

It is reported that great numbers of adult flies of this genus can be found over bracket fungi in rainforests, but is questionable the kind of relation between flies and fungi. Undoubtedly, fungi actually represent breeding sites for some *Zygothrica* species (Grimaldi, 1987; Roque *et al.*, 2006; Gottschalk *et al.*, 2009), but Grimaldi (1987) suggested that in many cases they are used only as rendezvous sites. Indeed, most records for breeding sites in the genus are flowers, although they are reported only for a few species (Grimaldi, 1987). *Zygothrica dispar* is a good example of this behaviour: Burla (1954) stated that adult flies of this species were caught by sweeping a net over numerous fungi, but Frota-Pessoa (1952), Malogolowkin (1952) and Santos and Vilela (2005) reared the species from flowers. It was suggested before (Malogolowkin, 1952; Santos & Vilela, 2005) that this species is mainly a ground-feeder, using fallen flowers opportunistically. Contrarily, in our samples it was reared mainly in living flowers. Time for emergence was around 15-18 days. It demonstrated a preference for forested environments, being, in fact, the principal flower-breeding species in the area of Atlantic Forest of Morro da Lagoa da Conceição, Florianópolis. It was found in Santa Catarina and Rio Grande do Sul (first record and new southernmost locality). The other species, *Z. sp.1*, was reared only from *Solanum* flowers. Interestingly, this situation is analogous with that found in the *bromeliae* group of *Drosophila*, with *Solanum* again requiring a specialised performance.

Species of uncertain biology

The nature of the interaction between the species included in the category “uncertain biology” and flowers of the host plants recorded in this survey is doubtful. These species are absent in the baited trap-based surveys carried out by our research team in Southern Brazil (De Toni *et al.*, 2007; Gottschalk *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2007; Döge *et al.*, 2008; and others). In the other hand, they were found only occasionally in our flower samples. If they are not specialised breeders in flowers, they may occupy still another unknown niche.

Both species of *Cladochaeta* Coquillett, 1900 found belong to the *nebulosa* group. *Cladochaeta bupeo* was known previously only by a few individuals from Panama, collected during

the decades of 1950s and 1960s (Grimaldi & Nguyen, 1999). This finding represents, therefore, its first record in South America and its new southernmost locality (Porto Alegre, Rio Grande do Sul). The other species, *C. sp.1*, certainly is a related species, although undescribed. Grimaldi & Nguyen (1999), in an extensive revision of the genus, stressed the huge gap existing in the knowledge of *Cladochaeta* in the Neotropical Region, regarding especially to the situation in Brazil. The authors expect that many species of this genus remain to be recorded or described from Brazilian territory. From the 124 described species of *Cladochaeta*, only four were recorded from Brazil (Gottschalk *et al.*, 2008). The ecology of this genus is another issue that remains obscure. They are reported to be associated with spittlebug nymphs (Hemiptera, Cercopidae). The possibility that the specimens from Porto Alegre were associated with spittlebugs elsewhere in the larval stage and reached flowers to pupate can not be discarded. However, only 10-12 species have a Cercopidae host known (Grimaldi & Nguyen, 1999), and a few cases of association between *Cladochaeta* and flowers that seems not involve Cercopidae hosts are reported: between *C. floridana* (Malloch, 1924) and *Bidens pilosa* (Asteraceae) in Florida, USA, between *C. psychotria* Grimaldi & Nguyen, 1999 and *Psychotria chiriquiensis* (Rubiaceae) in Costa Rica (Grimaldi & Nguyen, 1999), and between *C. aff. paradoxa* and *Cestrum sendtnerianum* (Solanaceae) in São Paulo, Brazil (Santos & Vilela, 2005). The two species found in Porto Alegre were represented only by two and three individuals, which emerged 12-13 days after flowers were collected, and were not found again in subsequent samples from the same plants.

The genus *Rhinoleucophenga* Hendel, 1917 was represented by one species found in Florianópolis, still undescribed in the occasion. Based on the seven specimens caught, it was subsequently described as *R. joaquina* (Schmitz *et al.*, 2009²). Its life cycle is considerably longer than other drosophilids reported here, as imagines took 20-21 days to emerge after the field collection of the flowers. The natural history of this genus is poorly understood. Some reports associate them as predators of coccids and mealybugs (Hemiptera, Coccoidea) in larval stage (Ashburner, 1981; Culik & Ventura, 2009), or as breeders in cacti (Wheeler, 1952). The presence of *Rhinoleucophenga* in flowers were never reported before. A subsequent attempt to collect it from the same plant and locality was unsuccessful.

Although being one of the larger genera of Drosophilidae, with 262 described species, *Scaptomyza* is virtually ignored in Brazil, with just three described species recorded (Gottschalk *et al.*, 2008). Three species were found in Porto Alegre and probably represent undescribed species. The time for emergence of imagines after collection ranged from 11-14 days for all species. *Scaptomyza sp.1* (36 specimens) and *S. sp.3* (15 specimens) belong to subgenus *Mesoscaptomyza*

2 Cap. III desta tese.

Hackman, 1959, while *S. sp.2* (26 specimens) belongs to the genus *Parascaptomyza* Duda, 1924. This last subgenus was never reported for Brazil before. Specimens of this genus were mainly found during late winter of 2006, in the flowering period of some Bignoniaceae, but were not found thereafter. Although the biology of the genus is not wholly understood, some species of *Scaptomyza* are known to be important flower breeders, especially in Hawaii (Montague & Kaneshiro, 1982; Magnacca *et al.*, 2008). In Brazil, Santos and Vilela (2005) reported one individual of *Scaptomyza* sp. from *Cestrum sendtnerianum* (Solanaceae), in São Paulo.

Opportunist species

Several species found in the present survey are not supposed to present ecological niches strictly linked to flowers. Most of them are common members of the Neotropical fruit assemblages of drosophilids (De Toni *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005) and are usually attracted to fruit baited traps (Tidon, 2006; De Toni *et al.*, 2007; Gottschalk *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2008), as *D. cardinoides*, *D. griseolineata*, *D. mediotriata*, *D. paulistorum*, *D. melanogaster*, *D. simulans* and *Zaprionus indianus*, the last three being exotic species. The only specimen classified as *D. tripunctata* gr. sp.1 was a female from *tripunctata* group, not identified at species level, but probably also fits this situation. Except for *D. melanogaster* and *D. paulistorum*, all of these species were reared exclusively from fallen flowers. Fallen flowers constitute a substrate very distinct from living flowers, requiring a less specialised performance (Brncic, 1983), giving opportunities for generalist species, what Pipkin *et al.* (1966) called “ground-feeders”. Furthermore, the specimens of *D. paulistorum* reared from living flowers of *Allamanda polyantha* presented a strikingly reduced body size, suggesting that they passed the preadult stage at suboptimal conditions. Interestingly, specimens of *D. melanogaster* reared from living flowers of *Thunbergia grandiflora* (from Recife) presented a *brown*-like phenotype. If this natural mutation is result of the unusual and possibly stressful breeding site is an open question. Other evidence that suggests that these species use flowers only as a secondary or incidental host is the fact that they were not found repeatedly in such hosts. *Drosophila cardinoides* was abundantly reared (n>100) from fallen flowers of *Ceiba speciosa* in late Summer of 2007, which demonstrates its ability to exploit such resource, but no other individual were found in subsequent samples of the same tree, even in the same site, indicating that this association is not constant. Other species were found in lower numbers (normally n<10). The only species found repeatedly in a host plant was *D. mediotriata* in fallen flowers of *Hibiscus pernambucensis*. This species is, nevertheless, also reared from fruits (Heed, 1957; De Toni *et al.*, 2001), although its presence in flowers was already reported (Dobzhansky & Pavan, 1950; Pikin *et al.*, 1966). Unusually, Schmitz *et al.* (2007) found this species abundantly in banana baited traps at mangrove forests of Santa Catarina Island, southern Brazil, contrasting to

very lower abundances in similar surveys in other environments of the same region (De Toni *et al.*, 2007; Gottschalk *et al.*, 2007; Bizzo *et al.*, in press). *Hibiscus pernambucensis* is one of the main floristic components of peripheral areas of the mangroves in southern Brazil. However, *D. mediotriata* oviposits exclusively in fallen flowers, since only *D. bromelioides* was reared from samples of living flowers, showing a clear niche separation of the two species in the flowers of this plant.

The remaining two species are less common in diversity surveys. *Drosophila mediovitatta* was known only for Rio de Janeiro, Brazil (Frota-Pessoa, 1952), Rocha, Uruguay (Goñi *et al.*, 1998) and Rio Grande do Sul, Brazil (Gottschalk *et al.*, 2009). It was already reported from flowers before (Goñi *et al.*, 1998), but also from rotten cladodes (Goñi *et al.*, 1998) and from fungi (Gottschalk *et al.*, 2009), this last record in the same locality of the present study. Finally, *D. sticta* was already recorded from flowers before (Pipkin *et al.*, 1966; Santos & Vilela, 2005), but also in banana-baited traps (Medeiros & Klaczko, 2004). This species, found previously from El Salvador to Colombia and in the Brazilian state of São Paulo, is recorded for the first time in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul (new southernmost locality in Porto Alegre). It was found again in Porto Alegre, soon after, in banana-baited traps (Carolina F. Garcia, unpubl. data, 2009).

Future directions

Our sampling was far to be exhaustive, and biased to southern localities. The huge territorial extension of Brazil and the extremely high spatial heterogeneity and diversity of flora make a complete assessment of the flower-breeding diversity of drosophilids a challenging task. So, there is a high demand for new efforts in searching for flower-breeding drosophilids in Brazil and Neotropical Region as a whole, widening both the range of geographical localities and the diversity of flora surveyed as potential hosts. Several other Drosophilidae taxa not sampled in the present survey are known to be flower-breeding in Neotropical region, as the *onychophora* and *xanthopallescens* groups of *Drosophila* and additional species of the *bromeliae* group and the subgenus *Phloridosa* of *Drosophila*. They all share the condition of being very poorly known. Even the *flavopilosa* group of *Drosophila*, a comparatively better studied taxon, still requires better understanding. Surveys of Drosophilidae diversity are highly needed, and alternative methods of sampling must be considered besides the traditional banana-baited traps and fallen fruits. Collecting drosophilids from flowers is a relatively simple and cheap method, so it is not difficult to be included in diversity inventories. It is quite certain that many Neotropical flower-breeding species still wait for being discovered. The lack of taxonomic knowledge on this fauna may be the most prohibitive challenge that a researcher may find in dealing with samples. The small number of taxonomists and the low value and support currently given for taxonomy is undoubtedly a major

impediment, but more efforts in this area are urgently needed.

Identifying properly the taxa linked to flowers in a satisfactory biogeographical and ecological framework is a prerequisite to elucidate episodes of host shifts and the repeated evolution of flower-breeding habits within family Drosophilidae. Understanding the natural history of these insects may provide important highlights on the evolution of specialisation to host plants. The nature of the insect/plant interaction remains to be unveiled: parasitism, mutualism or just inquilinism? Reliable information on what exactly the larvae and adults feed would be welcome. Literature reports on larvae or adults feeding on plant tissues or fluids, pollen or yeasts are more conjectural than empirical. Other issues to be addressed are the role of potentially toxic plant secondary compounds as selective factors for the adaptive process of colonizing a new host species, besides the chemosensory mechanisms related to the insect recognition of hosts. A multi-disciplinary approach would be essential for giving a light to these questions.

The occurrence of species with a broad range of generalist/specialist ecology in the *bromeliae* group of *Drosophila*, as well as evidences of marked differences in the geographical distribution of the species, provides an interesting opportunity to study events of speciation, involving potentially biogeographical or ecological factors.

Studies on tropical assemblages of drosophilids normally are challenged by the huge diversity and complexity of such associations. The study of flower-breeding drosophilids is an opportunity to study the species coexistence through a relatively simpler model. Other ecological, genetic and evolutionary mechanisms could be better understood. As Brncic (1983) stated many years ago, the study of species with restricted niches like the flower-breeding forms is advantageous because it is possible to relate their genetic structure with the ecology under simpler variables, so allowing a better understanding of the evolutionary process of the members of the family Drosophilidae as a whole.

ACKNOWLEDGMENTS

People from various institutions provided us with valuable help in collection trips, sending material or making available their labs: Monica L. Blauth (Universidade Federal de Pelotas), Marco S. Gottschalk (Museu Paraense Emílio Goeldi), Cláudia Rohde, Ana Cristina L. Garcia (Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória), José Ferreira dos Santos, Tania T. Rieger, Evilis S. Monte, Luciana F. de Souto (Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas) and Paulo R. P. Hofmann (Universidade Federal de Santa Catarina). The following people kindly identified some plant species: Lilian A. Mentz, João André Jarenkow (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Luiz Carlos B. Lobato, Francismeire Bonadeu da Silva and Ana

Kelly Kock (Museu Paraense Emílio Goeldi). Sincere thanks are due to all of them and to the team of Laboratório de *Drosophila* at Universidade Federal do Rio Grande do Sul. This research was supported by grants and fellowships of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

Acurio A, Rafael V (2009) Diversity and geographical distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in Ecuador. *Drosophila Information Service* **92**, 20-25.

APG II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Biological Journal of the Linnean Society* **141**, 399-436.

Ashburner M (1981) Entomophagous and other bizarre Drosophilidae. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson, Jr. JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 3a, pp 395-429. Academic Press, London.

Bächli G (2010) Taxodros – The database on taxonomy of Drosophilidae [updated March 2010]. Available from: <http://www.taxodros.uzh.ch/>

Bächli G, Vilela CR, Escher SA, Saura A (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* **39**, 1-362.

Bizzo LEM, Gottschalk MS, De Toni DC, Hofmann PRP (in press) Seasonal dynamics of a drosophilid assemblage and its potential as bioindicators in open environments. *Iheringia, Série Zoologia*.

Blanchard EE (1938) Descripciones y anotaciones de Dipteros argentinos. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* **126**, 345-386.

Blauth ML, Gottschalk MS (2007) A novel record of Drosophilidae species in the Cerrado biome of the state of Mato Grosso, west-central Brazil. *Drosophila Information Service* **90**, 90-96.

Bock IR, Parsons PA (1981) Species of Australia and New Zealand. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson, Jr. JN (eds). *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3a, pp. 291-308. Academic Press, London.

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

Brncic D (1966) Ecological and cytogenetical studies of *Drosophila flavopilosa*, a Neotropical species living in *Cestrum* flowers. *Evolution* **20**, 16-29.

Brncic D (1978) A note on the *flavopilosa* group of species of *Drosophila* in Rio Grande do Sul, Brazil, with description of two new species (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de*

Biologia **38**, 647-651.

Brcic D (1983) Ecology of flower-breeding *Drosophila*. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson, Jr. (eds) *The genetics and biology of Drosophila*, Vol. 3d, pp 333-382. Academic Press, London.

Brown BV (2005) Malaise trap catches and the crisis in Neotropical dipterology. *American Entomologist* **51**, 180-183.

Burla H (1954) Study on the polymorphism in *Zygothrica dispar* and *Z. prodispar*, and description of *Z. laticeps* sp. nov. (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense* **10**, 231-252.

Carson HL, Okada T (1980) Drosophilidae associated with flowers in Papua New Guinea. I. *Colocasia esculenta*. *Kontyu* **48**, 15-29.

Chassagnard MT, Tsacas L (1992) *Drosophila (Phloridosa) lutzii* Sturtevant (Diptera: Drosophilidae), espécie antófila de México. *Folia Entomológica Mexicana* **85**, 95-105.

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

Clayton FE, Wasserman M (1957) Chromosomal studies of several species of *Drosophila*. *The University of Texas Publications* **5721**, 125-131.

Cook RM, Parsons PA, Bock IR (1977) Australian endemic *Drosophila*. II. A new *Hibiscus*-breeding species with its description. *Australian Journal of Zoology* **25**, 755-763.

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

David J (1973) Toxicité de faibles concentrations d'alcool éthylique pour une espèce tropicale de Drosophile: *Drosophila bromeliae* Sturtevant. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences* **277**, 2235-2238.

De Toni DC, Gottschalk MS, Cordeiro J, Hofmann PRP, Valente VLS (2007) Study of the Drosophilidae (Diptera) communities on Atlantic Forest islands of Santa Catarina state, Brazil. *Neotropical Entomology* **36**, 356-375.

De Toni DC, Hofmann PRP, Valente VLS (2001) First record of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Biotemas* **14**, 71-85.

Dobzhansky T, Pavan C (1943) Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo* **36**, 7-72.

Dobzhansky T, Pavan C (1950) Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *Journal of Animal Ecology* **19**, 1-14.

Döge JS, Valente VLS, Hofmann PRP (2008) Drosophilids (Diptera) from an Atlantic Forest

area in Santa Catarina, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* **52**, 615-624.

Duda O (1925) Die costaricanischen Drosophiliden des Ungarischen National-Museums zu Budapest. *Annales Musei Nationalis Hungarici* **22**, 149-229.

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

Frota-Pessoa O (1952) Flower-feeding Drosophilidae. *Drosophila Information Service* **26**, 101-102.

Garcia ACL, Valiati VH, Gottschalk MS, Rohde C, Valente VLS (2008) Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum*. *Iheringia, Série Zoologia* **98**, 329-338.

Goñi B, Martinez ME, Valente VLS, Vilela CR (1998) Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. *Revista Brasileira de Entomologia* **42**, 131-140.

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

Gottschalk MS, De Toni DC, Valente VLS, Hofmann PRP (2007) Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanization gradient. *Neotropical Entomology* **36**, 848-862.

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

Grimaldi DA, Nguyen T (1999) Monograph on the spittlebug flies, genus *Cladochaeta* (Diptera: Drosophilidae: Cladochaetini). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **241**, 1-326.

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

Heed WB (1957) Ecological and distributional notes on the Drosophilidae (Diptera) of El Salvador. *The University of Texas Publication* **5721**, 62-78.

Hofmann PRP, Napp M (1984) Genetic-environmental relationships in *Drosophila incompta*, a species of restricted ecology. *Brazilian Journal of Genetics* **7**, 21-39.

Hunter AS (1979) New anthophilic *Drosophila* of Colombia. *Annals of the Entomological Society of America* **72**, 372-383.

Lachance M-A, Bowles JM, Kwon S, Marinoni G, Starmer WT (2001) *Metschnikowia lochheadii* and *Metschnikowia drosophilae*, two new yeast species isolated from insects associated

with flowers. *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 103-109.

Magnacca KN, Foote D, O'Grady PM (2008) A review of the endemic Hawaiian Drosophilidae and their host plants. *Zootaxa* **1728**, 1-58.

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

May RM (2010) Ecological science and tomorrow's world. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B* **365**, 41-47.

McEvey SF, Barker JSF (2001) *Scaptodrosophila acclinata*: a new *Hibiscus* flower-breeding species related to *S. hibisci* (Diptera: Drosophilidae). *Records of the Australian Museum* **53**, 255-262.

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

Mentz LA, Oliveira PL (2004) *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. *Pesquisas Botânica* **54**, 1-327.

Montague JR, Kaneshiro KY (1982) Flower-breeding species of Hawaiian drosophilids in an early stage of sympatry. *Pacific Insects* **24**, 209-213.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853-858.

Okada T (1986) Estimation of the routes of synhospitolic distribution of the genus *Drosophilella* Duda (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of three new species from Malaysia and Indonesia. *Proceedings of the Japanese Society for Systematic Zoology* **33**, 32-39.

Pavan C, Cunha AB (1947). Espécies brasileiras de *Drosophila*. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo* **86**, 20-64.

Petersen JA (1960) Studies on the ecology of the genus *Drosophila*. I. Collections in two different life zones and seasonal variations in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* **20**, 3-16.

Pilares GLV, Suyo MP (1982) Distribution of different species of *Drosophila* from Peru (South America). *Drosophila Information Service* **58**, 122-124.

Pipkin SB (1964) New flower breeding species of *Drosophila*. *Proceedings of the Entomological Society Of Washington* **66**, 217-245.

Pipkin SB, Rodríguez RL, León J (1966) Plant host specificity among flower-feeding neotropical *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *The American Naturalist* **100**, 135-155.

Rafael JA, Aguiar AP, Amorim DS (2009) Knowledge of insect diversity in Brazil:

challenges and advances. *Neotropical Entomology* **38**, 565-570.

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

Roque F, Tidon R (2008) Eight new records of drosophilids (Insecta; Diptera) in the Brazilian savanna. *Drosophila Information Service* **91**, 94-98.

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

Schmitz HJ, Hofmann PRP (2005) First record of subgenus *Phloridosa* of *Drosophila* in southern Brazil, with notes on breeding sites. *Drosophila Information Service* **88**, 97-101.

Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP (2007) Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, southern Brazil. *Neotropical Entomology* **36**, 53-64.

Sepel LMN, Golombieski RM, Napp M, Loreto ELS (2000) Seasonal fluctuations of *D. cestri* and *D. incompta*, two species of *flavopilosa* group. *Drosophila Information Service* **83**, 122-126.

Silva AAR, Martins MB (2004) A new anthophilic species of *Drosophila* Fallén belonging to the *bromeliae* group of species (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **21**, 435-437.

Silva NM, Fantinel CC, Valente VLS, Valiati VH (2005) Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Porto Alegre, southern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia* **95**, 233-240.

Souza VC, Lorenzi H (2005) *Botânica Sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa.

Starmer WT, Bowles JM (1994) The saptial distribution of endemic and introduced flower-breeding species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) during their early history of encounter on the islands of Hawaii. *Pan-Pacific Entomologist* **70**, 230-239.

Sturtevant AH (1916) Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. *Annals of the Entomological Society of America* **9**, 323-343.

Sturtevant AH (1921) The North American species of *Drosophila*. *Carnegie Institute of Washington Publication* **301**, 1-150.

Sultana F, Hu YG, Toda MJ, Takenaka K, Yafuso M (2006) Phylogeny and classification of *Colocasiomyia* (Diptera, Drosophilidae), and its evolution of pollination mutualism with aroid plants. *Systematic Entomology* **31**, 684-702.

Sultana F, Kimura MT, Toda MJ (1999) Anthophilic *Drosophila* of the *elegans* species-subgroup from Indonesia, with description of a new species (Diptera: Drosophilidae). *Entomological Science* **2**, 121-126.

Suwito F, Kimura MT, Hattori K, Kimura MT (2002) Environmental adaptations of two flower breeding species of *Drosophila* from Java, Indonesia. *Entomological Science* **5**, 399-406.

Tidon R (2006) Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biological Journal of the Linnean Society* **87**, 233-247.

Tsacas L, Chassagnard MT, David JR (1988) Un nouveau groupe d'espèces afrotropicales anthophiles dans le sous-genre *Scaptodrosophila* du genre *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Annales de la Société Entomologique de France* **24**, 181-202.

Val FC, Marques MD (1996) Drosophilidae (Diptera) from the *Pantanal* of Mato Grosso (Brazil), with the description of a new species belonging to the *bromeliae* group of the genus *Drosophila*. *Papéis Avulsos de Zoologia* **39**, 223-230.

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

Vilela CR, Mori L (1999) The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó: further notes. *Revista Brasileira de Entomologia* **43**, 319-128.

Wheeler MR (1952) The Drosophilidae of the Nearctic Region exclusive of the genus *Drosophila*. *The University of Texas Publication* **5204**, 162-218.

Wheeler MR (1970) *A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States*. 79. Family Drosophilidae. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Yafuso M, Toda MJ, Sembel DT (2008) *Arengomyia*, new genus for the *Colocasiomyia arenga* species group (Diptera: Drosophilidae), with description of a new species. *Entomological Science* **11**, 391-400.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1 Plant species with no emergence of drosophilids.

Table 1: Host plants for Brazilian restrict flower-breeding species of drosophilids found in the present survey.

	bromeliae group								Subgenus <i>Phloridosa</i>		<i>Zygothrica</i>	
	<i>D. bro meliae</i>	<i>D. bro meli oides</i>	type III	type III'	type IV	type IV'	type V	type VI	<i>D. deni eri</i>	<i>D. lutzii</i>	<i>Z. dispar</i>	<i>Z. sp.1</i>
Acanthaceae												
<i>Justicia carnea</i>												x
<i>Thunbergia alata</i> *		x										
<i>Thunbergia grandiflora</i> *	x	x	x	x								x
Apocynaceae												
<i>Allamanda cathartica</i>				x								
<i>Allamanda polyantha</i>		x										
Aristolochiaceae												
<i>Aristolochia gigantea</i>		x										
Asparagaceae												
<i>Yucca guatemalensis</i>		x										
Bignoniaceae												
<i>Distictella cuneifolia</i>	x											
<i>Jacaranda mimosifolia</i> #		x										
<i>Jacaranda sp.1</i> #		x										x
<i>Macfadyena unguis-cati</i>		x										
<i>Pyrostegia venusta</i>		x										
<i>Spathodea campanulata</i> * #		x										
<i>Tabebuia alba</i> #		x										
<i>Tabebuia heptaphylla</i> #		x										
<i>Tecoma stans</i>		x										
Convolvulaceae												
<i>Ipomoea alba</i>		x	x						x			
<i>Ipomoea asarifolia</i>	x											
<i>Ipomoea batatas</i>		x								x		
<i>Ipomoea cairica</i>		x							x	x	x	
<i>Ipomoea carnea fistulosa</i>		x	x							x		
<i>Ipomoea aff. chiliantha</i>		x								x		

<i>Ipomoea indica</i>		x				x		x
<i>Ipomoea pes-caprae</i>		x						x
Cucurbitaceae								
<i>Cucurbita pepo</i> *		x				x		
Fabaceae								
<i>Bauhinia variegata</i> *		x						
<i>Erythrina crista-galli</i> #		x						
<i>Wisteria floribunda</i> #		x						
sp.1		x						
Hypericaceae								
<i>Hypericum</i> sp.1		x						
Iridaceae								
<i>Dietes bicolor</i> *		x						
Malvaceae								
<i>Abutilon</i> sp.		x						
<i>Ceiba speciosa</i> #		x		x				
<i>Dombeya wallichii</i> *		x						
<i>Hibiscus pernambucensis</i>		x						
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> *	x	x						
<i>Hibiscus tiliaceus</i> *		x				x		
<i>Malvaviscus penduliflorus</i>		x						
Melastomataceae								
<i>Tibouchina</i> sp.1		x						
Musaceae								
<i>Heliconia</i> sp.1	x							
Passifloraceae								
<i>Passiflora alata</i>		x						
<i>Passiflora edulis</i>		x				x		
Solanaceae								
<i>Brugmansia suaveolens</i>		x		x		x		x
<i>Brunfelsia uniflora</i>								x
<i>Solanum mauritianum</i>				x		x		
<i>Solanum paniculatum</i>		x		x		x		x
<i>Solanum sanctaecatharinae</i>				x		x		x
<i>Solanum sisymbriifolium</i>						x		
<i>Solanum stramonifolium</i>						x		

<i>Solanum</i> sp.2		x
<i>Solanum</i> sp.3	x	x

Tropaeolaceae

<i>Tropaeolum majus</i>	x	
-------------------------	---	--

Zingiberaceae

<i>Hedychium coronarium</i> *	x	
-------------------------------	---	--

* exotic species in Neotropic; # fallen flowers

Table 2: Host plants for Brazilian species of drosophilids of uncertain biology found in flowers in the present survey.

	<i>C. bupeo</i>	<i>C. sp.1</i>	<i>R. joaquina</i>	<i>S. sp.1</i>	<i>S. sp.2</i>	<i>S. sp.3</i>
Bignoniaceae						
<i>Pyrostegia venusta</i>	x			x		
<i>Tabebuia alba</i> #				x		
<i>Tabebuia heptaphylla</i> #				x	x	x
Bromeliaceae						
<i>Dyckia encholirioides</i>			x			
Malvaceae						
<i>Dombeya tiliacea</i> *		x				
<i>Dombeya wallichii</i> *				x		

* exotic species in Neotropic; # fallen flowers

Table 3: Host plants for Brazilian opportunist species of drosophilids found in flowers in the present survey.

	<i>D. cardi noide s</i>	<i>D. grise oline ata</i>	<i>D. medi ostri ata</i>	<i>D. medi ovitta ta</i>	<i>D. mela noga ster</i>	<i>D. pauli storu m</i>	<i>D. simul ans</i>	<i>D. sticta</i>	<i>D. tripu nctat a gr. sp.1</i>	<i>Z. india nus</i>
Acanthaceae										
<i>Thunbergia grandiflora</i> *					x					
Apocynaceae										
<i>Allamanda polyantha</i>						x				
Aristolochiaceae										
<i>Aristolochia gigantea</i>					x					
Asparagaceae										
<i>Yucca guatemalensis</i> #							x			x
Bignoniaceae										
<i>Tabebuia alba</i> #		x						x		
<i>Tabebuia heptaphylla</i> #				x			x			
Fabaceae										
<i>Erythrina speciosa</i> #									x	
Malvaceae										
<i>Ceiba speciosa</i> #	x							x		
<i>Hibiscus pernambucensis</i> #			x							

* exotic species in Neotropic; # fallen flowers

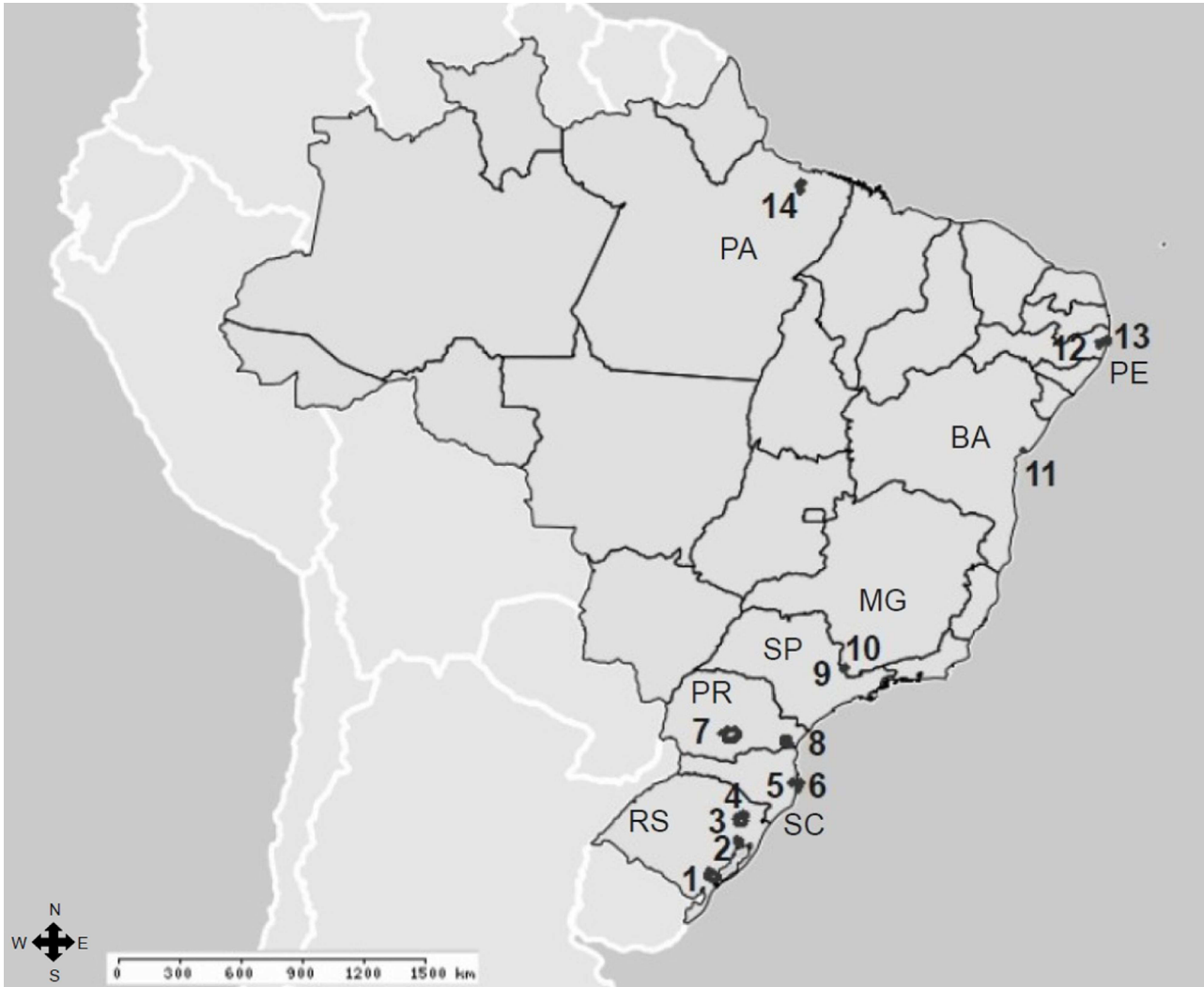


Figure 1: Map of Brazil showing the states and municipalities where samples of this study were taken: RS – Rio Grande do Sul: 1. Pelotas, 2. Porto Alegre, 3. Caxias do Sul, 4. Flores da Cunha; SC – Santa Catarina: 5. Antônio Carlos, 6. Florianópolis; PR – Paraná: 7. Guarapuava, 8. São José dos Pinhais; SP – São Paulo: 9. Águas de Lindóia; MG – Minas Gerais: 10. Monte Sião; BA – Bahia: 11. Itaparica; PE – Pernambuco: 12. Vitória de Santo Antão, 13. Recife; PA – Pará: 14. Belém.

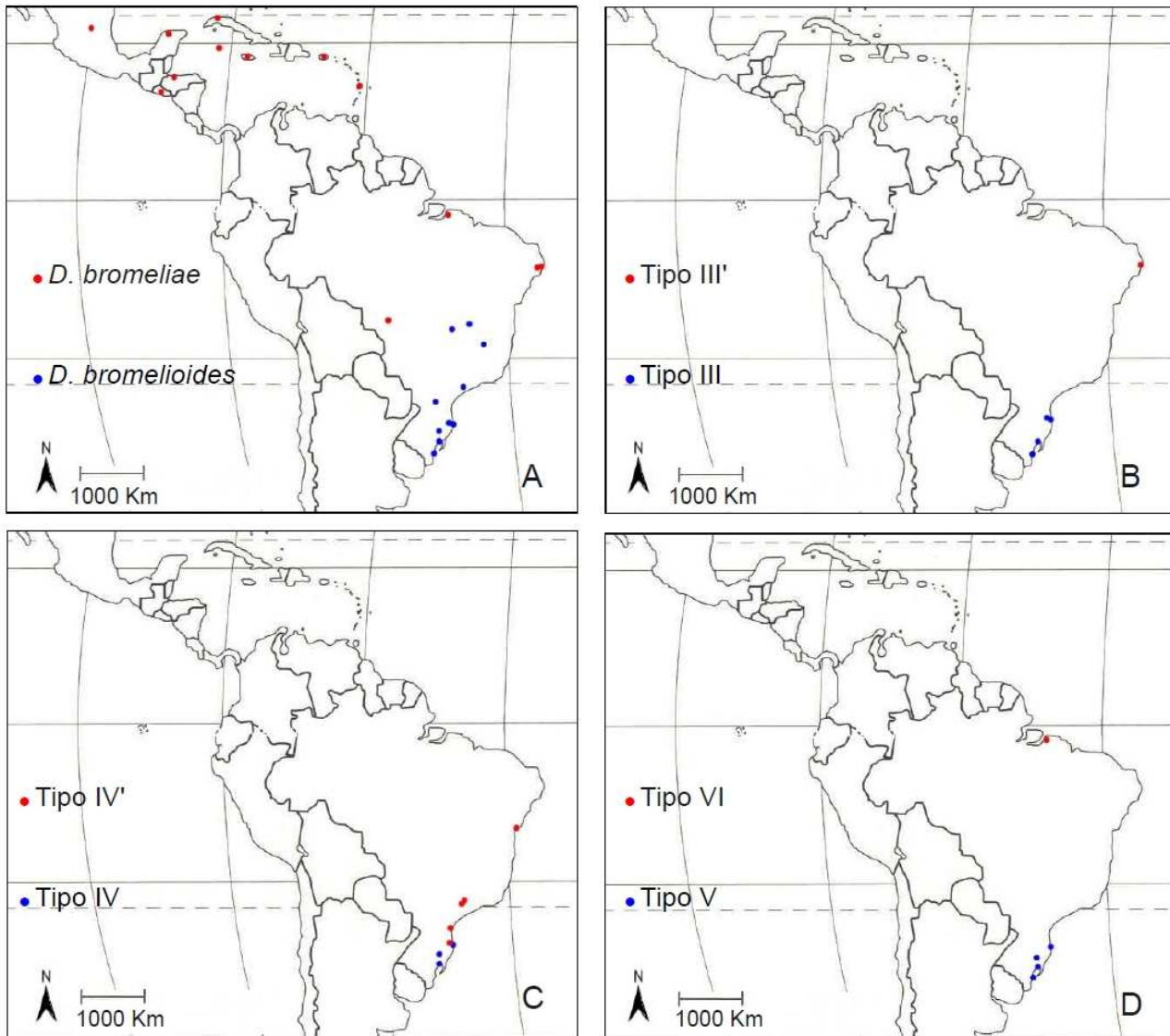


Figure 2: Geographical distribution of the species belonging to *bromeliae* group of *Drosophila* found in this study. A. *D. bromeliae* and *D. bromelioides*, includes additional literature records (Sturtevant, 1921; Frota-Pessoa, 1952; Clayton & Wasserman, 1957; Heed, 1957; Petersen, 1960; Wheeler, 1970; David, 1973; Vilela & Mori, 1999; Lachance *et al.*, 2001; Blauth & Gottschalk, 2007; Chaves & Tidon, 2008; Roque & Tidon, 2008); B. Types III and III'. C. Types IV and IV'. D. Types V and VI.

Supporting Information

Appendix S1: List of plant species with no emergence of drosophilid specimens in the present survey.

Acanthaceae	<i>Justicia floribunda</i> <i>Sanchezia nobilis</i> <i>Odontonema strictum</i> sp.1
Alliaceae	<i>Agapanthus africanus</i>
Apocynaceae	<i>Allamanda blanchetii</i> <i>Nerium oleander</i> <i>Tabernaemontana catharinensis</i> <i>Thevetia peruviana</i>
Araceae	sp.1
Asteraceae	<i>Mikania cordifolia</i> <i>Senecio brasiliensis</i>
Balsaminaceae	<i>Impatiens walleriana</i>
Begoniaceae	<i>Begonia coccinea</i>
Bignoniaceae	<i>Memora schomburgkii</i> <i>Podranea ricasoliana</i>
Cactaceae	<i>Nopalea cochenillifera</i>
Cannaceae	<i>Canna denudata</i> <i>Canna limbata</i>
Capparaceae	<i>Cleome hassleriana</i>
Convolvulaceae	<i>Ipomoea imperati</i>
Commelinaceae	<i>Tradescantia</i> sp.
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>
Ericaceae	<i>Gaylussacia brasiliensis</i> <i>Rhododendron simsii</i>
Escalloniaceae	<i>Escallonia bifida</i>
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pulcherrima</i>
Fabaceae	<i>Bauhinia forficata</i> <i>Delonix regia</i> <i>Lupinus</i> sp. <i>Macroptilium lathyroides</i> <i>Peltophorum dubium</i> <i>Schizolobium parahyba</i>

Geraniaceae	<i>Pelargonium hortorum</i>
Heliconiaceae	<i>Heliconia velloziana</i>
Iridaceae	<i>Gladiolus hortulanum</i>
Lamiaceae	<i>Salvia coccinea</i>
Liliaceae	<i>Lilium regale</i> <i>Lilium sp.1</i>
Lythraceae	<i>Lagerstroemia indica</i> <i>Punica granatum</i>
Magnoliaceae	<i>Magnolia liliflora</i>
Malvaceae	<i>Abelmoschus esculentus</i> <i>Brachychiton populneus</i> <i>Hibiscus schizopetalum</i> <i>Luehea divaricata</i>
Melastomataceae	<i>Tibouchina urvilleana</i>
Musaceae	<i>Musa ornata</i>
Nymphaeaceae	<i>Nymphaea ampla</i>
Oleaceae	<i>Jasminum mesnyi</i>
Onagraceae	<i>Ludwigia sp.</i>
Orchidaceae	<i>Epidendrum fulgens</i> <i>sp.1</i>
Oxalidaceae	<i>Oxalis corniculata</i> <i>Oxalis latifolia</i>
Piperaceae	<i>Piper sp.</i>
Plantaginaceae	<i>Russelia equisetiformis</i> <i>sp.1</i>
Proteaceae	<i>Grevillea banksii</i>
Rosaceae	<i>Rosa grandiflora</i>
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i> <i>Petunia littoralis</i> <i>Petunia sp.</i> <i>Solanum juripeba</i> <i>Streptosolen jamesonii</i>
Urticaceae	<i>Cecropia pachystachya</i>
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i> <i>Petrea subserrata</i>
Zingiberaceae	<i>Renealmia cf. petasites</i>

CAPÍTULO III

***Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov. (Diptera, Drosophilidae) from the Neotropical Region**

Artigo publicado no periódico *Neotropical Entomology*, 38 (6): 786-790.

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Rhinoleucophenga joaquina sp. nov. (Diptera: Drosophilidae) from the Neotropical RegionHERMES J SCHMITZ¹, MARCO S GOTTSCHALK², VERA L S VALENTE^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Lab. *Drosophila*. Univ. Federal do Rio Grande do Sul, C. postal 15053, Av. Bento Gonçalves 9500, Bloco B, Prédio 43323, sala 210, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS
 hj.schmitz@gmail.com; gotts007@yahoo.com; vera.gaiiesky@ufrgs.br

Edited by Marcelo Duarte – MZ/USP

Neotropical Entomology 38(6):786-790 (2009)

Rhinoleucophenga joaquina sp. nov. (Diptera: Drosophilidae) da Região Neotropical

RESUMO - O gênero *Rhinoleucophenga* Hendel compreende 18 espécies nominais e possui distribuição Neotropical e Neártica. Uma nova espécie foi encontrada em coleta realizada em Florianópolis, SC, e é descrita como *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov. Os espécimes encontrados emergiram de flores de *Dyckia encholirioides* (Bromeliaceae) coletadas em região de restinga sobre dunas. Este é o primeiro registro da utilização de flores como sítio de oviposição para *Rhinoleucophenga*.

PALAVRAS-CHAVE: Taxonomia, nova espécie, Steganinae, Insecta, Brasil

ABSTRACT - The genus *Rhinoleucophenga* Hendel comprises 18 nominal species and has a Neotropical and Nearctic distribution. A new species was found in a collection in Florianópolis, SC, Brazil, and is described as *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov. The specimens found were reared from flowers of *Dyckia encholirioides* (Bromeliaceae), collected in a region of restinga on the dunes. The use of flowers as breeding site for *Rhinoleucophenga* has never been reported before.

KEY WORDS: Taxonomy, new species, Steganinae, Insecta, Brazil

Rhinoleucophenga Hendel is a genus with Neotropical and Nearctic distribution and currently comprises 18 nominal species. This genus is classified in the subfamily Steganinae, tribe Gitonini and subtribe Acletoxenina (Grimaldi 1990). It was erected by Hendel (1917) and new species were included by Duda (1927, 1929) and Malogolowkin (1946). Additionally, the genus *Pseudophortica* Sturtevant was synonymized under *Rhinoleucophenga* by Malloch & McAtee (1924), one species was transferred from *Drosophila* Fallén to *Rhinoleucophenga* by Vilela (1990) and the five American species originally described as *Gitona* Meigen are currently allocated in this genus by some authors (Brake & Bächli 2008).

The taxonomy and biology of species of this genus are poorly known. As result of our efforts to survey Drosophilidae species associated with living flowers, an undescribed species of *Rhinoleucophenga* was found in the dunes of Joaquina beach, in Florianópolis (SC), southern Brazil. This species is described in here.

Material and Methods

The new species described in here was reared from flowers of a terrestrial bromeliad, *Dyckia encholirioides* (Bromeliaceae), collected at the Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, in the municipality of Florianópolis, state of Santa Catarina, Brazil (27°38'S; 48°28'W), on the 28th of October, 2006. The park comprises a region of coastal sand dunes and restinga vegetation between Joaquina Beach and a coastal lagoon (Lagoa da Conceição), in the Santa Catarina Island, southern Brazil. The plant species was identified by one of us (HJS), and constitutes one important element of the flora of the shrubby restinga of the region (Falkenberg 1999).

One hundred living flowers at the stage of anthesis were collected, and separated from the axis of the inflorescence of *D. encholirioides*. The collection was carried out in the inner stable dunes, covered with herbaceous and brushy vegetation, in the western portion of the park. The flowers collected were

taken into plastic bags to the laboratory, transferred to vials with vermiculite and kept in a temperature-controlled room at 25°C. Twenty days later, six individuals of an undescribed species of *Rhinoleucophenga* emerged from the flowers, and another one emerged the day after. All seven specimens were males. No other insect emerged from the flowers.

The specimens were aged for 3-4 days after emergence and placed in ethanol: distilled water: acetic acid: glycerol (6:4:1:1). Measurements were taken with a reticle adjusted to an optical stereomicroscope. Male terminalia were disarticulated after treatment with 10% potassium hydroxide (KOH) and acid fuchsin (Wheeler & Kambysellis 1966, modified by Bächli *et al* 2004), and dissected in glycerol. Photos were taken with a digital camera coupled to an optical stereomicroscope, and drawings of male terminalia were made with a *camara lucida* attached to an optical microscope with a 10 x objective lens and a 10 x ocular lens.

The terminology follows Vilela (1990) and Bächli *et al* (2004). The measurements are given by averages followed by the ranges in parentheses.

The type-series was deposited in the Museu de Ciências Naturais (MCNZ), Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. The specimens were pinned (double-mounted) and the disarticulated terminalia kept in microvials with glycerol, with the respective specimens. Before pinning, the specimens were dried with 100% ethanol, ethylene glycol and xylene, as described by Bächli *et al* (2004). Herbarium vouchers were deposited in the Herbário ICN, at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Rhinoleucophenga joaquina sp. nov.

Type series. Male holotype labelled "*Rhinoleucophenga joaquina*; HOLOTYPE ♂; Brasil, Santa Catarina, Florianópolis, Joaquina; 27°38'S; 48°28'W; 28.x.2006 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Dyckia encholirioides*". Six male paratypes labelled "*Rhinoleucophenga joaquina*; PARATYPE ♂; Brasil, Santa Catarina, Florianópolis, Joaquina; 27°38'S; 48°28'W; 28.x.2006 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Dyckia encholirioides*". Postabdomen of holotype and two of the paratypes dissected, stored in microvials with glycerol, together with the respective specimen.

Type locality. Joaquina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Diagnosis. Head and thorax mainly brownish. Arista microtrichose, with ca. 10-15 very short dorsal branches and no ventral branch. One strong pair of prescutellar acrostichal setae. Legs yellow, wings hyaline. Abdomen yellow, with black, medially interrupted marginal bands on tergites and a medial black stripe extending from the tip of the abdomen to tergite III or IV. Male terminalia as in Fig 1.

Description. Male. Head. Frons brownish, covered with ca. 9 (8-12) frontal setulae in each side and ca. 48 (35-54) scattered interfrontal setulae, frontal length 0.62 (0.60-0.64) mm; frontal index 1.12 (1.03-1.28), top-to-bottom width ratio 1.18 (1.10-

1.24). Ocellar triangle brown and prominent, around 35% (28-43%) of frontal length. Orbital setae black, distance of or3 to or1 70% (60-82%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 1.29 (0.63-1.87), or2/or1 ratio 0.30 (0.19-0.45), postocellar setae 14% (12-17%) and ocellar setae 52% (45-73%) of frontal length, vt index 0.67 (0.60-0.76). One pair of large vibrissae, vibrissal index 0.28 (0.19-0.42). Face brown. Carina prominent, nose-like, broadened downwards. Cheek index 4.69 (4.0-6.12). Eye index 1.32 (1.26-1.45). Occiput brownish, paler medially. Antennae brownish. Aristae minutely pubescent, with ca. 10-15 very short dorsal branches and no ventral branch (Fig 3). Proboscis yellow. Palpus brownish, with ca. 20 black setae along lower margin.

Thorax length 1.85 (1.62-2.00) mm. Scutum homogeneously brown or with three faint longitudinal stripes slightly darker (Fig 4); more than 10 irregular rows of acrostichal setulae. One strong pair of prescutellar acrostichal setae, about 59% (54-64%) of posterior dorsocentral setae. Transverse distance of dorsocentral setae 4.22 x (3.75-5.00 x) of longitudinal distance, dc index 0.45 (0.42-0.51). Scutellum brown, distance between apical scutellar setae about 82% (67-100%) of that between apical and basal one; basal scutellar setae divergent; scut index 1.05 (0.97-1.13). Just one pair of postpronotal setae. One pair of proepisternal setae, about 65% (50-78%) of postpronotal setae. Pleura brown, sterno index 0.96 (0.86-1.08), median katepisternal setae absent. Halteres whitish. Legs yellow.

Wings hyaline, veins yellow; length 3.03 (2.88-3.19) mm, length to width ratio 2.18 (2.09-2.28). Indices: C, 3.02 (2.84-3.31); ac, 1.30 (1.18-1.50); hb, 0.53 (0.40-0.60); 4C, 1.01 (0.97-1.15); 4v, 2.35 (2.16-2.59); 5x, 1.54 (1.39-1.62); M, 0.85 (0.81-0.96); prox. x, 0.92 (0.84-1.04).

Abdomen yellow, with black, medially interrupted marginal bands on tergites and a medial black stripe extending from the tip of abdomen to tergite III or IV (Fig 5).

Body length 4.59 (4.22-4.80) mm.

Terminalia (Fig 1). Surstyli fused to epandrium, in each side with 18-19 black rod-shaped prenisetae slightly round at tip. Decasternum absent. Hypandrium width greater than length. Aedeagus as a ring, dorsoventrally flattened, with two terminal processes linked to aedeagal apodeme in the anterior region. Paraphysis long, erect, dorsoventrally flattened, slightly shorter than aedeagus, bearing three setulae at tip, beyond three or four setulae placed subdistally (the latter missing in the holotype). Aedeagal apodeme long and rod-shaped.

Female. Unknown.

Etymology. The species name refers to its type locality, the dunes of Joaquina beach.

Distribution. Known only for the type locality.

Biology. Bred from flowers of *Dyckia encholirioides*.

Discussion

Rhinoleucophenga joaquina sp. nov. will not fit or will run wrongly in the available keys to Drosophilidae genera.

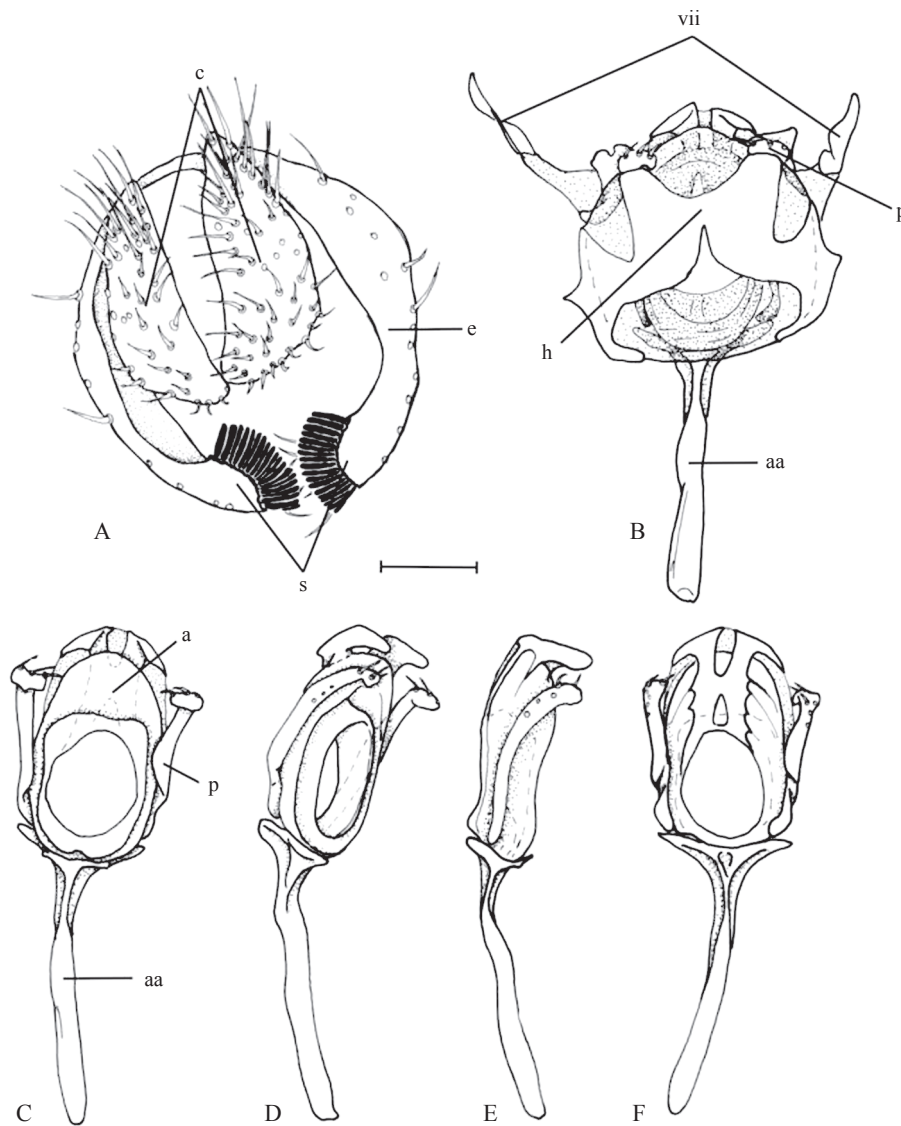
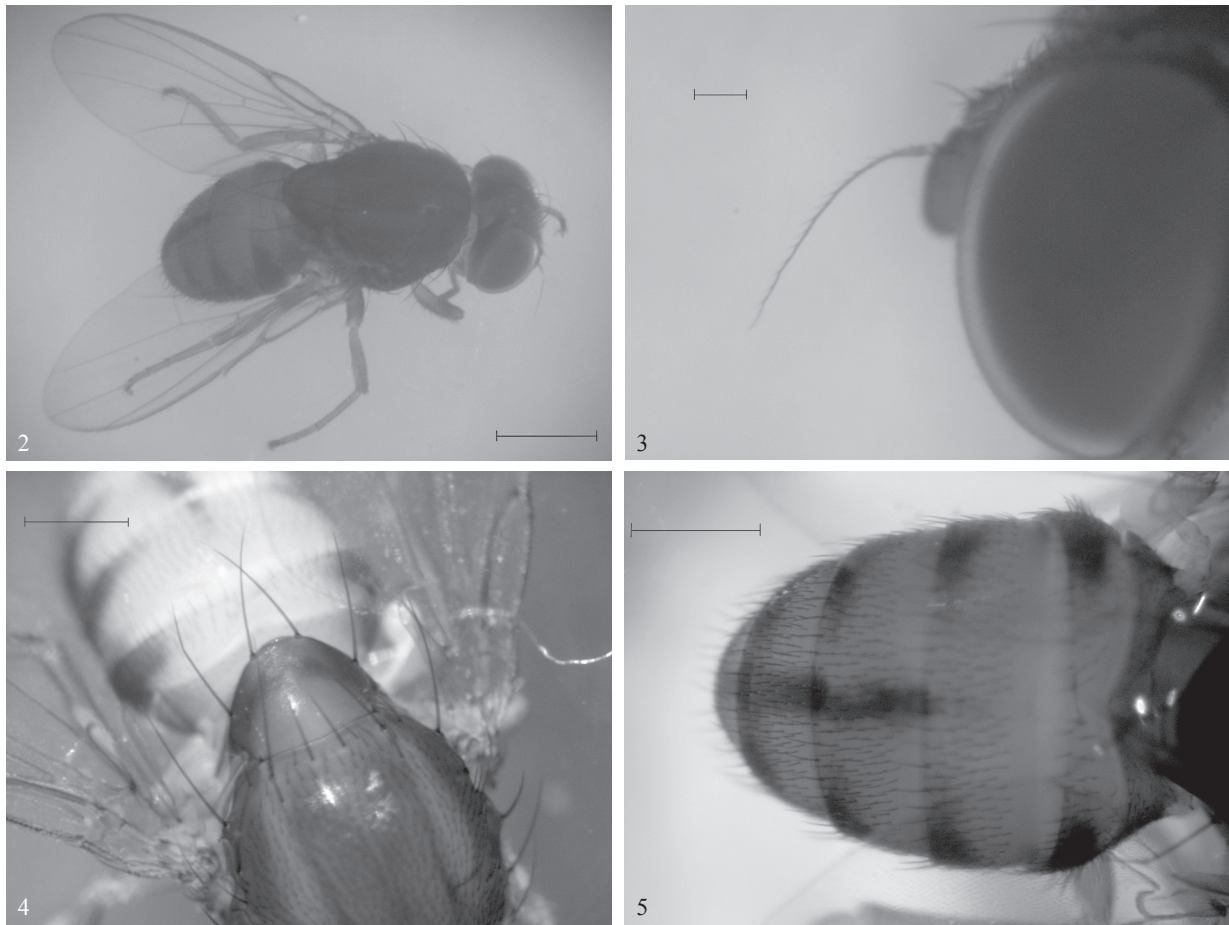


Fig 1 Male terminalia of *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov., male holotype. A. epandrium (e), cerci (c), and surstyli (s), oblique posterior view; B. hypandrium (h), sternite VII (vii), aedeagal apodeme (aa), paraphyses (p), and aedeagus, ventral view; C-F. aedeagus (a), aedeagal apodeme (aa), and paraphyses (p), several views from ventral through dorsal. All figures were drawn to the same scale. Scale bar = 0.1 mm.

It runs to *Gitona* in several of them (Sturtevant 1921, Patterson & Mainland 1944, Wheeler 1952, Bächli *et al* 2004) due to its unusual micropubescent aristae, contrasting to the plumose aristae of most of its congeners. If the micropubescent aristae are not taken into account and are treated as plumose, this species runs to *Rhinoleucophenga* in the keys of Sturtevant (1921), Malloch & McAtee (1924), Wheeler (1952, 1987) and Okada (1989). In the key of McAlpine (1968) for Drosophilidae genera with bare or micropubescent aristae, it runs to “Nearctic species assigned to *Gitona*” (but the mesonotum is not spotted). The traditional circumscription of *Rhinoleucophenga* comprises only species bearing plumose aristae. However, several authors pointed out that the Neotropical and Nearctic species that have bare or micropubescent aristae which were assigned to *Gitona*, were actually incorrectly placed

(McAlpine 1968, Wheeler & Takada 1971, Ashburner 1981, Bächli *et al* 2004, but see Grimaldi 1990 for a different opinion), and are classified as *Rhinoleucophenga* in the world catalogue of Brake & Bächli (2008). These species are *R. americana* (Patterson), *R. bivisualis* (Patterson), *R. brasiliensis* (Costa Lima), *R. fluminensis* (Costa Lima) and *R. sonoita* (Wheeler). Here, we also adopted a wider circumscription of *Rhinoleucophenga*, in agreement with Brake & Bächli (2008), including these species and the newly described *R. joaquina* sp. nov. in the genus *Rhinoleucophenga* instead of *Gitona*.

The morphological characters of *R. joaquina* sp. nov. fit well into the diagnosis of the genus provided by Malogolowkin (1946). In addition, it does not have the thorax spotted as *Gitona*. Furthermore, the analysis of male terminalia confirmed its identity as a *Rhinoleucophenga*



Figs 2-5 *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov., male paratype. 2) general aspect, oblique dorsal view; 3) head, detail of arista, left lateral view; 4) thorax, detail of scutellum, dorsal view; 5) abdomen, dorsal view. Scale bars: in Fig 2 = 1 mm; in Fig 3 = 0.1 mm; in Figs 4-5 = 0.5 mm.

species. It differs from all of its congeners by its colour pattern, the micropubescent arista and the male terminalia (in comparison with the descriptions in Duda 1927, 1929, Patterson 1943, Malogolowkin 1946, Costa Lima 1935, 1937, 1950, Wheeler 1949, 1952, Wheeler & Takada 1971, Vilela 1990). Although the male terminalia were not described for most of the species of the genus, *R. joaquina* sp. nov. clearly differs from all the other species by its colour pattern, especially the abdominal medial black stripe, and by the micropubescent arista, contrasting with the clearly plumose arista of almost all of its congeners. Furthermore, it is also very different from other species of the genus with micropubescent arista. It differs from all of them by the abdominal medial black stripe, and from *R. americana*, *R. bivisualis* and *R. sonoita* in not having the thorax spotted. The arista morphology is also quite different: at least *R. bivisualis* and *R. brasiliensis* clearly have ventral branches (Costa Lima 1937, Patterson 1943), which are lacking in *R. joaquina* sp. nov.

The lack of more detailed information on species of this genus, especially on male terminalia morphology, makes difficult to establish the relationships of *R. joaquina* within the genus.

The ecology of *Rhinoleucophenga* is also badly known. *Rhinoleucophenga americana* and *R. sonoita* were recorded to breed in cacti (Wheeler 1952). *Rhinoleucophenga obesa* (Loew), *R. brasiliensis* and *R. fluminensis* are known to prey on coccids during the larval stage (review in Ashburner 1981). Sturtevant (1921) mentioned having examined specimens of *R. obesa* collected "on persimmons". The presence of *Rhinoleucophenga* in flowers has never been reported. Although we have collected flowers of many other species of plants in order to obtain drosophilids in Joaquina dunes as well as in other sites, no other specimen of *R. joaquina* sp. nov. was found. Its biology remains obscure. If it is a host-specific flower-breeding species or if it can exploits other breeding sites remains unknown.

Acknowledgments

The authors thank to the two referees for valuable contributions. This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Ashburner M (1981) Entomophagous and other bizarre Drosophilidae, p.395-429. In Ashburner M, Carson H L, Thompson Jr J N (eds) The genetics and biology of *Drosophila*, 3a. London, Academic Press, 429p.
- Bächli G, Vilela C R, Escher S A, Saura A (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomol Scand 39: 1-362.
- Brake I, Bächli G (2008) World catalogue of insects, v. 9: Drosophilidae (Diptera). Stenstrup, Appolo Books, 412p.
- Costa Lima A (1935) Um drosophilídeo predador de coccídeos. Chácaras Quintaes 52: 61-63.
- Costa Lima A (1937) Outras moscas cujas larvas são predadoras de coccídeos. Chácaras Quintaes 55: 179-182.
- Costa Lima A (1950) Duas espécies de *Gitona* predadoras de coccídeos do gênero *Orthezia* (Diptera: Drosophilidae). Arthropoda 1: 247-253.
- Duda O (1927) Die südamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter Berücksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen Arten. Arch Naturgesch 91: 1-228.
- Duda O (1929) Die Ausbeute der deutschen Chaco-Expedition 1925/26 (Diptera). VI. Sepsidae, VII. Piophilidae, VIII. Cypselidae, IX. Drosophilidae und X. Chloropidae. Konowia 8: 33-50.
- Falkenberg D B (1999) Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, Sul do Brasil. Insula 28: 1-30.
- Grimaldi D A (1990) A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). Bull Am Mus Nat His 197: 103-268.
- Hendel F (1917) Beiträge zur Kenntnis der acalyptraten Musciden. Dtsche Entomol Z 1917: 33-47.
- Malloch J R, McAtee W L (1924) Flies of the family Drosophilidae of the District of Columbia region, with keys to genera, and other notes, of broader application. Proc Biol Soc Wash 37: 25-42.
- Malogolowkin C (1946) Sobre o gênero "*Rhinoleucophenga*" com descrição de cinco espécies novas (Drosophilidae, Diptera). Rev Bras Biol 6: 415-426.
- McAlpine J F (1968) An annotated key to drosophilid genera with bare or micropubescent aristae and a revision of *Paracacoxenus* (Diptera: Drosophilidae). Can Entomol 100: 514-532.
- Okada T (1989) A proposal of establishing tribes for the family Drosophilidae with key to tribes and genera (Diptera). Zoolog Sci 6: 391-399.
- Patterson J T (1943) The Drosophilidae of the Southwest. Univ Texas Publs 4313: 7-215.
- Patterson J T, Mainland G B (1944) The Drosophilidae of Mexico. Univ Texas Publs 4445: 9-101.
- Sturtevant A H (1921) The North American species of *Drosophila*. Carnegie Inst Wash Publ 301:1-150.
- Vilela C R (1990) On the identity of *Drosophila gigantea* Thomson, 1869 (Diptera, Drosophilidae). Rev Bras Entomol 34: 499-504.
- Wheeler M R (1949) Taxonomic studies on the Drosophilidae. Univ Texas Publs 4920: 157-195.
- Wheeler M R (1952) The Drosophilidae of the Nearctic region, exclusive of the genus *Drosophila*. Univ Texas Publs 5204: 162-218.
- Wheeler M R (1987) Drosophilidae, p.1011-1018. In McAlpine J F, Peterson B V, Shewell G E, Teskey H J, Vockeroth J R, Wood D M (eds) Manual of Nearctic Diptera, v. 2. Ottawa, Research Branch, Agriculture Canada Monograph 28: 675-1332.
- Wheeler M R, Kambyseilis M P (1966) Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. Univ Texas Publs 6615: 533-565.
- Wheeler M R, Takada H (1971) Male genitalia of some representative genera of American Drosophilidae. Univ Texas Publs 7103: 225-240.

Received 17/III/08. Accepted 08/IX/09.

CAPÍTULO IV

On the cryptic diversity in the *bromeliae* group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of three new species

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Papéis Avulsos de Zoologia*

On the cryptic diversity in the *bromeliae* group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of three new species

Título resumido: The cryptic diversity in the *bromeliae* group of *Drosophila*

Hermes J. Schmitz¹, Marco S. Gottschalk², Vera L. S. Valente^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal; Laboratório de *Drosophila*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, Av. Bento Gonçalves 9500, Bloco B, Prédio 43323, sala 210, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS.

hj.schmitz@gmail.com; gotts007@yahoo.com; vera.gaiesty@ufrgs.br

ABSTRACT – The flower-breeding *bromeliae* group of *Drosophila* is a small and poorly known Neotropical group that can be found in a variety of host plants. It currently comprises only five species. A recent survey for flower-breeding drosophilids in southern Brazil, however, revealed a cryptic diversity in this group, with four sympatric species, virtually indistinguishable by external morphology, but clearly different in respect to aedeagus morphology. After these findings, a comparative analysis including these species and *Drosophila bromeliae* Sturtevant, 1916, which occurs in northern localities, was made. Three new species are described, *D. anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov., and a complement for the descriptions of *D. bromeliae* and *D. bromelioides* Pavan & Cunha, 1947 are given within an updated taxonomic approach, including the first description of the aedeagus of *D. bromeliae*. Morphological traits showed large superimpositions ranges between species, but a morphometrical analysis based on 29 characters obtained success in the classification of 98% of the males and 95% of the females. The morphology of the aedeagus is the main diagnostic character for a reliable species discrimination. The morphology of the oviscapt valves, the spermathecae and aristae can also be useful. Reviews from the literature in respect to the geographical localities for each species and the host plants used by them are also given. Additionally, new data are provided, respective to new localities and many new host plants as well. A markedly difference was found on the host plant preferences between species, from very generalist species to *Solanum*-specialized ones.

KEY WORDS – Taxonomy, new species, flowers, Insecta, Brazil.

A diversidade críptica no grupo *bromeliae* de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), com descrições de três espécies novas.

RESUMO – O grupo *bromeliae* de *Drosophila* é um pequeno e pouco conhecido grupo Neotropical associado a flores, que pode ser encontrado em uma variedade de plantas hospedeiras. Atualmente, inclui apenas cinco espécies. Entretanto, um recente inventário de drosofilídeos associados a flores no Brasil meridional revelou uma desconhecida diversidade críptica, com quatro espécies simpátricas, virtualmente indistinguíveis pela morfologia externa, mas claramente diferentes tomando-se em consideração a morfologia do edeago. A partir destes achados, foi feita uma análise comparativa entre estas espécies e *Drosophila bromeliae* Sturtevant, 1921, que ocorre em localidades mais setentrionais. Três espécies novas são descritas, *D. anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov., e um complemento para as descrições de *D. bromeliae* Sturtevant, 1921 e *D. bromelioides* Pavan & Cunha, 1947 é dado dentro de uma abordagem taxonômica atualizada, incluindo a primeira descrição do edeago de *D. bromeliae*. Os caracteres morfológicos apresentaram grandes intervalos de sobreposição entre as espécies, mas uma análise morfométrica baseada em 29 caracteres obteve sucesso na classificação de 98% dos machos e 95% das fêmeas. A morfologia do edeago constitui-se no principal caráter diagnóstico para uma discriminação confiável entre as espécies. A morfologia dos ovipositores, espermatecas e aristas também podem ser úteis. São apresentadas também revisões da literatura sobre as localidades geográficas onde cada espécie do grupo foi registrada e as plantas hospedeiras utilizadas por cada uma delas. Novos dados são adicionados, tanto sobre novas localidades como para plantas hospedeiras. Uma grande diferença a respeito da utilização de plantas hospedeiras foi encontrada, desde espécies bastante generalistas até espécies de ecologia restrita a flores de *Solanum*.

PALAVRAS-CHAVE – Taxonomia, novas espécies, flores, Insecta, Brasil.

INTRODUCTION

The *bromeliae* group of *Drosophila* is a small group of Neotropical flower-breeding flies, currently comprising five described species. The group was erected by Patterson & Stone (1952) to include *Drosophila bromeliae* Sturtevant, 1921, *D. bromelioides* Pavan & Cunha, 1947 and “probably” *D. florae* Sturtevant, 1916. The two Sturtevant’s species, *D. bromeliae* and *D. florae*, were found in Central America, while *D. bromelioides* was found lately in Brazil. Two species were added to the group after: *D. aguape* Val & Marques, 1996, from the Brazilian Pantanal Biome, and *D. speciosa* Silva & Martins, 2004, from Brazilian Amazon. Despite the group name, these flies breed in flowers of a variety of plants. The name *bromeliae* came from Sturtevant’s original description of *D. bromeliae*, where he stated that “The first specimen seen was taken on a pineapple”. Curiously, no other record of any of these flies in bromeliads is known.

Up to now, the only species of the group known from southern Brazil is *D. bromelioides*. However, recent collections made by us revealed four species of this group, cryptic in respect of external morphology, but clearly different based on the morphology of aedeagus. An analysis of these species showed that they were *D. bromelioides* and three undescribed species. *Drosophila bromeliae*, although apparently absent in southern Brazil, was comparatively analysed, based on a strain from Grand Cayman Island, and found in some northern localities in Brazil. So, three new species of the *bromeliae* group of *Drosophila* are described here, and a complement for the description of *D. bromeliae* and *D. bromelioides* is provided based on non-type specimens. The aedeagus, oviscapt valves, spermathecae and aristae were studied in detail and illustrated since they revealed to be important morphological characters to distinguish species from each other in this cryptic cluster. We also present a review of the geographical distribution and plant host species of each species of the *bromeliae* group, adding more data.

MATERIAL AND METHODS

Field flies were collected as pre-adults in the natural breeding sites. Flowers of putative host plants were collected, in most cases detached from the living plants, but sometimes taken on the ground in an early stage of decaying. In the laboratory, they were transferred to vials with vermiculite and kept in a temperature-controlled room at 25°C until the emergence of adults. Whenever possible, strains were established and maintained in laboratory in a temperature-controlled room at 17°C. For species which attempts to establish strains were unsuccessful, all specimens analysed originated directly from field samples. The strain of *D. bromeliae* is originated from Grand Cayman Island, Cayman Islands (*Drosophila* Species Stock Center, Stock Number 15085-1682.00). The identity of this strain was confirmed with the analysis of mitotic chromosomes

(Fig. 1), compared with Metz (1916), who described the mitotic chromosomes of this species using the same material on which was based the original description of Sturtevant (1921). The strain of *D. bromelioides* and the type series of the three new species were originated from Campus do Vale (UFRGS), Porto Alegre, RS. Campus do Vale is located in the eastern extremity of Porto Alegre, in Morro Santana (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W). The identity of our specimens of *D. bromelioides* were checked following the description of aedeagus of the holotype by Val (1982). Other collections were made in several localities (see Results and Discussion).

Measurements for the taxonomic descriptions were taken with a reticle adjusted to an optical stereomicroscope, from specimens in ethanol: distilled water: glycerol: acetic acid (6:4:1:1). Ten males and ten females of each species were measured. The terminology follows Bächli *et al.* (2004). The measurements are given by averages followed by the ranges in parenthesis. Terminalia were disarticulated and treated with potassium hydroxide (KOH) 10% and acid fuchsin (Bächli *et al.*, 2004), and dissected in glycerol, for analysis of male terminalia and female oviscapt valves and spermathecae. The drawings of male terminalia were made with a squared reticle coupled to an ocular lens of an optical microscope. Photos of aedeagus, valves of oviscapt, spermathecae and arista were taken with a digital camera coupled to a stereomicroscope, with structures mounted in slides.

A morphometrical analysis was carried out with the data of measurements obtained for the taxonomical descriptions. Twenty-nine characters were chosen, constituting in indices and ratios independent of size: frontal index, frontal tapering ratio, vt index, vibrissal index, cheek index, eye index, ocellar triangle length/frontal length, or3-or1 distance/or3-vtm distance, or1/or3 ratio, or2/or1 ratio, ocellar setae length/frontal length, postocellar setae length/frontal length, h index, dc index, scut index, sterno index, median/anterior katapisternal length, transversal/longitudinal distance between dc, distance between apical scutellar setae/distance between apical and basal scutellar setae, prescutellar/dc setae length, wing index and C, ac, hb, 4c, 4v, 5x, M and prox. x indices. A discriminant analysis was carried out in Statistica 5.1 (StatSoft).

The specimens used for the taxonomic descriptions were dried with absolute ethanol, ethylene glycol and xylene (Bächli *et al.*, 2004), pinned (double-mounted) and deposited in the Museu de Ciências Naturais (MCNZ), Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. The disarticulated terminalia were kept in microvials with glycerol, with the respective specimens.

RESULTS AND DISCUSSION

Drosophila Fallén, 1823:4

Drosophila bromeliae species group Patterson & Stone, 1952:20

Drosophila bromeliae Sturtevant

Drosophila bromeliae Sturtevant, 1921: 72.

Diagnosis. Body colour yellowish to pale brown. Aristae generally with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. One pair of large prescutellar acrostichal setae, basal scutellar setae convergent. Wings hyaline. Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, faint, pale brown stripes, interrupted at middle. Females with valves of oviscapt roundish at tip, ca. 300 μm long; spermathecae mushroom-shaped, small, as high as wide, basal introvert reaching about 3/4 of inner capsule. Male terminalia as in Fig. 2.

Complement of description: ♂ Head. Frons yellow to pale brown, frontal length 0.34 (0.30-0.38) mm; frontal index 1.16 (0.94-1.36), top to bottom width ratio 1.24 (1.06-1.33). Ocellar triangle slightly prominent, brownish, about 45% (38-53%) of frontal length. Orbital setae black, distance of or3 to or1 107% (100-120%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 1.00 (0.89-1.12), or2/or1 ratio 0.61 (0.56-0.70), postocellar setae 34% (25-50%) and ocellar setae 59% (47-67%) of frontal length; vt index 1.01 (1.00-1.11). Vibrissal index 0.54 (0.44-0.62). Face yellow to pale brown. Carina prominent, broadened downwards. Cheek index about 9.19 (6.25-12.5). Eye index 1.33 (1.24-1.50). Occiput pale brown. Antennae yellow to pale brown, arista with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. Proboscis yellow; palpus yellow, with some setae and numerous setulae, mainly on the lower margin.

Thorax length 0.97 (0.93-1.00) mm. Scutum yellow, 8 rows of acrostichal setulae; the two outer rows not reaching anterior dorsocentral setae in some specimens. One pair of large prescutellar acrostichal setae, about 39% (33-47%) of posterior dorsocentral setae; acrostichal setulae on the sides of prescutellar acrostichal setae larger than other acrostichal setulae, about 1/3 to 2/3 as long as prescutellar setae. h index 0.96 (0.80-1.14). Transverse distance of dorsocentral

setae 323% (280-360%) of longitudinal distance, dc index 0.58 (0.44-0.67). Scutellum yellow, distance between apical scutellar setae about 93% (88-100%) of that between apical and basal one; basal setae convergent; scut index 0.80 (0.70-0.85). Pleura yellow, sterno index 0.74 (0.67-0.83), median katepisternal setae about 38% (33-43%) of anterior one. Halteres yellow. Legs yellow, long and slender.

Wings hyaline, veins yellow, length 1.74 (1.56-1.88) mm, length to width ratio 1.95 (1.77-2.14). Indices: C, 2.23 (1.92-2.59); ac, 2.42 (2.20-2.89); hb, 0.62 (0.50-0.77); 4C, 1.10 (1.00-1.30); 4v, 1.75 (1.67-1.90); 5x, 1.51 (1.40-1.75); M, 0.60 (0.56-0.67); prox. x, 0.64 (0.58-0.67).

Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, pale brown stripes, interrupted at middle, very faint on the distal tergites, more distinct on the proximal ones.

Body length 2.51 (2.20-2.82) mm.

♂ Terminalia (Fig. 2). Epandrium mostly microtrichose, with about 8 lower setae and no upper setae; ventral lobe finger-shaped, narrowed, microtrichose, not covering surstylus. Cerci anteriorly fused with epandrium, microtrichose; setae in ventral margin shorter than in dorsal margin. Surstylus microtrichose, with a slightly convex row of about 9 peg-like prenisetae, about 8 inner and 2 outer setae. Decasternum with the anterior margin straight. Hypandrium slightly shorter than epandrium, square-shaped, with narrowed anterior margin; posterior hypandrial process and dorsal arch absent. Gonopods completely fused with hypandrium, linked to paraphysis by a membranous tissue, and with one seta near inner margin. Aedeagus fused to aedeagal apodeme, tubed-shaped, apically expanded and bent forward. Dorsal cleft about 1/4 of the length of aedeagus. Aedeagal apodeme triangular, laterally flattened, forming a continuous structure with ventral rod. Ventral rod as long as the aedeagal apodeme. Paraphysis triangular, with a distal seta. Paraphysis covers the entire ventral rod margin.

♀ General morphology similar to males. Measurements: Frontal length 0.36 (0.34-0.38) mm; frontal index 1.11 (1.00-1.29), top to bottom width ratio 1.21 (1.11-1.36). Ocellar triangle about 44% (39-50%) of frontal length. Distance of or3 to or1 109% (100-120%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 1.00 (0.90-1.11), or2/or1 ratio 0.65 (0.56-0.88), postocellar setae 35% (29-39%) and ocellar setae 58% (53-67%) of frontal length, vt index 0.96 (0.83-1.10). Vibrissal index 0.52 (0.40-0.56). Cheek index about 10.90 (6.50-14.50). Eye index 1.35 (1.21-1.56). Thorax length 1.01 (0.95-1.05) mm. Prescutellar acrostichal setae 42% (38-47%) of posterior dorsocentral setae. h index 0.96 (0.90-1.00). Transverse distance of dorsocentral setae 332% (283-400%) of longitudinal distance, dc index 0.58 (0.39-0.71). Distance between apical scutellar setae about 95% (89-100%) of that between apical and basal one; scut index 0.82 (0.71-0.95). Sterno index 0.76 (0.63-0.93),

median katepisternal setae about 37% (33-43%) of anterior one. Wing length 1.93 (1.80-2.20) mm, length to width ratio 2.03 (1.96-2.20). Indices: C, 2.26 (2.07-2.56); ac, 2.26 (2.08-2.45); hb, 0.63 (0.56-0.73); 4C, 1.09 (1.04-1.20); 4v, 1.86 (1.72-2.00); 5x, 1.52 (1.30-1.67); M, 0.63 (0.59-0.70); prox. x, 0.68 (0.60-0.77).

Body length 2.94 (2.48-3.20) mm.

Valves of oviscapt roundish at tip, ca. 300 µm long, with 3-6 discal and 10-15 marginal peg-like ovisensilla. Spermathecae mushroom-shaped, small, as high as wide (ca. 40 µm), basal introvert reaching about 3/4 of inner capsule.

Puparium. Brownish. Length 2.56 (2.410-2.69) mm; horn index 7.81 (6.50-9.22).

Specimens deposited: Ten males labeled "*Drosophila bromeliae*; ♂; Cayman Islands, Grand Cayman Island; linhagem de laboratório, Drosophila Species Stock Center, n. 15085-1682.00; orig. de col. 23.VI.1985, W B Heed". Ten females labeled "*Drosophila bromeliae*; ♀; Cayman Islands, Grand Cayman Island; linhagem de laboratório, Drosophila Species Stock Center, n. 15085-1682.00; orig. de col. 23.VI.1985, W B Heed".

Type-locality: Havana, Cuba (Sturtevant, 1921).

***Drosophila bromelioides* Pavan & Cunha**

Drosophila bromelioides Pavan & Cunha, 1947: 24.

Diagnosis. Body colour yellowish to pale brown. Aristae generally with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. One pair of large prescutellar acrostichal setae, basal scutellar setae convergent. Wings hyaline. Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, faint, pale brown stripes, interrupted at middle. Females with valves of oviscapt roundish at tip, ca. 300-320 µm long; spermathecae mushroom-shaped, higher than wide, basal introvert reaching about 2/3 of inner capsule. Male terminalia as in Fig. 3.

Complement of description: ♂ Head. Frons yellow to pale brown, frontal length 0.33 (0.30-0.38) mm; frontal index 1.05 (0.88-1.20), top to bottom width ratio 1.22 (1.12-1.43). Ocellar triangle slightly prominent, brownish, about 41% (35-47%) of frontal length. Orbital setae black,

distance of or3 to or1 104% (83-120%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 0.92 (0.80-1.00), or2/or1 ratio 0.63 (0.50-0.75), postocellar setae 40% (32-53%) and ocellar setae 72% (56-87%) of frontal length; vt index 0.98 (0.91-1.09). Vibrissal index 0.45 (0.40-0.50). Face yellow to pale brown. Carina prominent, broadened downwards. Cheek index about 9.20 (8.67-9.67). Eye index 1.43 (1.18-1.64). Occiput pale brown. Antennae yellow to pale brown, aristae with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. Proboscis yellow; palpus yellow, with some setae and numerous setulae, mainly on the lower margin.

Thorax length 1.02 (0.88-1.08) mm. Scutum yellow, 8 rows of acrostichal setulae; the two outer rows not reaching anterior dorsocentral setae in some specimens. One pair of large prescutellar acrostichal setae, about 55% (45-62%) of posterior dorsocentral setae; acrostichal setulae on the sides of prescutellar setae larger than other acrostichal setulae, about 1/3 to 2/3 as long as prescutellar setae. h index 0.96 (0.83-1.00). Transverse distance of dorsocentral setae 311% (243-380%) of longitudinal distance, dc index 0.68 (0.53-0.88). Scutellum yellow, distance between apical scutellar setae about 92% (67-125%) of that between apical and basal one; basal setae convergent; scut index 0.87 (0.81-0.91). Pleura yellow, sterno index 0.73 (0.56-0.83), median katepisternal setae about 35% (21-60%) of anterior one. Halteres yellow. Legs yellow, long and slender.

Wings hyaline, veins yellow, length 1.89 (1.74-2.18) mm, length to width ratio 2.05 (1.88-2.35). Indices: C, 2.34 (1.15-2.71); ac, 2.27 (2.00-2.54); hb, 0.57 (0.38-0.71); 4C, 0.91 (0.80-1.00); 4v, 1.60 (1.47-1.68); 5x, 1.36 (1.18-1.56); M, 0.49 (0.45-0.52); prox. x, 0.54 (0.46-0.62).

Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, pale brown stripes, interrupted at middle, very faint on the distal tergites, more distinct on the proximal ones.

Body length 2.70 (2.40-2.82) mm.

♂ Terminalia (Fig. 3). Epandrium mostly microtrichose, with about 6-7 lower setae and no upper setae; ventral lobe finger-shaped, narrowed, microtrichose, not covering surstylus. Cerci anteriorly fused with epandrium, microtrichose; setae in ventral margin shorter than in dorsal margin. Surstylus microtrichose, with a slightly convex row of about 8 peg-like prenisetae, about 5 inner and 2 outer setae. Decasternum with the anterior margin convex. Hypandrium shorter than epandrium, square-shaped, with narrowed anterior margin; posterior hypandrial process and dorsal arch absent. Gonopods completely fused with hypandrium, linked to paraphysis by a membranous tissue, and with one seta near inner margin. Aedeagus fused to aedeagal apodeme, tubed-shaped, apically expanded with projections anteriorly (that could be asymmetrical bilaterally), and bent

forward. Dorsal cleft about 1/3 of the length of aedeagus. Aedeagal apodeme expanded anteriorly, laterally flattened, forming a continuous structure with ventral rod. Ventral rod as longer as the aedeagal apodeme. Paraphysis triangular, apically rounded, with a distal seta. Paraphysis covers almost all the entire ventral rod margin.

♀ General morphology similar to males. Measurements: Frontal length 0.36 (0.34-0.38) mm; frontal index 1.19 (1.06-1.36), top to bottom width ratio 1.29 (1.18-1.40). Ocellar triangle about 42% (35-47%) of frontal length. Distance of or3 to or1 102% (83-120%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 0.94 (0.90-1.11), or2/or1 ratio 0.61 (0.50-0.78), postocellar setae 46% (37-53%) and ocellar setae 72% (58-83%) of frontal length, vt index 1.02 (0.85-1.20). Vibrissal index 0.48 (0.40-0.60). Cheek index about 12.32 (9.33-15.00). Eye index 1.37 (1.25-1.50). Thorax length 1.14 (1.10-1.20) mm. Prescutellar acrostichal setae 53% (45-61%) of posterior dorsocentral setae. h index 0.95 (0.83-1.10). Transverse distance of dorsocentral setae 288% (233-333%) of longitudinal distance, dc index 0.60 (0.57-0.67). Distance between apical scutellar setae about 99% (82-111%) of that between apical and basal one; scut index 0.85 (0.80-0.96). Sterno index 0.75 (0.63-0.84), median katepisternal setae about 30% (20-36%) of anterior one. Wing length 2.06 (1.90-2.50) mm, length to width ratio 2.04 (1.86-2.48). Indices: C, 2.30 (2.07-2.44); ac, 2.41 (2.23-2.54); hb, 0.57 (0.54-0.61); 4C, 0.94 (0.82-1.03); 4v, 1.60 (1.42-1.67); 5x, 1.36 (1.25-1.50); M, 0.48 (0.45-0.50); prox. x, 0.55 (0.50-0.60).

Body length 3.40 (3.12-3.60) mm.

Valves of oviscapt roundish at tip, ca. 300-320 µm long, with 5-8 discal and 10-17 marginal peg-like ovisensilla. Spermathecae mushroom-shaped, higher than wide (ca. 80 x 60 µm), basal introvert reaching about 2/3 of inner capsule.

Puparium. Brownish. Length 2.77 (2.65-2.88) mm; horn index 5.00 (4.28-6.54).

Specimens deposited: Ten males labeled "*Drosophila bromelioides*; ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; linhagem de laboratório, orig. de col. 10.XI.2006, H J Schmitz, ex: flores de *Ipomoea cairica*". Ten females labeled "*Drosophila bromelioides*; ♀; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; linhagem de laboratório, orig. de col. 10.XI.2006, H J Schmitz, ex: flores de *Ipomoea cairica*".

Type-locality: São Paulo, Brazil (Pavan & Cunha, 1947).

Drosophila anaeterrae sp. nov.

Diagnosis. Body colour yellowish to pale brown. Aristae generally with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. One pair of large prescutellar acrostichal setae, basal scutellar setae convergent. Wings hyaline. Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, faint, pale brown stripes, interrupted at middle. Females with valves of oviscapt roundish at tip, ca. 380-400 μm long; spermathecae mushroom-shaped, higher than wide, basal introvert reaching about 1/3 of inner capsule. Male terminalia as in Fig. 4.

Description: ♂ Head. Frons yellow to pale brown, frontal length 0.34 (0.30-0.36) mm; frontal index 1.16 (1.06-1.31), top to bottom width ratio 1.29 (1.19-1.43). Ocellar triangle slightly prominent, brownish, about 44% (39-50%) of frontal length. Orbital setae black, distance of or3 to or1 110% (100-150%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 1.02 (0.70-1.28), or2/or1 ratio 0.60 (0.56-0.86), postocellar setae 40% (33-47%) and ocellar setae 65% (56-80%) of frontal length; vt index 1.04 (1.00-1.10). Vibrissal index 0.42 (0.30-0.50). Face yellow to pale brown. Carina prominent, broadened downwards. Cheek index about 8.54 (6.75-12.0). Eye index 1.30 (1.20-1.41). Occiput pale brown. Antennae yellow to pale brown, arista with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. Proboscis yellow; palpus yellow, with some setae and numerous setulae, mainly on the lower margin.

Thorax length 0.98 (0.92-1.02) mm. Scutum yellow, 8 rows of acrostichal setulae; the two outer rows not reaching anterior dorsocentral setae in some specimens. One pair of large prescutellar acrostichal setae, about 44% (31-57%) of posterior dorsocentral setae; acrostichal setulae on the sides of prescutellar setae larger than other acrostichal setulae, about 1/3 to 2/3 as long as prescutellar setae. h index 0.98 (0.89-1.11). Transverse distance of dorsocentral setae 260% (200-283%) of longitudinal distance, dc index 0.54 (0.38-0.64). Scutellum yellow, distance between apical scutellar setae about 81% (60-100%) of that between apical and basal one; basal setae convergent; scut index 0.82 (0.75-0.90). Pleura yellow, sterno index 0.75 (0.67-0.83), median katepisternal setae about 26% (20-36%) of anterior one. Halteres yellow. Legs yellow, long and slender.

Wings hyaline, veins yellow, length 1.80 (1.72-1.92) mm, length to width ratio 1.90 (1.76-2.04). Indices: C, 2.25 (2.11-2.35); ac, 2.39 (2.27-2.50); hb, 0.56 (0.50-0.60); 4C, 0.96 (0.87-1.08); 4v, 1.60 (1.48-1.84); 5x, 1.30 (1.07-1.50); M, 0.49 (0.44-0.60); prox. x, 0.53 (0.38-0.61).

Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, pale brown stripes, interrupted at middle, very faint on the distal tergites, more distinct on the proximal ones.

Body length 2.57 (2.40-2.82) mm.

♂ Terminalia (Fig. 4). Epandrium mostly microtrichose, with about 7 lower setae and no upper setae; ventral lobe finger-shaped, narrowed, microtrichose, not covering surstylus. Cerci anteriorly fused with epandrium, microtrichose; setae in ventral margin shorter than in dorsal margin. Surstylus microtrichose, with a slightly convex row of about 9 peg-like prensisetae, about 6 inner and 2 outer setae. Decasternum with the anterior margin slightly convex. Hypandrium as longer as epandrium, square-shaped, with narrowed anterior margin; posterior hypandrial process and dorsal arch absent. Gonopods completely fused with hypandrium, linked to paraphysis by a membranous tissue, and with one seta near inner margin. Aedeagus fused to aedeagal apodeme, tubed-shaped, apically expanded with three anterior spur-shaped processes (two lateral and one central less pointed, that could be asymmetrical bilaterally), bent forward. Dorsal cleft about 1/3 of the length of aedeagus. Aedeagal apodeme triangular, laterally flattened, forming a continuous structure with ventral rod. Ventral rod as longer as aedeagal apodeme. Paraphysis triangular, apically rounded, with a distal seta. Paraphysis covers almost all the entire ventral rod margin.

♀ General morphology similar to males. Measurements: Frontal length 0.35 (0.32-0.36) mm; frontal index 1.10 (1.00-1.38), top to bottom width ratio 1.28 (1.18-1.57). Ocellar triangle about 47% (44-50%) of frontal length. Distance of or3 to or1 102% (100-120%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 1.01 (0.90-1.11), or2/or1 ratio 0.58 (0.44-0.67), postocellar setae 44% (39-47%) and ocellar setae 67% (61-75%) of frontal length, vt index 1.03 (0.91-1.18). Vibrissal index 0.48 (0.40-0.50). Cheek index about 9.20 (8.67-9.67). Eye index 1.31 (1.17-1.40). Thorax length 1.12 (1.05-1.18) mm. Prescutellar acrostichal setae 43% (37-47%) of posterior dorsocentral setae. h index 0.94 (0.90-1.00). Transverse distance of dorsocentral setae 272% (225-317%) of longitudinal distance, dc index 0.54 (0.50-0.61). Distance between apical scutellar setae about 82% (80-90%) of that between apical and basal one; scut index 0.80 (0.73-0.87). Sterno index 0.77 (0.73-0.83), median katepisternal setae about 31% (27-33%) of anterior one. Wing length 1.96 (1.62-2.08) mm, length to width ratio 1.86 (1.22-1.98). Indices: C, 2.43 (2.23-2.62); ac, 2.53 (2.33-2.82); hb, 0.56 (0.52-0.59); 4C, 0.92 (0.84-1.00); 4v, 1.63 (1.50-1.76); 5x, 1.38 (1.25-1.50); M, 0.49 (0.47-0.55); prox. x, 0.57 (0.52-0.63).

Body length 3.29 (3.00-3.42) mm.

Valves of oviscapt roundish at tip, ca. 380-400 μ m long, with 5-6 discal and 13-18 marginal peg-like ovisensilla. Spermathecae mushroom-shaped, higher than wide (ca. 80 x 60 μ m), basal introvert reaching about 1/3 of inner capsule.

Puparium. Brownish. Length 2.79 (2.65-2.88) mm; horn index 4.76 (4.47-5.41).

Specimens deposited (type series): Male holotype labeled "*Drosophila anaeterrae*; HOLOTYPE ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; linhagem de laboratório, orig. de col. 10.XI.2006, H J Schmitz, ex: flores de *Brugmansia suaveolens*". Nine male paratypes labeled "*Drosophila anaeterrae*; PARATYPE ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; linhagem de laboratório, orig. de col. 10.XI.2006, H J Schmitz, ex: flores de *Brugmansia suaveolens*" and ten female paratypes labeled "*Drosophila anaeterrae*; PARATYPE ♀; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; linhagem de laboratório, orig. de col. 10.XI.2006, H J Schmitz, ex: flores de *Brugmansia suaveolens*".

Type locality: UFRGS/Campus do Vale, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Etymology: The name of this species refers to Ana Terra, one of the most classical characters of the literature of Rio Grande do Sul, present in the Érico Veríssimo's series *O Tempo e o Vento* (Time and the Wind).

Drosophila solani sp. nov.

Diagnosis. Body colour yellowish to pale brown. Arista generally with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. One pair of large prescutellar acrostichal setae, basal scutellar setae convergent. Wings hyaline. Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, faint, pale brown stripes, interrupted at middle. Females with valves of oviscapt strong, long (ca. 460 µm) and pointed at tip; spermathecae mushroom-shaped, higher than wide, basal introvert reaching about 2/3 of inner capsule. Male terminalia as in Fig. 5.

Description: ♂ Head. Frons yellow to pale brown, frontal length 0.32 (0.26-0.36) mm; frontal index 1.03 (0.88-1.20), top to bottom width ratio 1.22 (1.12-1.33). Ocellar triangle slightly prominent, brownish, about 34% (28-40%) of frontal length. Orbital setae black, distance of or3 to or1 82% (67-100%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 1.05 (0.88-1.60), or2/or1 ratio 0.49 (0.38-0.71), postocellar setae 46% (39-57%) and ocellar setae 70% (56-85%) of frontal length; vt index 0.98 (0.78-1.11). Vibrissal index 0.40 (0.3-0.56). Face yellow to pale brown. Carina prominent,

broadened downwards. Cheek index about 9.58 (6.75-13.00). Eye index 1.42 (1.24-1.64). Occiput pale brown. Antennae yellow to pale brown, aristae with 4 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. Proboscis yellow; palpus yellow, with some setae and numerous setulae, mainly on the lower margin.

Thorax length 0.96 (0.88-1.02) mm. Scutum yellow, 8 rows of acrostichal setulae; the two outer rows not reaching anterior dorsocentral setae in some specimens. One pair of large prescutellar acrostichal setae, about 46% (35-56%) of posterior dorsocentral setae; acrostichal setulae on the sides of prescutellar setae larger than other acrostichal setulae, about 1/3 to 2/3 as long as prescutellar setae. h index 0.95 (0.78-1.10). Transverse distance of dorsocentral setae 285% (228-400%) of longitudinal distance, dc index 0.59 (0.36-0.78). Scutellum yellow, distance between apical scutellar setae about 94% (80-100%) of that between apical and basal one; basal setae convergent; scut index 0.93 (0.83-1.10). Pleura yellow, sterno index 0.71 (0.60-0.80), median katepisternal setae about 33% (25-45%) of anterior one. Halteres yellow. Legs yellow, long and slender.

Wings hyaline, veins yellow, length 1.87 (1.66-2.00) mm, length to width ratio 2.24 (2.17-2.32). Indices: C, 2.31 (2.21-2.39); ac, 2.64 (2.40-3.00); hb, 0.61 (0.54-0.68); 4C, 1.00 (0.92-1.09); 4v, 1.74 (1.50-2.18); 5x, 1.63 (1.20-2.14); M, 0.57 (0.43-0.65); prox. x, 0.58 (0.50-0.68).

Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, pale brown stripes, interrupted at middle, very faint on the distal tergites, more distinct on the proximal ones.

Body length 2.30 (2.10-2.48) mm.

♂ Terminalia (Fig. 5). Epandrium mostly microtrichose, with about 10 lower setae and no upper setae; ventral lobe finger-shaped, narrowed, microtrichose, not covering surstylus. Cerci anteriorly fused with epandrium, microtrichose; setae in ventral margin shorter than in dorsal margin. Surstylus microtrichose, with a row of about 7 peg-like prenisetae, about 5 inner and 5 outer setae. Decasternum little concave, with a central prominence. Hypandrium slightly shorter than epandrium, square-shaped, with narrowed anterior margin; posterior hypandrial process and dorsal arch absent. Gonopods completely fused with hypandrium, linked to paraphysis by a membranous tissue, and with one seta near inner margin. Aedeagus fused to aedeagal apodeme, tubed-shaped, apically expanded with three anterior spur-shape processes (two lateral and one central less pointed), bent forward. Dorsal cleft reduced only to the anterior opening. Aedeagal apodeme laterally flattened, forming a continuous structure with ventral rod. Ventral rod about twice longer than aedeagal apodeme. Paraphysis triangular, pointed apically, with a distal seta.

Paraphysis covers about 3/5 of the ventral rod margin.

♀ General morphology similar to males. Measurements: Frontal length 0.31 (0.28-0.36) mm; frontal index 1.04 (0.78-1.20), top to bottom width ratio 1.24 (1.00-1.36). Ocellar triangle about 48% (39-57%) of frontal length. Distance of or3 to or1 100% (80-120%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 0.97 (0.82-1.12), or2/or1 ratio 0.53 (0.40-0.67), postocellar setae 50% (44-53%) and ocellar setae 79% (59-93%) of frontal length, vt index 0.96 (0.77-1.09). Vibrissal index 0.46 (0.40-0.50). Cheek index about 10.07 (8.33-13.50). Eye index 1.35 (1.14-1.45). Thorax length 1.04 (0.95-1.10) mm. Prescutellar acrostichal setae 48% (40-57%) of posterior dorsocentral setae. h index 0.96 (0.83-1.00). Transverse distance of dorsocentral setae 268% (211-300%) of longitudinal distance, dc index 0.60 (0.50-0.75). Distance between apical scutellar setae about 99% (80-111%) of that between apical and basal one; scut index 0.91 (0.87-0.95). Sterno index 0.78 (0.68-0.83), median katapisternal setae about 33% (27-43%) of anterior one. Wing length 1.81 (1.72-1.90) mm, length to width ratio 1.96 (1.85-2.11). Indices: C, 2.32 (2.22-2.60); ac, 2.53 (2.27-2.80); hb, 0.60 (0.48-0.68); 4C, 1.04 (0.89-1.13); 4v, 1.86 (1.71-2.08); 5x, 1.48 (1.30-1.75); M, 0.57 (0.46-0.65); prox. x, 0.57 (0.50-0.62).

Body length 2.68 (2.30-2.98) mm.

Valves of oviscapt strong, long (ca. 460 μ m) and pointed at tip, with 7 discal and 11-12 marginal peg-like ovisensilla. Spermathecae mushroom-shaped, higher than wide (ca. 80 x 60 μ m), basal introvert reaching about 2/3 of inner capsule.

Puparium. Brownish. Length 2.50 mm; horn index 4.00.

Specimens deposited (type series): Male holotype labeled "*Drosophila solani*; HOLOTYPE ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; 04.V.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum mauritianum*". Nine male paratypes labeled "*Drosophila solani*; PARATYPE ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; 04.V.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum mauritianum*" and ten female paratypes labeled "*Drosophila solani*; PARATYPE ♀; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; 04.V.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum mauritianum*".

Type locality: UFRGS/Campus do Vale, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Etymology: The name refers to *Solanum*, the host plant of this species.

Drosophila jurubeba sp. nov.

Diagnosis. Body colour yellowish to pale brown. Aristae generally with 3 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. One pair of large prescutellar acrostichal setae, basal scutellar setae convergent. Wings hyaline. Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, faint, pale brown stripes, interrupted at middle. Females with valves of oviscapt strong, long (ca. 420 μ m) and pointed at tip; spermathecae mushroom-shaped, higher than wide, basal introvert reaching about 2/3 of inner capsule. Male terminalia as in Fig. 6.

Description: ♂ Head. Frons yellow to pale brown, frontal length 0.31 (0.30-0.36) mm; frontal index 1.06 (0.89-1.38), top to bottom width ratio 1.16 (1.00-1.31). Ocellar triangle slightly prominent, brownish, about 45% (39-47%) of frontal length. Orbital setae black, distance of or3 to or1 80% of or3 to vtm, or1/or3 ratio 0.90 (0.80-1.00), or2/or1 ratio 0.51 (0.40-0.56), postocellar setae 48% (39-53%) and ocellar setae 75% (65-80%) of frontal length; vt index 1.01 (0.83-1.20). Vibrissal index 0.40 (0.30-0.50). Face yellow to pale brown. Carina prominent, broadened downwards. Cheek index about 7.92 (6.25-8.33). Eye index 1.34 (1.20-1.47). Occiput pale brown. Antennae yellow to pale brown, arista with 3 dorsal and 2 ventral branches, plus terminal fork. Proboscis yellow; palpus yellow, with some setae and numerous setulae, mainly on the lower margin.

Thorax length 0.96 (0.88-1.00) mm. Scutum yellow, 8 rows of acrostichal setulae; the two outer rows not reaching anterior dorsocentral setae in some specimens. One pair of large prescutellar acrostichal setae, about 46% (39-56%) of posterior dorsocentral setae; acrostichal setulae on the sides of prescutellar setae larger than other acrostichal setulae, about 1/3 to 2/3 as long as prescutellar setae. h index 1.02 (1.00-1.11). Transverse distance of dorsocentral setae 237% (212-257%) of longitudinal distance, dc index 0.57 (0.52-0.61). Scutellum yellow, distance between apical scutellar setae about 99% (78-128%) of that between apical and basal one; basal setae convergent; scut index 0.90 (0.81-1.00). Pleura yellow, sterno index 0.71 (0.56-0.83), median katepisternal setae about 35% (20-56%) of anterior one. Halteres yellow. Legs yellow, long and slender.

Wings hyaline, veins yellow, length 1.91 (1.86-1.96) mm, length to width ratio 2.20 (2.11-2.40). Indices: C, 2.41 (2.20-2.70); ac, 2.46 (2.27-2.78); hb, 0.53 (0.36-0.72); 4C, 0.98 (0.89-1.09); 4v, 1.82 (1.61-2.00); 5x, 1.60 (1.40-1.88); M, 0.60 (0.54-0.65); prox. x, 0.60

(0.50-0.71).

Abdomen yellow, anterior margin of tergites with thin, pale brown stripes, interrupted at middle, very faint on the distal tergites, more distinct on the proximal ones.

Body length 2.33 (2.41-2.31) mm.

♂ Terminalia (Fig. 6). Epandrium mostly microtrichose, with about 10 lower setae and no upper setae; ventral lobe finger-shaped, narrowed, microtrichose, not covering surstylus. Cerci anteriorly fused with epandrium, microtrichose; setae in ventral margin shorter than in dorsal margin. Surstylus microtrichose, with a row of about 7 peg-like prensisetae, about 3 inner and 7 outer setae. Decasternum with the anterior margin convex. Hypandrium slightly shorter than epandrium, triangular; posterior hypandrial process and dorsal arch absent. Gonopods completely fused with hypandrium, linked to paraphysis by a membranous tissue, and with one seta near inner margin. Aedeagus fused to aedeagal apodeme, tubed-shaped, apically expanded with three anterior spur-shape processes (two lateral and one central less pointed), bent forward. Dorsal cleft about 1/5 of the length of aedeagus. Aedeagal apodeme laterally flattened, forming a continuous structure with ventral rod. Ventral rod about 1.5x longer than aedeagal apodeme. Paraphysis slender, enlarged ventrally in the distal third, and with a distal seta. Paraphysis covers the entire ventral rod margin.

♀ General morphology similar to males. Measurements: Frontal length 0.33 (0.30-0.36) mm; frontal index 1.08 (0.88-1.38), top to bottom width ratio 1.20 (1.06-1.46). Ocellar triangle about 41% (38-47%) of frontal length. Distance of or3 to or1 90% (67-100%) of or3 to vtm, or1/or3 ratio 0.92 (0.82-1.11), or2/or1 ratio 0.47 (0.40-0.56), postocellar setae 48% (44-53%) and ocellar setae 79% (71-88%) of frontal length, vt index 1.04 (1.00-1.09). Vibrissal index 0.46 (0.40-0.50). Cheek index about 10.73 (8.33-13.00). Eye index 1.30 (1.23-1.50). Thorax length 1.04 (0.92-1.18) mm. Prescutellar acrostichal setae 48% (40-56%) of posterior dorsocentral setae. h index 0.97 (0.90-1.00). Transverse distance of dorsocentral setae 242% (200-271%) of longitudinal distance, dc index 0.63 (0.55-0.75). Distance between apical scutellar setae about 93% (75-100%) of that between apical and basal one; scut index 0.87 (0.82-0.95). Sterno index 0.78 (0.72-0.83), median katepisternal setae about 35% (27-42%) of anterior one. Wing length 1.99 (1.88-2.10) mm, length to width ratio 2.18 (2.06-2.28). Indices: C, 2.34 (2.21-2.60); ac, 2.51 (2.27-2.89); hb, 0.57 (0.50-0.60); 4C, 1.02 (0.96-1.09); 4v, 1.88 (1.66-2.09); 5x, 1.54 (1.40-1.67); M, 0.58 (0.52-0.65); prox. x, 0.60 (0.52-0.65).

Body length 2.66 (2.45-2.80) mm.

Valves of oviscapt strong, long (ca. 420 μ m) and pointed at tip, with 7-8 discal and 6-7 marginal peg-like ovisensilla, plus 5-7 trichoid-like marginal ovisensilla. Spermathecae mushroom-shaped, higher than wide (ca. 80 x 60 μ m), basal introvert reaching about 2/3 of inner capsule.

Puparium. Brownish. Length 2.83 (2.50-3.12) mm; horn index 4.36 (4.00-4.88).

Specimens deposited (type series): Male holotype labeled "*Drosophila jurubeba*; HOLOTYPE ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W; 20.VII.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum paniculatum*". Nine male paratypes labeled "*Drosophila jurubeba*; PARATYPE ♂; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; 20.VII.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum paniculatum*", two female paratypes labeled "*Drosophila jurubeba*; PARATYPE ♀; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; 09.VII.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum paniculatum*", three female paratypes labeled "*Drosophila jurubeba*; PARATYPE ♀; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S, 51°07'06.9"W; 09.VII.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum sisymbriifolium*" and five female paratypes labeled "*Drosophila jurubeba*; PARATYPE ♀; Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Campus do Vale (UFRGS); 30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W; 20.VII.2007 col.: H J Schmitz; ex: flores de *Solanum paniculatum*".

Type locality: UFRGS/Campus do Vale, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Etymology: The name refers to *Solanum*, the host plant of this species. Jurubeba is a popular name given to many species of this genus in Brazil.

Morphometrical analysis

In the discriminant analysis performed with 29 characters independent of size, 98% of the males and 95% of the females were correctly classified. The individual scores for the two discriminant functions (roots) are plotted in Fig. 7. External morphological traits in the five species studied here showed large superimposition ranges, making impossible a clear-cut discrimination between them based solely in any single character. The combined multivariate analysis, however, although not recovering totally isolated groups, showed that differences between species are consistent.

Localities

We present here a summary of all the localities where each species of *bromeliae* group of *Drosophila* was recorded in the literature. The localities are given from North to South and coordinates are reproduced when given in the respective reference. Additionally to the literature records, we present new localities for *D. bromeliae* and *D. bromelioides*, and the localities where the new species were found. Localities are described from the most to the least inclusive. We stress, however, that the external morphology is not reliable for species discrimination in this group, so the identity of some specimens in several previous records may be doubtful. Pavan & Cunha (1947), in the description of *D. bromelioides* stated: “[its] external morphology is very closed to that of *D. bromeliae* from which it differs in the chromosome complement.” A description of the aedeagus of *D. bromelioides* was first given only a few decades later, by Val (1982), and the aedeagus of *D. bromeliae* is first described here. So, the presence of such species in some localities requires further confirmation, as pointed below.

***D. bromeliae*:** MEXICO – Yucatán, San Luis Potosí (Wheeler, 1970); HONDURAS - Lancetilla (Clayton & Wasserman, 1957); EL SALVADOR (Heed, 1956; 1957); CAYMAN ISLANDS - Grand Cayman Island (Yoon, 1996; Lachance *et al.*, 2001); CUBA - Havana (Sturtevant, 1921); JAMAICA (Wheeler, 1970); PUERTO RICO (Wheeler, 1970); MARTINIQUE – Le Prêcheur (David, 1973); COLOMBIA? (Wheeler, 1970); BRAZIL – São Paulo: Campos do Jordão (Hsu, 1949).

New localities: BRAZIL – Pará: Belém, Reserva do Mocambo (01°26'34.35”S; 48°24'35.59”W, 40m); Pernambuco: Recife, UFPE campus (08°03'14”S; 34°57'00”W); Recife, UFRPE campus (08°00'45”S; 34°56'57”W); Vitória de Santo Antão, IFPE/Campus Vitória (08°06'04.1”S; 35°17'41.3”W; 152m); Mato Grosso: Tangará da Serra, Park in town center (14°04'38”S; 57°03'45”W) (*Drosophila* sp.1 of Blauth & Gottschalk, 2007).

Notes: As discussed above, the records based only in external morphology may be treated with some caveats. There is confirmation only for Cuba (the original specimens of Sturtevant, 1921) and Grand Cayman Island (the strain studied by us, with identity confirmed with analysis of mitotic chromosomes), besides the new localities. Although most of the Central America localities are probably correct, we stress the need for more samples in the state of São Paulo, Brazil, to confirm or deny the presence of this species in that region. Hsu (1949) depicted the external male terminalia of his single specimen from Campos do Jordão, but the illustration is insufficient to confirm its identity. Although its presence in the state of São Paulo remains doubtful, its occurrence in Brazil is confirmed for northern localities (Mato Grosso, Pará and Pernambuco).

***D. bromelioides*:** BRAZIL – Bahia: Salvador, Camurugipe (Malogolowkin, 1951); Fazenda Trijunção (14°49'S; 45°58'W) (Roque & Tidon, 2008); Goiás: São Jorge (14°08'S; 47°31'W)

(Chaves & Tidon, 2008); Minas Gerais: Santana do Riacho, Parque Nacional da Serra do Cipó, Alto do Cupim brook, 18 km from the bridge over Cipó river (on km 112.9 of the MG-010 highway in the direction to Conceição do Mato Dentro) (Vilela & Mori, 1999); Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Botanical Garden (Frota-Pessoa, 1952); São Paulo: São Paulo (Pavan & Cunha, 1947); Santa Catarina: Governador Celso Ramos, Armação (27°21'16"S; 48°32'21"W); Antônio Carlos (27°28'02"S; 48°51'01"W) (Schmitz & Hofmann, 2005); Florianópolis, Campeche Island (27°41'81"S; 48°28'88"W) (De Toni *et al.*, 2001; 2007); Florianópolis, Itacorubi (27°34'34"S; 48°31'23"W) (Schmitz & Hofmann, 2005; Schmitz *et al.*, 2007); Florianópolis, Ratonas (27°27'45"S; 48°30'28"W); Florianópolis, Tavares (27°39'13"S; 48°32'12"W) (Schmitz *et al.*, 2007); Florianópolis, Morro da Cruz (27°35'040"S; 48°31'040"W); Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina campus (27°36'129"S; 48°31'219"W); Florianópolis, 14^a Brigada Motorizada de Infantaria (27°35'273"S; 48°33'023"W) (Gottschalk *et al.*, 2007); Rio Grande do Sul: Morungava, situated 25 km south of Taquara (29°45'S; 50°45'W) (Petersen, 1960); Porto Alegre (30°03'00"S; 51°13'60"W) (Schmitz & Hofmann, 2005).

New localities: BRAZIL – São Paulo: Águas de Lindóia, Morro do Cruzeiro (22°28'43"S; 46°37'34"W); Paraná: Guarapuava, Parque do Lago (25°24'9.099"S; 51°28'30.82"W); Rio Grande do Sul: Caxias do Sul, Grupo de Escoteiros Saint Hilaire (29°09'38.2"S; 51°08'31.7"W, 706m); Caxias do Sul, Marcopolo/BR-116 road (29°11'06.4"S; 51°10'23.8"W, 695m); Pelotas, Balneário dos Prazeres (31°43'28.4"S; 52°11'59.5"W; 15m, and 31°44'06.5"S; 52°12'54.1"W; 21m); Pelotas, near Laranjal (31°45'28.4"S; 52°15'42.8"W; 15m); Pelotas, Fragata (31°45'18.3"; 52°23'01.1"W; 62m); Pelotas, Fragata, near Arroio Fragata (31°45'29.5"S; 52°24'05.05"W; 62m).

We have also collected many specimens in the previously registered municipalities of Antônio Carlos, Florianópolis, Governador Celso Ramos (SC) and Porto Alegre (RS), in the following localities: Santa Catarina: Governador Celso Ramos, Anhatomirim Island (27°25'38.09"S; 48°33'53.89"W); Florianópolis, Ratonas Grande Island (27°28'20.20"S; 48°33'43.00"W); Antônio Carlos, Centro (27°31'03.373"S; 48°46'18.23"W); Florianópolis, Ponta do Coral (27°34'23"S; 48°31'41"W); Florianópolis, Santa Mônica (27°35'34"; 48°30'53"W); Florianópolis, Morro da Lagoa da Conceição (27°35'40.9"S; 48°28'41.6"); Florianópolis, UFSC campus (27°36'08.127"S; 48°31'30.39"W); Florianópolis, Joaquina (27°36'43.9"S; 48°26'36.3"W); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Farroupilha (30°02'13.0"S; 51°13'06.0"W); Porto Alegre, Parque Maurício Sirotsky Sobrinho (30°02'34"; 51°13'55"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Porto Alegre, Parque Gabriel Knijnick (30°06'12"S; 51°12'08"W).

Notes: The records prior to Val (1982) may be doubtful: Malagolowkin (1951), in Salvador, Bahia, Frota-Pessoa (1952), in Rio de Janeiro, and Petersen (1960), in Rio Grande do Sul. The

occurrence of this species in Rio Grande do Sul was later confirmed by Schmitz & Hofmann (2005) and the present study. Roque & Tidon (2008) reported the species for the extreme southwest of Bahia. Its occurrence as north as Salvador requires confirmation, as well as in Rio de Janeiro.

***D. anaeterrae* sp. nov.:** BRAZIL - Santa Catarina: Antônio Carlos, Rachadel (27°29'52.8"S; 48°47'38.6"W); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Parque Marinha do Brasil (30°03'16.3"S; 51°13'57.8"W); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Pelotas, Balneário dos Prazeres (31°43'28.4"S; 52°11'59.5"W; 15m).

***D. solani* sp. nov.:** BRAZIL - Santa Catarina: Florianópolis, Córrego Grande (27°35'37.6"S; 48°29'37.0"W); Rio Grande do Sul: Cruz Alta, CEPPA (28°34'11"S; 53°36'53"W) (*D.* type IV of Hochmüller *et al.*, 2010); Flores da Cunha, RS-122 road (29°01'27.9"S; 51°11'41.0"W; 729m, and 29°01'37.4"S; 51°11'43.7"W; 733m); Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W).

***D. jurubeba* sp. nov.:** BRAZIL - Santa Catarina: Florianópolis, Córrego Grande (27°35'37.6"S; 48°29'37.0"W); Rio Grande do Sul: Porto Alegre, UFRGS/Campus do Vale (30°04'12.4"S; 51°07'06.9"W); Pelotas, Balneário dos Prazeres (31°43'28.4"S; 52°11'59.5"W; 15m, and 31°44'06.5"S; 52°12'54.1"W; 21m).

Other species:

***D. floriae*:** CUBA - Havana; Guareiras (Sturtevant, 1921); PUERTO RICO - Mayaguez; Adjuntas; Guanabo (Sturtevant, 1921); HONDURAS - Tegucigalpa (Sturtevant, 1921); COSTA RICA - San Jose (Sturtevant, 1921); Suiza de Turrialba (Duda, 1925).

***D. aguape*:** BRAZIL - Mato Grosso: Estação Ecológica da Ilha de Taiamã (16°50'S; 57°38'W) (Val & Marques, 1996).

***D. speciosa*:** BRAZIL - Pará: Belém, EMBRAPA/CPATU germoplasm collection (01°20'S; 48°03'W); Curuçá, Caxiuanã Scientific Station (Silva & Martins, 2004).

Specimens of uncertain identity: Clayton & Wasserman (1957) cited "*bromelioides* (?)" for Santa Maria de Ostuma, Nicaragua. Later, Clayton & Wheeler (1975) referred to it as "species identity uncertain". Throckmorton (1962) analysed some internal structures of a species of the *bromeliae* group cited as "species I", from Leticia, Colombia. In the review of Wheeler (1970), *D. bromeliae* is cited for Colombia, perhaps based in Throckmorton's species, since there is not any other reference on *bromeliae* group in Colombia. Sakai (2002) reported to have collected "*Drosophila* aff. *bromeliae*" and "*Drosophila* aff. *floriae*" in flowers of *Aristolochia* in Panama. Santos & Vilela (2005) reported to have collected an "unidentified species of the *bromeliae* group, 1 male, IX.1993" from living flowers of *Cestrum sendtnerianum* in the Biological Reserve of the Instituto de Botânica, São Paulo-SP, Brazil.

Host plants

All host plants recorded in the literature for the described species of the *bromeliae* group of *Drosophila* are reviewed in Table 1. Taxonomic placement and nomenclature followed Souza & Lorenzi (2005) and references therein. In case of some taxonomic change, the name as cited in the original reference follows in brackets. As well as for the geographical records, data from some references, as Frota-Pessoa (1952) and Lachance *et al.* (2001) must be considered carefully, as specimens identification probably considered only external characters. Additionally, based on our own collections, a considerable amount of data is added.

As seen, the host plants preferences of each species showed to be markedly different. *Drosophila bromelioides* is a very generalist species, its host plants ranging from many botanical families, including native and exotic species. Although less information is available for *D. bromeliae*, it also seems to be a generalist species. *Drosophila anaeterrae* sp. nov. is an oligophagous species, using relatively less resources in comparison with *D. bromelioides*. On the other hand, *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov. showed a specialised ecology, apparently restrict to flowers of *Solanum* species.

Species discrimination and comparative morphology

The five species treated in the present study may be considered cryptic in respect to the external morphology, all of them presenting dull yellowish to pale brown body colour (Fig. 8). Furthermore, most of the measurements taken have large superimposing ranges. We did not analyse any specimen of *D. aguape*, *D. floriae* and *D. speciosa*, but the three new species described here were not considered conspecific with them when compared to the original descriptions of such species. They differ from *D. aguape* and *D. floriae* on the body colour, described as “dark brown to black” for *D. aguape* (Val & Marques, 1996) and “[d]orsum of thorax, scutellum and pleurae dull brown” and “[a]bdomen dark brown” for *D. floriae* (Sturtevant, 1916, 1921), contrasting with our yellow species. They also differ from *D. aguape* on the aedeagus morphology. *Drosophila speciosa*, on the other hand, also is a yellow species, but again differs from our new species by the aedeagus morphology (Silva & Martins, 2004). Finally, *D. bromeliae* is also described as a yellow species, but the only description then available (Sturtevat, 1921) is not sufficient to provide a conclusive discrimination from other yellow species of the group, especially by the lack of description of aedeagus morphology until now. It could be distinguished from *D. bromelioides*

based only in mitotic chromosomes figures (Metz, 1916; Pavan & Cunha, 1947). An analysis of Cayman's strain confirmed that, by external morphology, this species is practically indistinguishable from the species found by us, but it proved to be different from all other by the aedeagus morphology, and the first description of this character was given here. Due to the high similarity of the morphology of the five species treated here, a summary of the main diagnostic structures is given in Fig. 9. The morphology of aedeagus remains the most important character to distinguish them (Fig 9A-E). However, other characters may be useful, especially for females, and are discussed below.

For female discrimination, *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov. can be distinguished from the others species treated here by the strikingly bigger oviscapt valves. In the specimens examined, the oviscapt valve lengths for each species were as follows: *D. bromeliae*: 300 µm; *D. bromelioides*: 300-320 µm; *D. anaeterrae* sp. nov.: 380-400 µm; *D. solani* sp. nov.: 460 µm; *D. jurubeba* sp. nov.: 420 µm. The *Solanum*-specialised species also can be differentiated between them, *D. solani* sp. nov. having oviscapt valves slightly larger, being wider in the basal part, and getting narrower gradually until the apical point (Fig. 9I), while *D. jurubeba* sp. nov. presents oviscapt valves roughly equal in width in all their extension, except by a more abrupt narrowing in the bridge of the valves and in the apical point (Fig. 9J). *Drosophila bromeliae* and *D. bromelioides* showed the smaller oviscapt valves, being roughly identical (Figs 9F-G). In the other hand, *D. anaeterrae* sp. nov. presented oviscapt valve size intermediary (Fig. 9H) between the *Solanum*-specialised species and the generalists *D. bromeliae* and *D. bromelioides*. Interestingly, the variety of breeding sites utilized by *D. anaeterrae* sp. nov. also are intermediary between the specialised species and the very generalist *D. bromelioides*. There seems to be a correlation between specialisation and size of the oviscapt valves, the more specialised the species, the larger the oviscapt valves.

Although not constituting a practical character for species discrimination, the number of ovisensilla in oviscapt valves also varied between species. There were large superimposing ranges in the number of discal, marginal and total ovisensilla for *D. bromeliae*, *D. bromelioides* and *D. anaeterrae* sp. nov., but a statistical analysis showed significant differences. With n=30 for all species, the means and ranges found for each species, and the results of Kruskal-Wallis tests, followed by Mann-Whitney tests for pairwise comparisons were as follows: discal ovisensilla (Hc=49.08; p<<0.0001) – *D. bromelioides* (mean=5.8, range: 5-8) > *D. anaeterrae* sp. nov. (mean=5.3, range: 5-6) > *D. bromeliae* (mean=4.3, range: 3-6); marginal ovisensilla (Hc=47.88; p<<0.001) – *D. anaeterrae* sp. nov. (mean=15.7, range: 13-18) > *D. bromelioides* (mean=13.4, range: 10-17) > *D. bromeliae* (mean=12.4, range: 10-15); total ovisensilla (Hc=50.65, p<<0.001) -

D. anaeterrae sp. nov. (mean=20.9, range: 18-24) > *D. bromelioides* (mean=19.2, range: 15-25) > *D. bromeliae* (mean=16.7, range: 13-21).

Other structure that can give some help in the discrimination of females is the spermathecae. *Drosophila bromeliae* has small spermathecae, just ~ 40µm high (Fig. 9K), in contrast to ~ 80µm high in all the other species. Spermathecae of *D. bromeliae* are also rather square, as wide as high, while in the others they are higher than wide. So, *D. bromeliae* and *D. bromelioides*, the only species that remained indistinguishable using the oviscapt morphology, could be distinguished by spermathecae. Additionally, *D. anaeterrae* sp. nov. could be differentiated from *D. bromelioides*, *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov. by the basal introvert, that reaches only about 1/3 or 1/2 of the inner capsule in the former (Fig. 9M), and about 2/3 to 3/4 in the latter species. In addition, they are slightly more rounded in *D. anaeterrae* sp. nov. Spermathecae of the remaining three species were rather indistinguishable (Fig 9L, N-O).

The arisal morphology revealed to have some value in helping to discriminate *D. jurubeba* sp. nov. from the other species treated here. The arisae are constituted by an arisal trunk, a number of dorsal and ventral branches and a terminal fork. In the specimens observed, the number of dorsal branches varied from three to five, but was generally three for *D. jurubeba* sp. nov. (Fig. 9T) and four for all other species (Figs 9P-S), although some intraspecific variation could be found. For *D. bromeliae*, 92.5% (n=120) of the individuals presented four dorsal branches; for *D. bromelioides*, 91.6% (n=119); *D. anaeterrae* sp. nov., 93.4% (n=136); *D. solani* sp. nov., 98.8% (n=84); otherwise, for *D. jurubeba* sp. nov., 92.0% (n=105) of the individuals presented just three dorsal branches. Although this character does not provide a clear-cut discrimination method, due to some intraspecific variation, it is helpful especially in a prior discrimination between the two microsympatric *Solanum*-breeding species.

Concluding Remarks

The five species treated here represent cryptic species regarding external morphology, requiring the analysis of aedeagus morphology to a reliable discrimination, with oviscapt valves, spermathecae and arisae offering secondary characters to species discrimination.

Despite the similarity in morphology, they vary largely in the ecological preferences for host plants, from very generalist species, as *D. bromelioides*, to *Solanum*-specialised species, as *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp. nov. These two specialised species are sometimes microsympatric and microsynchronous in the same plant, at least in *Solanum paniculatum*. *Drosophila bromelioides* and *D. anaeterrae* sp. nov. can also occur in the same condition, coexisting in some shared host plants, though the first is very more generalist. Although less

information is available for *D. bromeliae*, it also seems to be a generalist species, sharing at least some host plants with *D. bromelioides*. However, in our collections, we did not find the two species in sympatry.

The exact geographical distribution of each species of the *bromeliae* group of *Drosophila* remains to be known. As our samples from northern localities were limited and other data are scarce, more collections are needed to investigate if the new species described here, found in southern Brazil, are present in other areas, or even to clear the geographical distribution of the previously described species, including also those not treated in this study. A more complete biogeographic panorama of the group would be useful to better understand its evolution. We must stress, however, the importance of using the morphological characters discussed in the present study, especially the morphology of aedeagus to a reliable identification of specimens, allied with a complete survey for breeding sites in a variety of host plants. Some of the species of this group may be overlooked if only the external morphology is taken out, or if their host plants are not investigated, as they are generally not attracted to the artificial baited-traps used by most of the drosophilid surveys, neither by the resources more frequently investigated, as decaying fruits. It is probable, even, that several species still remain to be discovered.

ACKNOWLEDGEMENTS

People from various institutions provided us with valuable help in collection trips, sending material or making available their labs: Monica L. Blauth (Universidade Federal de Pelotas), Cláudia Rohde, Ana Cristina L. Garcia (Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória), José Ferreira dos Santos, Tania T. Rieger, Evilis S. Monte, Luciana F. de Souto (Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas) and Paulo R. P. Hofmann (Universidade Federal de Santa Catarina). The following people kindly identified some plant species: Lilian A. Mentz, João André Jarenkow (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Luiz Carlos B. Lobato, Francismeire Bonadeu da Silva e Ana Kelly Kock (Museu Paraense Emílio Goeldi). Sincere thanks are due to all of them and to the team of Laboratório de *Drosophila* at Universidade Federal do Rio Grande do Sul. This research was supported by grants and fellowships of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Bächli, G.; Vilela, C.R.; Escher, A.S. & Saura, A. 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 39: 1-362.
- Blauth, M.L. & Gottschalk, M.S. 2007. A novel record of Drosophilidae in the Cerrado biome of the Mato Grosso, west-central Brazil. *Drosophila Information Service*, 90: 90-96.
- Clayton, F.E. & Wasserman, M. 1957. Chromosomal studies of several species of *Drosophila*. *The University of Texas Publication*, 5721: 125-131.
- Chaves, N.B. & Tidon, R. 2008. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilids) of the Brazilian savanna. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52: 340-358.
- Clayton, F.E. & Wheeler, M.R. 1975. A catalog of *Drosophila* metaphase chromosome configurations. In: King, R.C. (ed.), *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, vol.3: 471-512.
- David, J. 1973. Toxicité de faibles concentrations d'alcool ethylique pour une espèce tropicale de Drosophile: *Drosophila bromeliae* Sturtevant. *Comptes Rendus des Séances de l'Academie des Sciences*, 277: 2235-2238.
- De Toni, D.C.; Gottschalk, M.S.; Cordeiro, J.; Hofmann, P.R.P. & Valente, V.L.S. 2007. Study of the Drosophilidae (Diptera) communities on Atlantic forest islands of Santa Catarina state, Brazil. *Neotropical Entomology*, 36: 356-375.
- De Toni, D.C.; Hofmann, P.R.P. & Valente, V.L.S. 2001. First record of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Biotemas*, 14: 71-85.
- Duda, O. 1925. Die costaricanischen Drosophiliden des Ungarischen National-Museums zu Budapest. *Annales Musei Nationalis Hungarici*, 22: 149-229.
- Frota-Pessoa, O. 1952. Flower-feeding Drosophilidae. *Drosophila Information Service*, 26: 101-102.
- Gottschalk, M.S.; De Toni, D.C.; Valente, V.L.S. & Hofmann, P.R.P. 2007. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. *Neotropical Entomology*, 36: 848-862.
- Heed, W.B. 1956. Apuntes sobre la ecología y la dispersión de los Drosophilidae (Diptera) de El Salvador. *Comunicaciones. Instituto Tropical de Investigaciones Científicas*, 5: 59-74.
- Heed, W.B. 1957. Ecological and distributional notes on the Drosophilidae (Diptera) of El Salvador. *The University of Texas Publications*, 5721: 62-78.
- Hochmüller, C.J.C.; Lopes-da-Silva, M.; Valente, V.L.S. & Schmitz, H.J. 2010. The drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in

- the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. *Papéis Avulsos de Zoologia* 50: 285-295.
- Hsu, T.C. 1949. The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to systematics. *The University of Texas Publication*, 4920: 80-142.
- Lachance, M.-A.; Bowles, J.M.; Kwon, S.; Marinoni, G.; Starmer, W.T. & Janzen, D.H. 2001. *Metschnikowia lochheadii* and *Metschnikowia drosophilae*, two new yeast species isolated from insects associated with flowers. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 103-109.
- Malogolowkin, C. 1951. Drosophilideos colhidos na Bahia, com descrição de uma espécie nova (Diptera). *Revista Brasileira de Biologia*, 11: 431-434.
- Metz, C.W. 1916. Chromosome studies on the Diptera. III. Additional Types of Chromosome Groups in the Drosophilidae. *American Naturalist*, 50: 587-599.
- Patterson, J.T. & Stone, W.S. 1952. *Evolution in the genus Drosophila*. Macmillan, New York.
- Pavan, C. & Cunha, A.B. 1947. Espécies brasileiras de *Drosophila*. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, 86: 20-64.
- Petersen, J.A. 1960. Studies in the ecology of the genus *Drosophila*. I. Collections in two different life zones and seasonal variations in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 20: 3-16.
- Sakai, S. 2002. *Aristolochia* spp. (Aristolochiaceae) pollinated by flies breeding on decomposing flowers in Panama. *American Journal of Botany*, 89: 527-534.
- Santos, R.C.O. & Vilela, C.R. 2005. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 49: 544-551.
- Schmitz, H.J. & Hofmann, P.R.P. 2005. First record of subgenus *Phloridosa* of *Drosophila* in southern Brazil, with notes on breeding sites. *Drosophila Information Service*, 88: 97-101.
- Schmitz, H.J.; Valente, V.L.S. & Hofmann, P.R.P. 2007. Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, southern Brazil. *Neotropical Entomology*, 36: 53-64.
- Silva, A.A.R. & Martins, M.B. 2004. A new anthophilic species of *Drosophila* Fallén belonging to the *bromeliae* group of species (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 435-437.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Sturtevant, A.H. 1916. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three

- new species. *Annals of the Entomological Society of America*, 9: 323-343.
- Sturtevant, A.H. 1921. The North American Species of *Drosophila*. *Carnegie Institute of Washington Publication*, 301: 1-150.
- Throckmorton, L.H. 1962. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. *The University of Texas Publication*, 6205: 207-343.
- Val, F.C. & Marques, M.D. 1996. Drosophilidae (Diptera) from the Pantanal of Mato Grosso (Brazil), with the description of a new species belonging to the *bromeliae* group of the genus *Drosophila*. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 39: 223-230.
- Val, F.C. 1982. The male genitalia of some Neotropical *Drosophila*: notes and illustrations. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 34: 309-347.
- Vilela, C.R. & Mori, L. 1999. The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó: further notes. *Revista Brasileira de Entomologia*, 43: 319-128.
- Wheeler, M.R. 1970. *A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States*. 79. *Family Drosophilidae*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Yoon, Z. 1996. Stock List. National Drosophila Species Resource Center. *Drosophila Information Service*, 77: 1-44.

Table 1: List of host plants used as breeding sites by species of the *bromeliae* group of *Drosophila*: literature review and new data.

Family	Species	Reference
<i>D. bromeliae</i>		
Acanthaceae	<i>Thunbergia grandiflora</i>	*
Bignoniaceae	<i>Distictela cuneifolia</i>	*
Convolvulaceae	<i>Ipomoea asarifolia</i>	*
	<i>Ipomoea</i> sp.	(5)
	?	(8)
Malvaceae	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	*
<i>D. bromelioides</i>		
Acanthaceae	<i>Thunbergia alata</i>	(3), *
	<i>Thunbergia grandiflora</i>	*
Apocynaceae	<i>Allamanda cathartica</i> [<i>A. nobilis</i>]	(3)
	<i>Allamanda polyantha</i>	*
	<i>Cryptostegia grandiflora</i>	(3)
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia gigantea</i>	*
Asparagaceae	<i>Yucca guatemalensis</i>	*
Bignoniaceae	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	*
	<i>Kigelia pinnata</i> [<i>K. aethiopica</i>]	(3)
	<i>Macfadyena unguis-catis</i>	*
	<i>Mansoa difficilis</i> [<i>Codanthus splendens</i>]	(3)
	<i>Pyrostegia venusta</i>	*
	<i>Spathodea campanulata</i>	*
	<i>Tabebuia alba</i>	*
	<i>Tabebuia heptaphylla</i>	*
<i>Tecoma stans</i>	*	
Boraginaceae	<i>Cordia superba</i>	(3)
Convolvulaceae	<i>Ipomoea alba</i>	*
	<i>Ipomoea batatas</i>	(7)
	<i>Ipomoea cairica</i>	(7), (9), *
	<i>Ipomoea carnea fistulosa</i>	(7)
	<i>Ipomoea</i> aff. <i>chiliantha</i>	(7), (9)
	<i>Ipomoea indica</i> [<i>I. congesta</i>]	(7), *
	<i>Ipomoea pes-caprae</i>	(7)
<i>Ipomoea ternata</i>	(3)	

Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	(3), (7)
	<i>Luffa aegyptica</i> [<i>L. cylindrica</i>]	(3)
Fabaceae	<i>Bauhinia variegata</i>	*
	<i>Brownea grandiceps</i>	(3)
	<i>Wisteria floribunda</i>	*
Iridaceae	<i>Diets bicolor</i>	*
Malvaceae	<i>Abutilon</i> sp.	*
	<i>Ceiba speciosa</i>	*
	<i>Hibiscus pernambucensis</i>	(9), *
	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	*
	<i>Hibiscus syriacus</i>	(2)
	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	*
Passifloraceae	<i>Passiflora alata</i>	*
	<i>Passiflora edulis</i>	*
Solanaceae	<i>Brugmansia arborea</i> [<i>Datura arborea</i>]	(3)
	<i>Brugmansia suaveolens</i>	(7), *
	<i>Brunfelsia grandiflora</i>	(3)
Tropaeolaceae	<i>Tropaeolum majus</i>	*
Zingiberaceae	<i>Hedychium coronarium</i>	(3), *
<i>D. anaeterrae</i> sp. nov.		
Acanthaceae	<i>Thunbergia grandiflora</i>	*
Apocynaceae	<i>Allamanda cathartica</i>	*
Convolvulaceae	<i>Ipomoea alba</i>	*
Fabaceae	<i>Bauhinia variegata</i>	*
Malvaceae	<i>Ceiba speciosa</i>	*
Solanaceae	<i>Brugmansia suaveolens</i>	*
<i>D. solani</i> sp. nov.		
Solanaceae	<i>Solanum mauritianum</i>	*
	<i>Solanum paniculatum</i>	*
<i>D. jurubeba</i> sp. nov.		
Solanaceae	<i>Solanum paniculatum</i>	*
	<i>Solanum sisymbriifolium</i>	*
Other species		
<i>D. florum</i>		
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> [melon]	(1)
Solanaceae	<i>Brugmansia</i> [<i>Datura</i>]	(1)

D. aguape

Pontederiaceae *Eichhornia azurea* (4)

D. speciosa

Malvaceae [Sterculiaceae] *Theobroma speciosum* (6)

Passifloraceae *Passiflora edulis* (6)

(1) Sturtevant (1921); (2) Pavan & Cunha (1947); (3) Frota-Pessoa (1952); (4) Val & Marques (1996); (5) Lachance *et al.* (2001); (6) Silva & Martins (2004); (7) Schmitz & Hofmann (2005); (8) Blauth & Gottschalk (2007); (9) Schmitz *et al.* (2007); * the present study.



FIGURE 1. Mitotic chromosomes of *D. bromeliae*, Grand Cayman strain.

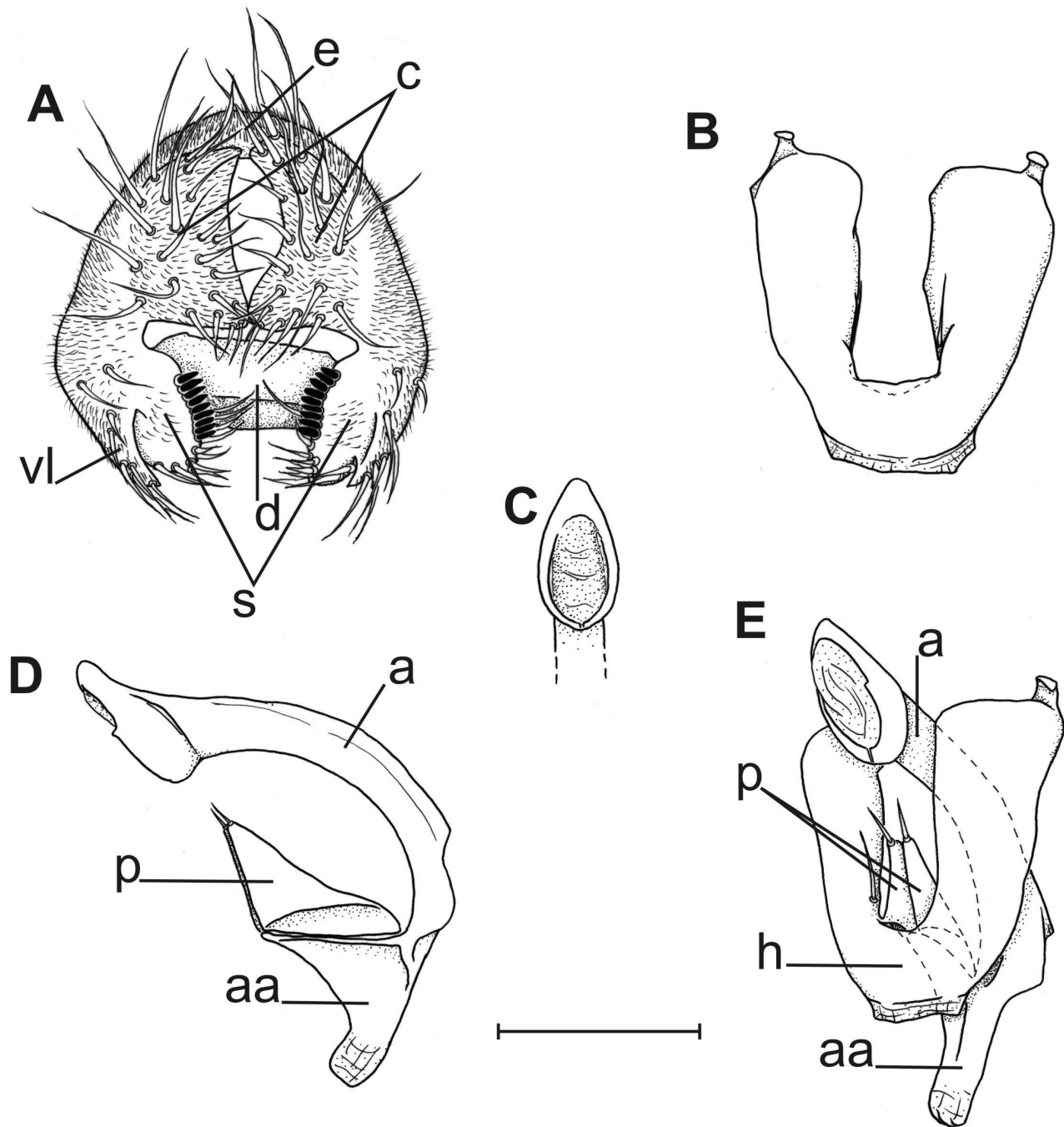


FIGURE 2. Male terminalia of *D. bromeliae*. A. External terminalia in posterior view. B. Hyandrium in posterior view. C. Tip of aedeagus in ventral view. D. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses in right lateral view. E. Internal terminalia in latero-ventral view. a = aedeagus; aa = aedeagal apodeme; c = cerci; d = decasternum; e = epandrium; h = hipandrium; p = paraphyses; s = surstili; vl = ventral lobe. Bar = 100 μ m.

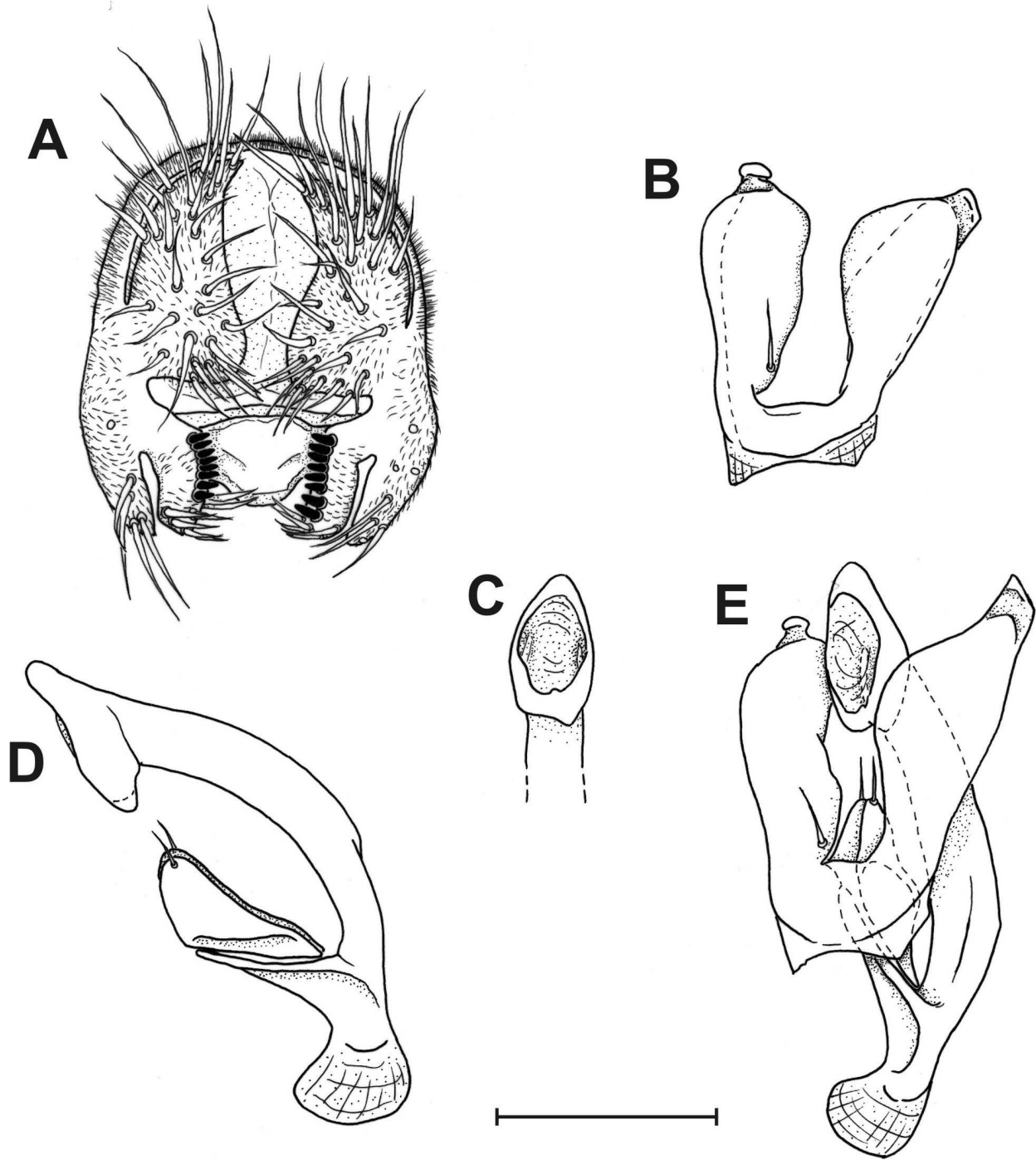


FIGURE 3. Male terminalia of *D. bromelioides*. A. External terminalia in posterior view. B. Hyandrium in posterior view. C. Tip of aedeagus in ventral view. D. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses in right lateral view. E. Internal terminalia in latero-ventral view. Bar = 100 μ m.

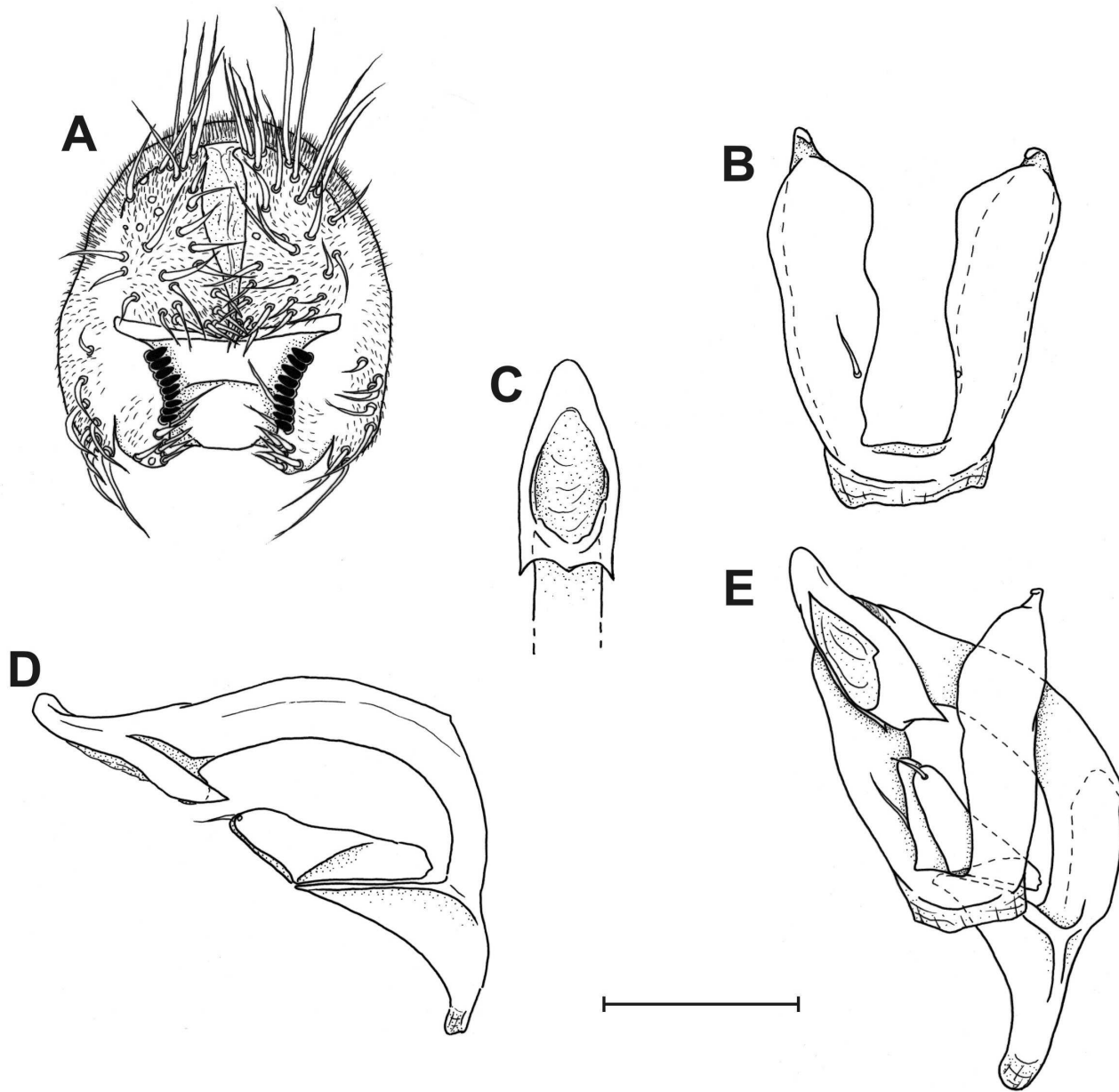


FIGURE 4. Male terminalia of *D. anaeterrae* sp. nov. A. External terminalia in posterior view. B. Hypandrium in posterior view. C. Tip of aedeagus in ventral view. D. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses in right lateral view. E. Internal terminalia in latero-ventral view. Bar = 100µm.

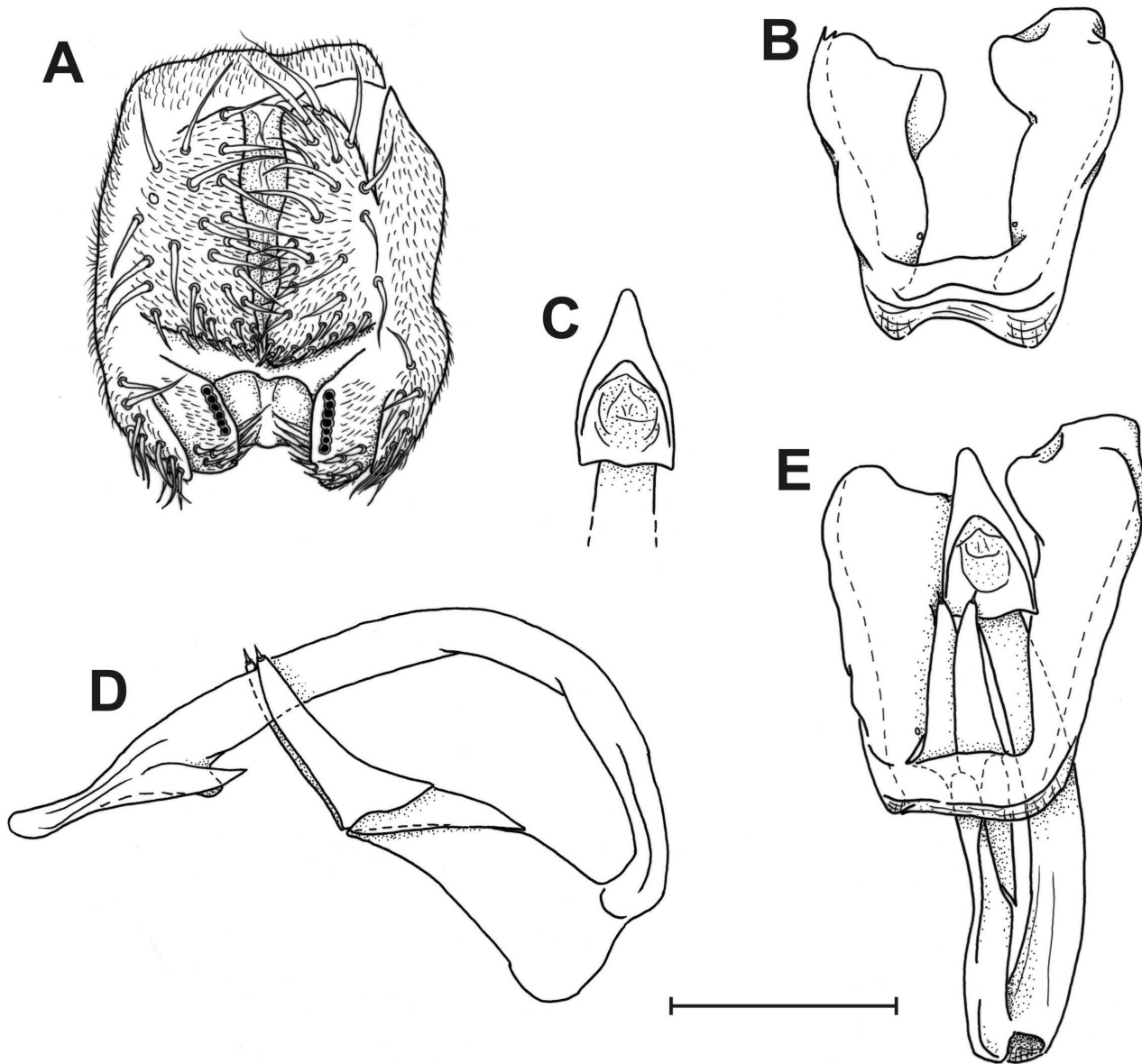


FIGURE 5. Male terminalia of *D. solani* sp. nov. A. External terminalia in posterior view. B. Hypandrium in posterior view. C. Tip of aedeagus in ventral view. D. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses in right lateral view. E. Internal terminalia in latero-ventral view. Bar = 100µm.

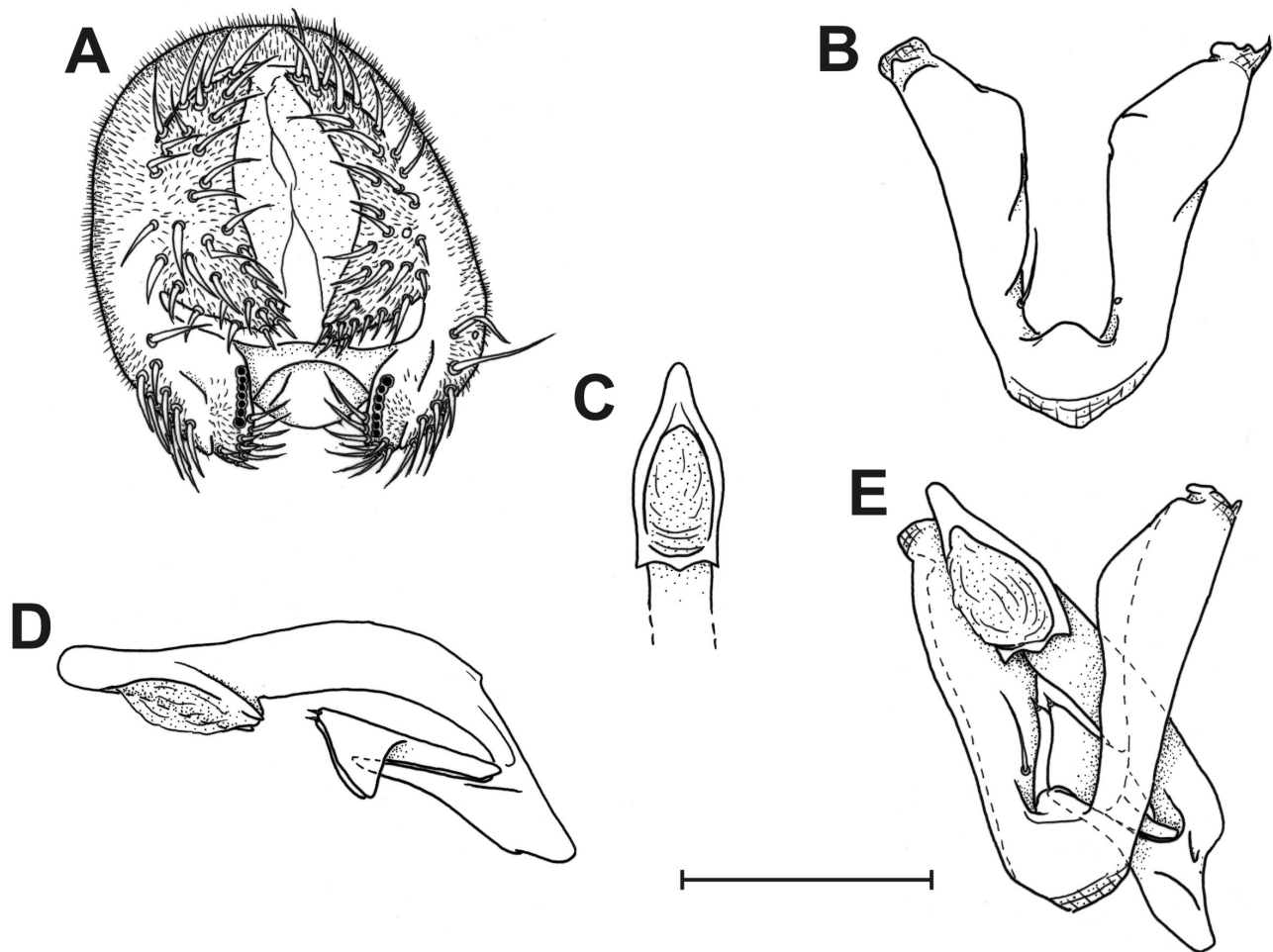
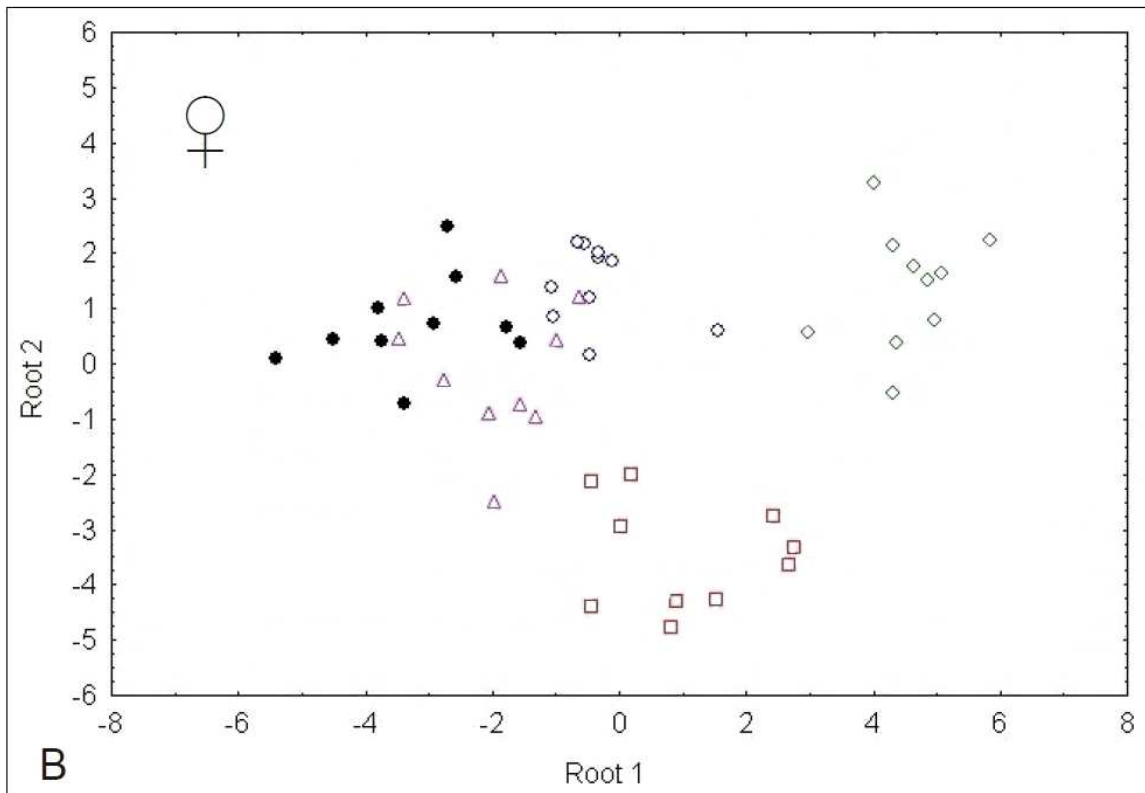
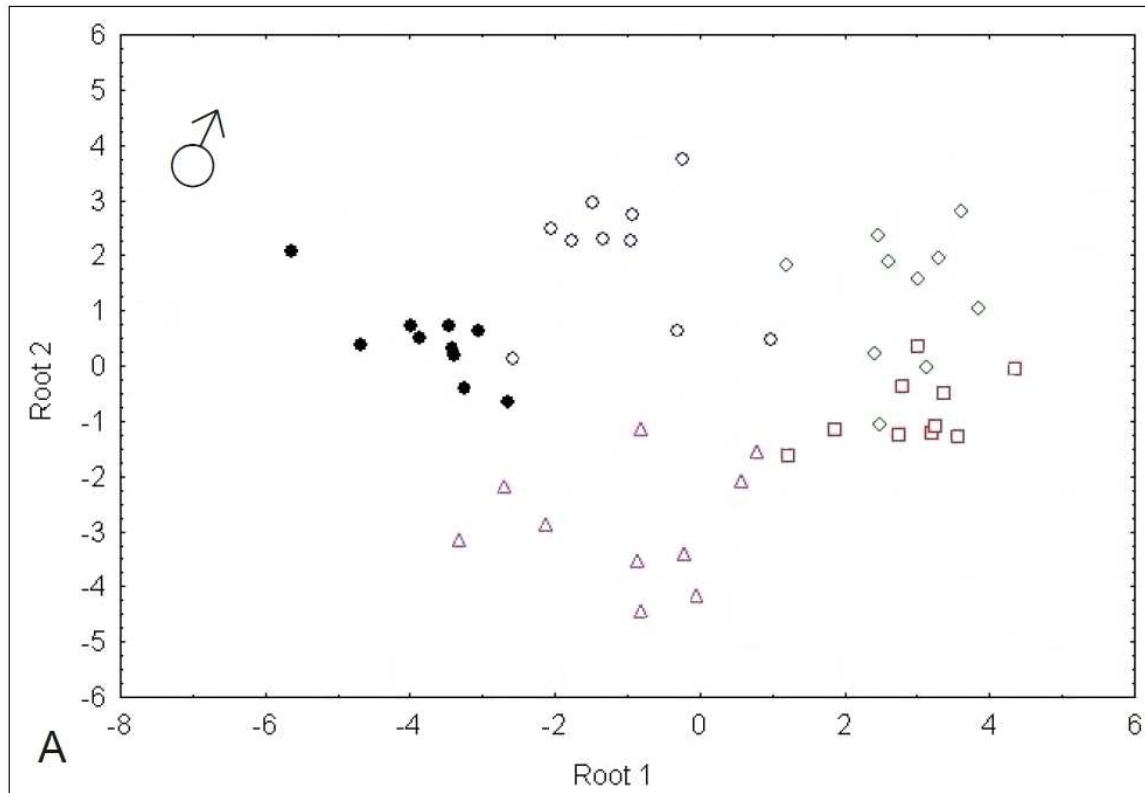


FIGURE 6. Male terminalia of *D. jurubeba* sp. nov. A. External terminalia in posterior view. B. Hypandrium in posterior view. C. Tip of aedeagus in ventral view. D. Aedeagus, aedeagal apodeme and paraphyses in right lateral view. E. Internal terminalia in latero-ventral view. Bar = 100µm.



◇ *D. bromeliae* □ *D. bromelioides* ○ *D. anaeterrae* sp. nov. △ *D. solani* sp. nov. ● *D. jurubeba* sp. nov.

FIGURE 7. Plot of the individual scores for the two discriminant functions (roots) of the discriminant analysis based on 29 morphological characters for five cryptic species of the *bromeliae* group of *Drosophila*. A. Males. B. Females.



FIGURE 8. Habitus of *bromeliae* group of *Drosophila*, represented by *D. bromelioides*. Living specimens, from UFRGS/Campus do Vale, Porto Alegre strain. Left: male, lateral view. Right: female, oblique dorsal view.

D. bromeliae

D. bromelioides

D. anaeterrae
sp. nov.

D. solani
sp. nov.

D. jurubeba
sp. nov.

Aedeagus



Oviscapt valves



Spermathecae



Aristae

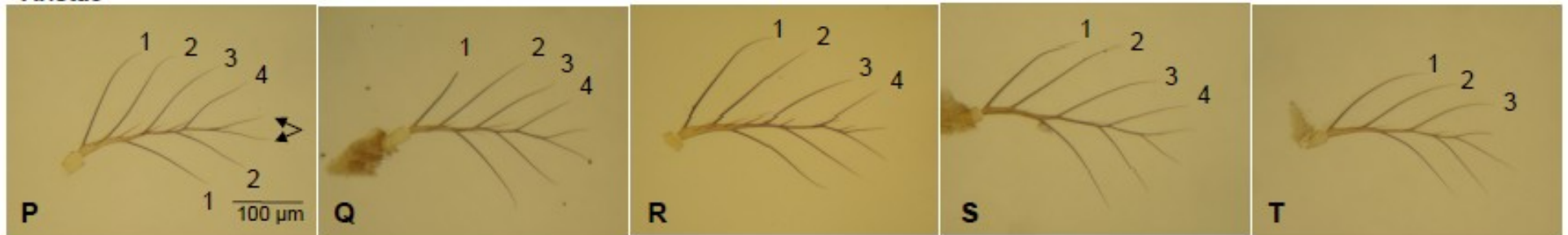


FIGURE 9. Summary of the main diagnostic characters for the discrimination of five cryptic species of the *bromeliae* group of *Drosophila*. A-E. Aedeagus, with aedeagal apodeme and paraphysis, lateral view. F-J. Oviscapt valves, ventral view. K-O. Spermathecae. Arrow in M points the basal introvert, which presents a less pronounced invagination in the inner capsula, when compared to the other species. P-T. Aristae. In P, dorsal and ventral branches are counted, the arrows point the terminal fork; in Q-T, dorsal branches are counted; note the difference in T, with just three branches instead of four. All structures are presented for *D. bromeliae*, *D. bromelioides*, *D. anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. and *D. jurubeba* sp nov., respectively, with ordinary specimens. All images at the same scale.

CAPÍTULO V

Sobre moscas e flores: uma múltipla abordagem evolutiva

Manuscrito em preparação para posterior publicação

Sobre moscas e flores: uma múltipla abordagem evolutiva

Hermes J. Schmitz¹, Mário J. Müller¹, Lizandra J. Robe², Vera L. S. Valente¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria

Introdução

Neste capítulo são apresentados demais resultados decorrentes desta tese não organizados ainda sob a forma de manuscritos prontos para submissão. Estes resultados, no entanto, são uma extensão natural dos resultados apresentados nos capítulos precedentes e, junto com eles, formam um corpo de informações baseado em múltiplas abordagens para o entendimento da evolução dos grupos aqui tratados, o grupo *bromeliae* de *Drosophila* e o subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*, dois táxons bastante representativos da fauna brasileira de drosofilídeos associada a flores (como visto no Cap. II desta tese). Estes resultados também servirão como base para futuros avanços no estudo destes grupos, podendo, posteriormente, ser reorganizados na forma de manuscritos, assim que novos resultados ou análises mais detalhadas sejam incorporados.

No Capítulo II desta tese foi relatada a existência de oito espécies do grupo *bromeliae* nas coletadas realizadas, sendo seis delas provavelmente novas para a ciência. No Capítulo IV, foram apresentados complementos de descrição para as duas espécies anteriormente descritas, bem como descrições completas para três novas espécies. Neste capítulo, serão apresentadas brevemente as três espécies restantes, citadas como tipos III', IV' e VI. Elas foram encontradas apenas posteriormente àquelas tratadas no Capítulo IV, e por isso não chegam a receber aqui uma descrição taxonômica completa; entretanto, os caracteres diagnósticos mais importantes para sua identificação são mostrados. Todas são representantes da diversidade encontrada em localidades relativamente mais setentrionais.

Procurou-se também analisar a morfologia dos ovos no grupo *bromeliae* de *Drosophila*, a fim de se investigar possíveis diferenças morfológicas interespecíficas. A morfologia das estruturas coriônicas do ovo normalmente está estreitamente relacionada a aspectos do substrato de oviposição. Deste modo, é interessante analisar a relação entre a estrutura dos ovos de espécies relacionadas e as amplitudes de nicho diferenciadas, como é o caso deste grupo. Embora apenas parte das espécies tenha sido analisada, isto foi o suficiente para se encontrarem diferenças marcantes, certamente relacionadas a diferentes pressões seletivas experimentadas em cada nicho ecológico.

Na tentativa de se obterem ovos das espécies de ecologia restrita a *Solanum*, que não podem

ser mantidas em linhagens de laboratório, um experimento foi realizado em laboratório e também é apresentado neste capítulo, fornecendo algumas informações importantes sobre a relação entre uma espécie especialista e sua planta hospedeira. O conhecimento de detalhes da história natural de uma espécie é essencial para o entendimento de sua evolução, em especial as exigências requeridas por uma espécie de ecologia extremamente especializada.

A investigação sobre o isolamento reprodutivo entre espécies relacionadas, por outro lado, é essencial para o estudo da especiação, principalmente quando estas espécies são simpátricas, como é o caso do grupo *bromeliae* de *Drosophila*. Resultados sobre experimentos de isolamento reprodutivo de três espécies do grupo também são apresentados neste capítulo. Uma vez determinado o isolamento reprodutivo entre espécies, um passo subsequente é determinar os mecanismos que levam a este isolamento. Os mecanismos de isolamento podem ser caracterizados como pré-zigóticos ou pós-zigóticos, embora os mecanismos pré-zigóticos sejam normalmente apontados como mais importantes, críticos ou efetivos como barreiras ao fluxo gênico (Coyne & Orr, 2004). Um dos mecanismos pré-zigóticos mais importantes para o isolamento reprodutivo entre espécies é o reconhecimento específico. Em *Drosophilidae*, antes da cópula os dois sexos se comportam ritualisticamente, trocando sinais visuais, químicos e acústicos. Comportamentos de corte geneticamente determinados podem ser originados por seleção natural e sexual (Sawamura & Tomaru, 2002). De importância central neste processo é o som de corte produzido pelo macho. O sinal acústico produzido pelos machos, através da vibração das asas, é espécie-específico e atua como um mecanismo essencial para o reconhecimento específico (Greenspan & Ferveur, 2000). Espécies proximamente relacionadas comumente apresentam padrões de som de corte marcadamente diferentes (Spieth & Ringo, 1983). Como uma forma de se investigar os mecanismos de isolamento sexual no grupo *bromeliae* de *Drosophila*, comparações do som de corte de algumas espécies são apresentadas neste capítulo.

A identificação de espécies por marcadores moleculares tem sido uma alternativa importante, em especial no caso de espécies crípticas, onde os marcadores morfológicos clássicos encontram dificuldades. Tais métodos também têm se tornado importantes para contornar a carência de taxonomistas em muitos grupos biológicos, além de levantar questões evolutivas sobre os táxons estudados. Recentes esforços relacionados à técnica de *DNA barcode* têm caracterizado molecularmente um grande número de espécies, baseando-se em seqüências curtas e padronizadas como uma ferramenta de discriminação interespecífica (Hebert *et al.*, 2003; Hebert & Gregory, 2005). Dentro desta perspectiva, a técnica de *barcode* foi testada entre os grupos mais representativos de drosofilídeos antofílicos encontrados no presente estudo, o grupo *bromeliae* e o subgênero *Phloridosa*, comparando-se os agrupamentos genéticos encontrados com a classificação

por características morfológicas.

Por fim, são apresentadas neste capítulo, as primeiras análises filogenéticas com marcadores moleculares para estas espécies, baseadas em seqüências mitocondriais. Estudos anteriores, tanto com marcadores morfológicos (Throckmorton, 1975) como com seqüências moleculares (Pélandakis & Solignac, 1993; Tatarenkov & Ayala, 2001; Remsen & O'Grady, 2002) têm concordado sobre o posicionamento filogenético do grupo *bromeliae* na radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila* e sobre sua afinidade com o grupo *nannopecta*. Entretanto, a única espécie incluída nestes estudos é *D. bromeliae*. Portanto, as relações internas dentro deste grupo são totalmente desconhecidas. A descoberta de várias espécies novas, com graus variados de amplitude de nicho, incluindo aquelas especializadas em *Solanum*, e com distribuições geográficas marcadamente diferentes, torna a compreensão das relações filogenéticas deste grupo especialmente interessante para o entendimento da evolução da especialização e das mudanças de nicho, bem como dos processos de especiação geográfica e ecológica.

O posicionamento filogenético do subgênero *Phloridosa* é bastante confuso. Throckmorton (1975) e Grimaldi (1990), os únicos estudos que abordaram este assunto, ambos com dados morfológicos, encontraram resultados bastante conflitantes. Para Throckmorton (1975), *Phloridosa* se insere na radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila*, mas para Grimaldi (1990) este seria um táxon bastante basal, anterior à divergência dos subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*, e grupo-irmão do subgênero *Spinodrosophila* (atualmente classificado como grupo *nigrosarsa* do subgênero *Drosophila*, segundo Bächli *et al*, 2004). São apresentados neste capítulo, portanto, as primeiras análises com dados moleculares sobre este subgênero, além de uma re-análise de dados morfológicos, de terminália masculina, a fim de se reavaliar as relações filogenéticas deste táxon.

O objetivo deste capítulo consiste em se investigar os táxons mais representativos de drosofilídeos antofílicos encontrados nesta tese dentro de uma abordagem multidisciplinar, incluindo marcadores morfológicos, comportamentais e moleculares para a construção de um cenário completo da evolução das moscas associadas a flores.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

Os indivíduos analisados foram coletados em campo, em seus sítios naturais de criação. Flores potencialmente colonizadas foram coletadas em várias localidades, acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório, onde foram transferidas para vidros contendo vermiculita e fechados com rolha de espuma. Os vidros foram inspecionados quanto à emergência de adultos. Neste caso, estes foram transferidos para tubos contendo meio de cultura para obtenção de

linhagens ou armazenados por via úmida em solução de etanol: água destilada: glicerol: ácido acético (6: 4: 1: 1), ou em etanol absoluto, nos casos em que uma posterior manipulação molecular era pretendida. Uma linhagem de *D. bromeliae*, oriunda da ilha de Grand Cayman, Ilhas Cayman, foi obtida junto ao *Drosophila Species Stock Center*, EUA (número de estoque 15085-1682.00). Esta linhagem é originada a partir de coleta realizada por Wiliam Heed, em 1985.

Várias linhagens foram obtidas e mantidas no Laboratório de *Drosophila* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em meio de cultura de banana-ágar (Anexo 1), sendo mantidas em câmara com temperatura controlada a 18°C e transferidas para tubos com meio de cultura novo semanalmente. Indivíduos adicionais foram obtidos diretamente do campo. Indivíduos de espécies que, por requisitos ecológicos mais exigentes, não puderam ser mantidas em laboratório, foram obtidos exclusivamente do campo.

Análise morfológica

Os espécimes analisados foram identificados de acordo com a morfologia externa e da terminália, em estereomicroscópio, consultando literatura especializada (Val, 1982; Vilela, 1984, 1986, Vilela & Bächli, 1990). Para a análise de terminália, cada pós-abdômen foi separado e preparado com hidróxido de potássio 10 % e corante fucsina ácida, de acordo com Bächli *et al.* (2004), com pequenas modificações, e desarticuladas em glicerol. Medidas foram tomadas em estereomicroscópio com o auxílio de um retículo acoplado à ocular. Para a obtenção de imagens, as estruturas foram montadas em lâminas com bálsamo, visualizadas em microscópio óptico e fotografadas com uma câmara digital através da ocular.

Ultra-estrutura de ovos

Para a coleta de ovos, os adultos foram mantidos por algumas horas em meio de cultura corado com Ponceau (Anexo 2) colocado em vidros de relógio. Os ovos coletados foram fixados em solução de glutaraldeído e tampão fosfato, lavados com solução de tampão fosfato, desidratados com concentrações crescentes de acetona, dessecados em aparelho de ponto crítico e metalizados com ouro (Anexo 3), sendo então visualizados em microscópio eletrônico de varredura no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Testes de Isolamento Reprodutivo

Três espécies foram testadas: *D. bromeliae*, *D. bromelioides* e tipo III. Para *D. bromelioides* e tipo III foram usadas linhagens obtidas no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS. Para *D. bromeliae*, fez-se uso da linhagem com número de

estoque 15085-1682.00 do *Drosophila Species Stock Center*, proveniente da ilha de Grand Cayman, Ilhas Cayman.

Todos os indivíduos usados nos experimentos foram separados de acordo com o sexo ainda virgens, logo após a emergência, e mantidos para maturação por pelo menos três dias em tubos com meio de cultura de banana-ágar. Tais tubos foram inspecionados após serem usados, sendo a ausência de larvas uma garantia da separação adequada de virgens. Para evitar a esterilização ou déficit da viabilidade de qualquer indivíduo, não foi usado nenhum tipo de anestésico em nenhuma etapa do processo.

Os cruzamentos foram feitos como testes sem escolha, onde todos os indivíduos do mesmo sexo eram pertencentes à mesma espécie. Foram realizados testes recíprocos interespecíficos e testes intra-específicos, estes últimos servindo como controle positivo. Foram feitas três réplicas de cada tipo de cruzamento. Dez machos e dez fêmeas foram colocados juntos em tubos de vidro 1/16, fechados com tampas de espuma, com aproximadamente 10 mL de meio de cultura de ágar-banana (Anexo 1). Esses indivíduos foram transferidos para tubos com meio de cultura novo no mínimo uma vez por semana. Todos os tubos foram mantidos e inspecionados por prole por um período de cinco semanas; aqueles cruzamentos nos quais não foi observada prole até este momento foram considerados com resultado negativo.

Som de corte

Para a observação do padrão do som de corte do macho de cada espécie, foram realizados testes de cruzamento intra-específico par a par. Em cada teste, um casal virgem foi introduzido com ajuda de uma bomba à vácuo conectada a um cano de plástico flexível em uma câmara de cruzamento de acrílico, com dimensões de 3x3x1 cm (Sene & Manfrin, 1998). A câmara de cruzamento foi posicionada sobre um microfone de lapela LeSon, com uma frequência de resposta de 40-1600 Hz e coberta por uma caixa de acrílico com espuma para isolamento acústico. O som foi pré-amplificado 70x e gravado com frequência de amostragem de 44100 Hz 16bit, com o uso do programa Audacity. Durante o experimento, o som foi monitorado por fone de ouvido e pelo oscilograma visualizado em computador com o Audacity. O cruzamento também foi acompanhado através de imagens em tempo real visualizadas no computador e obtidas por um câmara digital USB Digital Microscope de 1.3 megapixels (resolução de 640x480), com luz branca e aumento de até 200x.

Barcode e análise filogenética

Foram obtidas seqüências dos genes mitocondriais *COI* (citocromo oxidase sub-unidade I) e

COII (citocromo oxidase sub-unidade II) para sete espécies do grupo *bromeliae* e duas espécies do subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*. O DNA foi extraído de acordo com Anexo 4 (para aproximadamente 10 indivíduos) e Anexo 5 (para um único indivíduo). Todas as seqüências de *COI* foram obtidas a partir de amostras de DNA de um único indivíduo. As seqüências de *COII* foram obtidas a partir de DNA de indivíduos únicos ou de cerca de dez indivíduos da mesma linhagem. Os *primers* utilizados foram TY-J-1460 e C1-N-2329 para *COI* e TL2-J-3037 e TK-N-3785 para *COII* (Simon *et al.*, 1994). As condições usadas na PCR, para cada 50 µL de reação final, foram: 5 µL de tampão de reação, MgCl₂ a 2,5 mM, dNTPs a 0,2 mM, 20 pmol de cada primer, 1U de Taq Polimerase (Invitrogen) e pelo menos 10 ng de DNA. Os parâmetros de amplificação para *COI* foram: desnaturação a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, seguida de anelamento a 55°C por 40 s e extensão a 72°C por 1 min; e um período de extensão final a 72°C por 3 min. Para o *COII*, os parâmetros de amplificação foram: desnaturação a 94°C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, seguida de anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 75 s; e um período de extensão final a 72°C por 5 min. Os amplificados foram purificados com exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão (USB) com incubação a 37°C por 30 min seguida de inativação a 80°C por 15 min. O seqüenciamento foi realizado com o uso dos *primers* específicos, nos dois sentidos, pela MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul), em seqüenciador ABI3730XL ou ABI3700.

Tanto no que diz respeito à análise de *barcode* quanto no que refere às análises filogenéticas, os cromatogramas obtidos foram montados e inspecionados com o uso do pacote Staden 4.11 (Staden, 1996). Em ambos os casos, as seqüências foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW, conforme implementado no Mega 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

A análise de *barcode* foi realizada para sete espécies do grupo *bromeliae* (total de 61 indivíduos) e duas espécies do subgênero *Phloridosa* (total de 20 indivíduos), na medida do possível, a partir de espécimes de diferentes origens geográficas (Anexo 6), utilizando-se a porção inicial do gene *COI* amplificada pelos *primers*. *Drosophila nanoptera* foi usada como grupo-externo do grupo *bromeliae*, *D. cuaso* como grupo-externo de *Phloridosa* e *Scaptodrosophila lebanonensis* como um grupo-externo global. Estas seqüências foram obtidas no *GenBank* (números de acesso DQ471531, EF569993 e EU493686, respectivamente). A análise de *neighbour-joining* e as estimativas de distância foram realizadas no PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) com o uso do modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980).

Para as análises filogenéticas, além das seqüências obtidas no presente estudo (Anexo 7), foram utilizadas seqüências obtidas no *GenBank*, totalizando 75 OTUs para as análises com *COI*, 87 para as análises com *COII* e 75 OTUs para as análises concatenadas (Anexo 8), utilizando

Scaptodrosophila lebanonensis como grupo-externo. A ocorrência de saturação nas matrizes obtidas foi avaliada com o uso do programa DAMBE (Xia & Xie, 2001). Os padrões de substituição nucleotídica foram avaliados sob o teste DIT (*Disparity Index Test*) (Kumar & Gadagkar, 2001).

Neste caso, quatro métodos de reconstrução filogenética foram usados: os métodos de *neighbour-joining* e de máxima parcimônia foram realizados no PAUP 4.0b10; a análise de máxima verossimilhança no PhyML 2.4.4 (Guindon & Gascuel, 2003); e a análise bayesiana no MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Nas análises de *neighbour-joining* e máxima verossimilhança empregou-se o modelo GTR+I+G, conforme indicado pelo teste AIC (*Akaike Information Criteria*) (Akaike, 1974) executado no ModelTest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Na análise de máxima parcimônia utilizou-se uma busca heurística com pesagem homogênea, avaliando 100 réplicas de adição randômica de OTUs seguidas de rearranjos TBR (*Tree Bisection-Reconnection*). Por fim, as análises bayesianas seguiram o modelo GTR+I+G indicado pelo teste AIC executado no MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004), com os parâmetros individualmente atribuídos a cada uma das três posições de cada loco. Neste caso, foram implementadas 10.000.000 de gerações de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), com amostragens a cada 1.000 iterações e com a eliminação de 25% das amostragens iniciais.

Nas análises de *neighbour-joining*, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, a confiança dos cladogramas foi medida pelo teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com 1.000 replicações. Na análise bayesiana a probabilidade posterior dos diferentes cladogramas na árvore consenso de maioria foi avaliada.

Todas as seqüências obtidas nesta tese serão depositadas no *GenBank*.

Resultados e Discussão

As moscas do norte: mais espécies no grupo *bromeliae*

As coletas realizadas em localidades mais ao norte (regiões Norte e Nordeste, principalmente) revelaram que os membros do grupo *bromeliae* ocorrentes nestas localidades constituem-se espécies distintas das encontradas em localidades mais ao sul (regiões Sul e Sudeste, principalmente). Como esta tese teve seu início no sul do Brasil, as espécies presentes nesta região puderam ser estudadas em mais detalhe em comparação com suas parentes do norte. Entretanto, apesar de *D. bromeliae* não ocorrer na Região Sul, esta espécie também pôde ser estudada com mais detalhe devido a disponibilidade da linhagem de Grand Cayman, adquirida junto ao *Drosophila Species Stock Center*, nos Estados Unidos. Além disso, espécimes brasileiros desta espécie foram encontrados posteriormente. Em função disso, as três espécies mostradas a seguir não receberam

ainda um tratamento taxonômico completo. Entretanto, algumas notas a respeito da morfologia destas espécies, incluindo análises dos principais caracteres necessários para a discriminação destas em relação às demais espécies do grupo são aqui mostradas. Todas elas apresentam morfologia externa críptica às demais já descritas (Cap. IV desta tese). As aristas apresentam 4 ramos dorsais, além dos dois ventrais e da bifurcação terminal. A estrutura mais importante para o reconhecimento destas espécies é, mais uma vez, o edeago.

O tipo III'

O edeago (Figura 1A-B) desta espécie assemelha-se ao do tipo III (*D. anaeterrae* sp. nov., Cap. IV), diferenciando-se, entretanto, por apresentar os processos ventrodistais mais pronunciados. As espermatecas (Figura 1C) possuem 80 µm de altura por 60 µm de largura, com a invaginação do duto alcançando entre 1/3 e 1/2 da cápsula. As valvas do ovipositor (Figura 1D) possuem 380 µm de comprimento. Os pupários são castanhos, com 2,97 (2,88-3,06) mm de comprimento e *horn index* 4,55 (4,18-5,22).

Possui claras semelhanças de edeago, espermateca e ovipositor com o tipo III, ao qual provavelmente está proximamente relacionada, diferindo em detalhes da morfologia do edeago.

O tipo IV'

O edeago (Figura 1E) assemelha-se ao do tipo IV (*D. solani* sp. nov., Cap. IV), porém é ainda mais alongado e curvo que aquele. Pupários castanhos, com 2,52 (2,25-2,81) mm de comprimento, *horn index* 4,48 (4,33-4,62).

O tipo VI

Edeago como na Figura 1F-G, com pequenos processos ventrodistais. Espermatecas com 80 µm de altura por 80 µm de largura, com invaginação do duto de cerca de 1/2 da cápsula. Valvas do ovipositor (Figura 1H) com 380 µm de comprimento, com sete espinhos (*peg-like ovisensilla*) discais, 11 marginais e 5 *ovisensilla* tricóides marginais. Pupários castanhos, com 2,39 (2,31-2,50) mm de comprimento, *horn index* 3,85 (3,33-4,11).

Comportamento de oviposição e morfologia de ovos

Foram obtidas imagens em microscopia eletrônica de varredura dos ovos de três espécies: *D. bromeliae*, *D. bromelioides* e tipo III. Tentativas de se obter ovos dos tipos IV e V. pelo método usual não obtiveram sucesso, pois estas espécies recusam-se a ovipositar em meio de cultura. A adição de extrato de flores de *Solanum* no meio de cultura não foi suficiente para alterar este

comportamento.

Entretanto, um experimento realizado na tentativa de se obter ovos pode fornecer algumas informações sobre a história natural destas espécies (Figura 2). Meio de cultura usual (Anexo 1) foi preparado e adicionou-se extrato de flores de *Solanum sisymbriifolium* tanto junto aos demais ingredientes durante sua preparação quanto na sua superfície depois de pronto. Adultos de tipo V, que usam esta espécie como hospedeira na natureza, foram colocados neste meio de cultura, sem sucesso na obtenção de prole de qualquer estágio. *Drosophila bromelioides* e *D. simulans* foram usadas como controle, e foram obtidas prole das duas espécies. Pequenas porções de inflorescência de *S. sisymbriifolium*, contendo flores em vários estágios, foram adicionadas junto a este mesmo meio de cultura em vidros de relógio em um outro experimento (Figura 2A-B). Entretanto, as fêmeas do tipo V não ovipositaram nem no meio de cultura nem nas flores em antese. Uma inspeção mais cuidadosa encontrou alguns ovos na face interna das pétalas de flores ainda em estágio de pré-antese (Figura 2C-D). Foram encontrados um ou dois ovos por flor, totalizando apenas cinco ovos. Algumas poucas larvas foram ainda encontradas nas pétalas de flores em vários estágios (Figura 2E) e, inclusive, uma delas, no meio de cultura. Esta larva, entretanto, não chegou à fase de pupa. Em coletas realizadas na natureza, os pupários também são encontrados junto às flores (Figura 2F).

Por outro lado, *D. simulans* ovipositou abundantemente e de forma indiscriminada em qualquer superfície, seja sobre o meio de cultura ou sobre qualquer parte da inflorescência (Figura 2G). *D. bromelioides* também ovipositou tanto no meio de cultura quanto nas inflorescências, embora em quantidade muito menor e de forma mais enterrada no substrato, com uma preferência pelas pétalas das flores em antese (Figura 2H).

Devido à pequena quantidade de ovos obtida, estes ainda não foram analisados em microscopia eletrônica. No entanto, a visualização por microscopia óptica sugere que os ovos do tipo V ou não apresentam filamentos respiratórios ou possuem estas estruturas de forma muito reduzida.

Diferenças interespecíficas consistentes foram encontradas quanto à morfologia dos ovos das três espécies analisadas em microscopia eletrônica de varredura (Figura 3). *Drosophila bromeliae* e *D. bromelioides* apresentaram um par de filamentos respiratórios (Figura 3A-B e C-D, respectivamente). O tipo III, entretanto, apresentou uma estrutura marcadamente diferente. Ao invés dos filamentos, encontra-se em seu lugar uma estrutura membranosa, em forma de aba, cobrindo a região do opérculo (Figura 3E-G). *Drosophila bromeliae* e *D. bromelioides*, por sua vez, diferenciam-se pela textura do opérculo, que apresenta marcas impressas pelas células foliculares (*follicle imprints*) em *D. bromelioides*, mas não em *D. bromeliae*. Os ovos do tipo III também

apresentam opérculo liso.

Os ovos das três espécies têm em comum o fato de possuírem o corpo principal do córion totalmente liso, não apresentando marcas foliculares e estando ausente também a crista dorsal. O opérculo ocupa somente o espaço entre a micrópila e os filamentos respiratórios (ou a estrutura correspondente no tipo III). Tanto os filamentos respiratórios quanto a estrutura membranosa do tipo III apresentam porosidades.

O tamanho e o número de filamentos respiratórios nos ovos de drosofilídeos variam bastante entre as diferentes espécies. Podem estar ausentes ou em número superior a 10, apresentar tamanho reduzido ou ser várias vezes mais longos que os próprios ovos (Sturtevant, 1921; Throckmorton, 1962; Kambysellis, 1993). Em comparação com a maior parte das espécies conhecidas, o tamanho dos filamentos respiratórios das espécies aqui analisadas é reduzido. A redução no tamanho dos filamentos respiratórios parece ser uma convergência evolutiva de espécies que utilizam flores como recurso de oviposição. Ovos com filamentos reduzidos ou ausentes também foram observados em *D. nigrasplendens*, *D. xiphiphora* (Pipkin, 1964), nos grupos *flavopilosa* (Brncic, 1978) e *onychophora* (Hunter, 1979, 1988, 1992) de *Drosophila*, no subgênero *Phloridosa* de *Drosophila* (Patterson, 1943; Brncic, 1962) e no subgênero *Exalloscaptopmyza* de *Scaptomyza* (Kambysellis, 1993), todas ecologicamente adaptadas à oviposição em flores. A evolução dos filamentos respiratórios reflete a natureza do substrato de oviposição, de forma a ancorar o ovo próximo à superfície (Kambysellis, 1993). Portanto, a oviposição em superfícies como a de frutos carnosos, por exemplo, requer filamentos mais longos, de modo que o ovo não afunde demasiadamente no fruto e não sofra com o comprometimento das trocas gasosas. Em muitos casos, os filamentos são as únicas estruturas dos ovos a permanecerem disponíveis para trocas gasosas. Por outro lado, a oviposição em superfícies como pétalas pode desprezar o uso de filamentos mais desenvolvidos, já que praticamente não há para onde afundar e praticamente todo o ovo pode servir como superfície para trocas gasosas. Além disso, as flores provavelmente representam um local relativamente protegido para a oviposição, diminuindo-se o risco de o ovo se perder por não estar bem afixado. Flores utilizadas como substrato de oviposição por espécies de drosofilídeos em geral apresentam formato de tubo, o que deve fornecer uma maior proteção aos ovos. A oviposição dentro do botão floral, como é o caso do tipo V, pode representar um caso extremo deste comportamento de oviposição em um local bastante protegido e sem o risco de se afundar no substrato, evitando, portanto, a necessidade de investimento em estruturas de fixação como os filamentos.

A importância ecológica da estrutura membranosa encontrada no lugar dos filamentos nos ovos do tipo III permanece, entretanto, obscura, bem como sua origem ontogenética. Seria ela resultado da modificação e fusão dos filamentos ou uma estrutura completamente nova? Estruturas

como essa são incomuns em drosofilídeos, o único outro caso conhecido sendo o de *D. leoni*, uma espécie *incertae sedis* descrita por Pipkin (1964), encontrada em flores de *Dimerocostus uniflorus* (Zingiberaceae), no Panamá (as características contidas na descrição desta espécie, incluindo a terminália masculina, são semelhantes às encontradas no grupo *bromeliae* de *Drosophila*; uma revisão taxonômica desta espécie é requerida para se verificar sua relação ou não com este grupo). Em comparação com *D. bromeliae* e *D. bromelioides*, que apresentam filamentos, o tipo III é menos generalista em relação aos sítios de oviposição, o que sugere que esta estrutura seja uma adaptação a uma performance mais especializada.

A superfície dos filamentos também pode variar, de sólida a porosa, até com aberturas e outras modificações estruturais. Segundo Kambysellis (1993), esta característica pode estar associada à umidade dos ambientes que as espécies ocupam, sendo que aquelas com filamentos porosos tendem a ocupar ambientes mais secos, enquanto as com filamentos sólidos são encontradas em ambientes úmidos como florestas. No presente trabalho, as espécies do grupo *bromeliae* de *Drosophila* foram encontradas mais comumente em ambientes relativamente abertos, como formações pioneiras, o que pode explicar a porosidade encontrada nos estruturas aqui visualizadas.

A presença de marcações foliculares na superfície do corpo principal do córion e do opérculo, bem como a área ocupada pelo opérculo, segundo Kambysellis (1993), estão provavelmente relacionadas a um aumento da superfície para trocas gasosas. Mais uma vez, a falta de marcações foliculares e a relativamente pequena área ocupada pelo opérculo nas espécies aqui analisadas parecem ser reflexo de seu substrato de oviposição. Como em flores os ovos correm pouco risco de ficarem envoltos pelo substrato, o que ocorre em frutos, dificultando as trocas gasosas, não há necessidade de estruturas para o aumento da superfície e a seleção natural certamente operou sobre este caráter. A única exceção, é a presença de marcações foliculares no opérculo de *D. bromelioides*, o que pode estar relacionado ao desempenho mais generalista desta espécie. Do mesmo modo, a crista dorsal encontra-se ausente. A presença desta estrutura, como sugerido por Kambysellis (1993), parece estar relacionada a um aumento da superfície respiratória em microambientes extremamente úmidos, garantindo a sobrevivência do embrião mesmo submerso em água. Este não parece ser o caso para o grupo *bromeliae*.

A morfologia das estruturas coriônicas dos ovos no grupo *bromeliae* de *Drosophila*, portanto, parece refletir as pressões seletivas enfrentadas pelos indivíduos em seu substrato natural, de acordo com as *performances* mais generalistas ou especializadas de cada espécie. A análise da ultra-estrutura dos ovos das demais espécies do grupo, em especial daquelas de ecologia restrita a *Solanum*, deve vir a contribuir para o entendimento destas relações ecológicas.

Isolamento reprodutivo

Os resultados dos experimentos de isolamento reprodutivo são sumarizados na Tabela 1. Não houve prole em nenhum dos cruzamentos interespecíficos. Houve emergência de prole, entretanto, em todos os cruzamentos intra-específicos realizados como controle positivo. Estes resultados foram consistentes para as três réplicas feitas em cada tipo de cruzamento. Os resultados indicam claramente que as três espécies testadas não produzem híbridos e apresentam isolamento reprodutivo completo entre si.

Tabela 1: Resultados dos experimentos de cruzamentos recíprocos entre as três espécies testadas.

machos/fêmeas	<i>D. bromeliae</i>	<i>D. bromelioides</i>	tipo III
<i>D. bromeliae</i>	x	-	-
<i>D. bromelioides</i>	-	x	-
tipo III	-	-	x

Nota: "x" indica a presença de prole, enquanto "-" indica ausência da mesma.

Som de corte

Embora um estudo mais minucioso sobre o comportamento de corte não tenha sido realizado, é possível afirmar que, nas três espécies analisadas, os principais comportamentos efetuados pelo macho que puderam ser observados foram o som de corte produzido pelas asas e o ato de lambar a genitália da fêmea com a probóscide. O som de corte é produzido por um movimento das asas em tesoura, com estas posicionadas horizontalmente ao longo do corpo (*wing scissoring*). Esta parece ser a única forma pela qual o macho produz o som de corte, não tendo sido observado o movimento no qual uma asa é estendida para cima enquanto vibra, um movimento comum em várias espécies de drosofilídeos (Spieth & Ringo, 1983; Greenspan & Ferveur, 2000). O ato de lambar a genitália da fêmea com a probóscide também foi bastante comum nas espécies observadas, sendo repetido várias vezes, podendo ter uma duração prolongada, e não necessariamente precedendo uma tentativa de cópula.

Em *D. bromeliae*, a latência de cópula (intervalo de tempo entre o momento em que o casal é colocado junto e a cópula) foi em torno de cinco minutos, embora pelo menos uma latência superior a 30 minutos tenha sido observada. Em *D. bromelioides*, a única cópula observada (em 10 casais) teve latência de aproximadamente 17 minutos. Entretanto, comportamento de corte foi observado em outras ocasiões, sem a ocorrência de cópula até os 30 minutos de observação, e em pelo menos um caso, até uma hora, período o qual o macho se manteve freqüentemente produzindo

o som de corte e lambendo a genitália da fêmea. Longos comportamentos de corte sem cópula (até 30 minutos) também foram observados no tipo III, embora a latência das cópulas observadas tenha sido inferior a 10 minutos. As cópulas observadas em todas as espécies tiveram duração de 1-2 minutos ou menos. Em pelo menos um caso, em *D. bromeliae*, o comportamento de corte continuou após a cópula, ocorrendo nova cópula em seguida.

Quanto ao som de corte, foram observados os dois elementos básicos: o som em pulsos e o *sine song*. O som em pulsos é caracterizado pela repetição de pulsos separados no tempo, que podem estar agrupados em seqüências (os *bursts*) e variar no número de ciclos por pulso, no número de pulsos por *burst* e no intervalo inter pulso (IPI). O *sine song*, por sua vez, é um som contínuo em um dado intervalo de tempo, como um zumbido (Spieth & Ringo, 1983; Greenspan & Ferveur, 2000). O *sine song*, entretanto, foi observado apenas em *D. bromelioides* e diferenças marcantes foram encontradas nos padrões de som de corte entre as espécies.

Drosophila bromeliae apresentou som de corte constituído por pulsos monocíclicos em *bursts*, bem como pulsos isolados. O intervalo entre os pulsos e o número de pulsos por *burst* se mostrou bastante irregular nesta espécie (Figura 4). No tipo III, foram observados *bursts* regulares, com cerca de 10 a 20 pulsos monocíclicos (Figura 5). *Drosophila bromelioides*, por outro lado, apresentou um som de corte de alta complexidade, sendo observados tanto *bursts* de pulsos monocíclicos como o *sine song*, em diversas combinações (Figura 6): (1) *bursts* curtos, quase sempre com quatro pulsos (raramente cinco), comumente repetidos a intervalos regulares por longos períodos de tempo; (2) *bursts* longos, com 10 a 20 pulsos, normalmente ocorrendo isolados, não sendo repetidos regularmente como os *bursts* curtos; (3) *sine song*, ocorrendo de forma isolada; (4) *sine song* imediatamente seguido de *bursts* longos. Os pulsos desta espécie também são monocíclicos, embora aqueles que se seguem ao *sine song* aparentemente sejam ligeiramente mais complexos.

Nossos resultados sugerem, portanto, que as três espécies apresentam padrões diferenciados de som de corte. O som de corte do macho é um caráter importante no reconhecimento espécie-específico de potenciais parceiros reprodutivos e pode ser um fator essencial para a manutenção do isolamento reprodutivo. Isto pode ser especialmente importante para espécies estreitamente relacionadas e que apresentam microsimpatria em relação aos sítios de oviposição, como é o caso, pelo menos, de *D. bromelioides* e tipo III.

Barcode

A árvore de *neighbour-joining* para a análise de *barcode* pode ser visualizada na Figura 7.

Para o grupo *bromeliae*, a análise classificou corretamente 60 dos 61 indivíduos amostrados,

mostrando uma concordância quase total (~98%) entre os morfotipos e os agrupamentos genéticos (Figura 7). Esta resolução é comparável a outros estudos de *barcode* (Hebert *et al.*, 2003; Footit *et al.*, 2008; Meiklejohn *et al.*, 2009). O único indivíduo erroneamente classificado foi um espécime do tipo IV', que ficou posicionado dentro do grupo de espécimes do tipo IV (tipo IV' 12, na Figura 7). Sequências mitocondriais compartilhadas por diferentes espécies podem ser resultado de eventos de introgressão e de polimorfismo ancestral (Hebert & Gregory, 2005). A semelhança morfológica e ecológica dos tipos IV e IV' pode ser sugestiva de uma relação evolutiva mais estreita entre eles. O indivíduo erroneamente classificado pelo *barcode* foi originado do estado do Paraná, na porção meridional de sua distribuição. O limite sul desta espécie parece ser o estado de Santa Catarina. A ocorrência do tipo IV no Paraná é duvidosa, mas as duas espécies parecem ocorrer em simpatria pelo menos no estado de Santa Catarina (Cap. I desta tese).

De acordo com Hebert *et al.* (2003), para uma resolução por *barcode* ser considerada bem sucedida, as distâncias genéticas médias intra-específicas devem ser inferiores a 3%, enquanto as diferenças interespecíficas devem ser maiores que 3%. Segundo esses requisitos, a presente análise apresentou grande capacidade de discriminação das espécies, já que as distâncias genéticas médias intra e interespecíficas se mantiveram dentro dos limites sugeridos, o que pode ser observado nas Tabelas 2-4. A satisfatória taxa de resolução também pode ser observada pelo valor elevado de TRR (*taxonomic resolution ratio*). Como visto na Tabela 4, o valor de TRR para o grupo *bromeliae* indica que a diferença interespecífica das espécies analisadas é, em média, 14,29 vezes maior que a diferença intra-específica. A distribuição das distâncias genéticas intra e interespecíficas ficaram quase totalmente disjuntas (Figura 8).

Assim como no grupo *bromeliae*, a discriminação entre as espécies *D. denieri* e *D. lutzii* por *barcode* também foi bem sucedida. Neste caso, a correspondência entre a classificação morfológica e a genética foi absoluta. As distâncias genéticas médias também permaneceram, em geral, dentro dos valores exigidos, observando-se, novamente, um alto valor de TRR (Tabelas 3 e 4). Adicionalmente, a distribuição das distâncias genéticas intra e interespecíficas se mostraram totalmente disjuntas (Figura 9).

Desta forma, a análise por *barcode* se mostrou bastante efetiva para a discriminação entre espécies do grupo *bromeliae* bem como do subgênero *Phloridosa*, como evidenciado pela existência de um *gap* taxonômico entre as distâncias intra e interespecíficas para os dois táxons (Figuras 8 e 9). A distribuição das distâncias genéticas entre indivíduos de espécies diferentes do mesmo grupo (grupo *bromeliae* ou subgênero *Phloridosa*) apresentaram apenas uma pequena superposição com a distribuição das distâncias genéticas das comparações entre indivíduos de grupos diferentes (Figura 10).

Tabela 2. Distâncias genéticas intra-específicas obtidas segundo o modelo de Kimura 2-Parâmetros com seqüências de *COI* para cada espécie do grupo *bromeliae*.

	Número de seqüências	Distância média (\pm desvio padrão)	Distância mínima	Distância máxima
<i>D. bromeliae</i>	4	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00
<i>D. bromelioides</i>	12	0,01 \pm 0,00	0,00	0,08
Tipo III	11	0,01 \pm 0,00	0,00	0,02
Tipo III'	4	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00
Tipo IV	7	0,01 \pm 0,00	0,00	0,01
Tipo IV'	12	0,02 \pm 0,00	0,00	0,10
Tipo V	11	0,00 \pm 0,00	0,00	0,01

Tabela 3. Distâncias genéticas intra-específicas obtidas segundo o modelo de Kimura 2-Parâmetros com seqüências de *COI* para as duas espécies do subgênero *Phloridosa* registradas no Brasil.

	Número de seqüências	Distância média (\pm desvio padrão)	Distância mínima	Distância máxima
<i>D. denieri</i>	11	0,01 \pm 0,00	0,00	0,06
<i>D. lutzii</i>	9	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00

Tabela 4. Sumário das distâncias genéticas intra e interespecíficas obtidas segundo o modelo de Kimura 2-Parâmetros com seqüências de *COI* para o grupo *bromeliae* e o subgênero *Phloridosa*, com taxas de resolução taxonômica (TRR).

Táxon	Distância média	Distância mínima	Distância média (\pm desvio padrão)	Distância máxima	TRR
Grupo <i>bromeliae</i>	intra-específica	0,00	0,007 \pm 0,00	0,10	
	interespecífica	0,00	0,10 \pm 0,01	0,12	14,29
Subgênero <i>Phloridosa</i>	intra-específica	0,00	0,005 \pm 0,00	0,06	
	interespecífica	0,08	0,09 \pm 0,01	0,10	18,00
Grupo <i>bromeliae</i> vs. subgênero <i>Phloridosa</i>		0,10	0,13 \pm 0,01	0,15	

Concluindo, a análise de *barcode* aqui apresentada foi bem sucedida na discriminação entre as espécies analisadas, obtendo correlação quase total entre os agrupamentos genéticos e a classificação por morfotipos. Esta técnica, portanto, pode representar uma ferramenta efetiva na correta identificação destas espécies, útil em especial no caso de espécies crípticas, onde o uso de

características morfológicas encontra dificuldades, principalmente na discriminação de fêmeas, já que o principal caráter diagnóstico nestes casos é a terminália masculina. Além disso, a implementação futura desta tecnologia deve auxiliar na descoberta e identificação de novos níveis de diversidade críptica.

Análise filogenética

A análise filogenética baseada em cada um dos genes mitocondriais, assim como a análise concatenada de evidências totais, apresentou alguns resultados incongruentes entre si, embora os diferentes métodos de reconstrução filogenética tenham recuperado, em geral, topologias similares dentro de cada conjunto de dados. Estas incongruências, bem como os baixos níveis de resolução basal, podem ser atribuídos às fortes evidências de saturação transicional nos dados (Figura 11), o que deve estar relacionado a altos níveis de homoplasia e substituições múltiplas. Além disso, através do teste DIT foi possível evidenciar a ocorrência de padrões de substituição contrastantes para alguns grupos, o que pode ocasionar artefatos metodológicos no posicionamento das OTUs envolvidas.

O alto nível de saturação e a ocorrência de viés nos padrões de substituição nucleotídica estão associados a uma redução no sinal filogenético das seqüências analisadas. Entretanto, algumas observações foram consistentes, independentemente das seqüências analisadas e do método de reconstrução filogenética, permitindo assim, as primeiras conclusões e hipóteses sobre a história filogenética dos táxons analisados.

O grupo bromeliae

Um sumário dos resultados encontrados sobre as relações filogenéticas dentro do grupo *bromeliae* é apresentado na Figura 12.

As análises envolvendo as seqüências de *COI* foram concordantes em todos os métodos de reconstrução filogenética ao recuperar um clado onde *D. bromeliae* e *D. bromelioides* aparecem sucessivamente como a primeira e a segunda ramificação basal com relação às espécies irmãs tipos III e III'. Tanto a formação deste clado quanto sua topologia interna apresentou suporte significativo em todos os métodos utilizados. As espécies incluídas neste clado correspondem exatamente às espécies de ecologia generalista, em contraposição àquelas de ecologia restrita a *Solanum*. Além disso, as ramificações basais deste clado correspondem às espécies de nicho mais amplo (*D. bromeliae* e *D. bromelioides*), com as espécies de amplitude de nicho intermediária na posição terminal (tipo III e III'). Por outro lado, as espécies de nicho restrito a *Solanum* (os tipos IV, IV' e V) apresentaram um posicionamento mais basal em relação a este "clado generalista" em todos os

métodos de reconstrução. O posicionamento das espécies especialistas, entretanto, não pôde ser resolvido, apresentando valores de suporte baixos ou topologias incongruentes entre os diferentes métodos. Estas análises falharam ainda em recuperar o grupo *nannoptera* como grupo-irmão do grupo *bromeliae*, que juntamente com a seqüência do tipo IV' compôs uma politomia basal com relação a outros táxons presentes na análise (omitidos na Figura 12).

As análises com as seqüências de *COII* também recuperaram o "clado generalista" com bons suportes, exceto pelo método de máxima parcimônia, que apresentou o grupo *bromeliae* inteiramente politômico. As relações internas deste clado foram diferentes daquelas encontradas pelas análises com *COI*. No entanto, neste caso, a topologia encontrada não mostrou consistência entre os diferentes métodos nem bons valores de suporte. A única consistência foi o pareamento das duas seqüências de *D. bromeliae*, a obtida neste trabalho e a disponível no *GenBank*. Embora a ordem de ramificação das espécies especialistas não foi consistentemente recuperada, estas apresentaram-se, mais uma vez, como basais em relação ao "clado generalista". Por outro lado, as análises com *COII* obtiveram sucesso em recuperar *nannoptera* como grupo-irmão de *bromeliae*. Além disso, *COII* recuperou consistentemente um grupo *bromeliae* monofilético com altos valores de suporte, em todos os métodos.

A análise de evidências totais mais uma vez encontrou, em todos os métodos e com bons valores de suporte, o "clado generalista" terminal. Como também aconteceu nas análises de *COI*, os tipos III e III' foram posicionados como espécies-irmãs, enquanto *D. bromeliae* e *D. bromelioides* destacaram-se como basais em relação ao clado assim constituído, em três dos quatro métodos. Neste caso, a exceção foi representada pelo método de *neighbour-joining*, que incluiu os tipos III, III' e *D. bromelioides* em uma politomia. A ordem de ramificação das linhagens envolvendo *D. bromeliae* e *D. bromelioides* não se mostrou consistente ou com bom suporte. Novamente, as três espécies de ecologia especializada permaneceram como ramificações basais ao "clado generalista", mas com a topologia não resolvida. Estas análises também encontraram um grupo *bromeliae* monofilético, com altos valores de suporte em todos os métodos, assim como obtiveram sucesso em recuperar *nannoptera* como o grupo irmão deste táxon.

Sumarizando, as análises filogenéticas baseadas em seqüências dos genes mitocondriais *COI* e *COII* com o grupo *bromeliae* de *Drosophila* sugerem as seguintes conclusões, em ordem de consistência:

- A existência de um "clado generalista" terminal, composto por *D. bromeliae*, *D. bromelioides*, tipo III e tipo III', o que foi bem suportado por todos os métodos e conjuntos de dados.
- O posicionamento das espécies de ecologia restrita a *Solanum* como ramificações basais ao

"clado generalista", tal como encontrado em todas as análises (embora a topologia exata destas relações não tenha sido adequadamente bem resolvida).

- A monofilia do grupo *bromeliae* de *Drosophila*, da forma como representado nesta tese, fortemente suportado pelas análises com *COII* e com as evidências totais. As análises com *COI*, que em geral não recuperaram a monofilia do grupo, deixaram as espécies mais basais em politomia. Em em nenhum caso, entretanto, o grupo ficou claramente para ou polifilético.

- O posicionamento dos tipos III e III' como espécies-irmãs na extremidade terminal. As únicas análises que apresentaram topologias alternativas (com *COII*) não apresentaram bons suportes nem consistência entre os métodos.

- As espécies de nicho mais amplo no "clado generalista" como ramificações basais ao par terminal menos polífago (tipos III e III'), sendo *D. bromeliae* a ramificação mais antiga e *D. bromelioides* a mais recente, como fortemente sugerido pelas análises com *COI*. Os demais conjuntos de dados mostraram resultados incongruentes, inconsistentes entre os métodos e/ou fracamente suportados no que se refere ao posicionamento de *D. bromeliae* e *D. bromelioides*.

O subgênero *Phloridosa*

A saturação de seqüências causa a perda do sinal filogenético, em especial de relações mais antigas, o que claramente foi sentido no conjunto de dados utilizado nesta tese. Isto impossibilitou a obtenção de árvores filogenéticas com alto suporte para a elucidação do posicionamento filogenético do subgênero *Phloridosa*. Em geral, as espécies deste subgênero aqui analisadas, *D. denieri* e *D. lutzii*, permaneceram com o posicionamento filogenético não resolvido, em politomias ou em pareamentos com baixo suporte. Os padrões gerais dos resultados destas análises moleculares, entretanto, embora não permitam uma observação conclusiva, fornecem pistas sobre as incertas relações filogenéticas deste táxon, em especial por encontrarem respaldo na morfologia.

Considerando todas as análises, independente do método e do conjunto de dados utilizado, as espécies do subgênero *Phloridosa* mostraram uma tendência a se agruparem com espécies da radiação *tripunctata*. Nas análises bayesianas, estas espécies constituíram um grupo monofilético [*COI* (PP = 0,77) e supermatriz (PP = 0,81)] que se apresentou agrupado com *D. sticta* [*COI* (PP = 0,67) e supermatriz (PP = 0,62)] ou *D. bandeirantum* [*COII* (PP = 0,69)], duas espécies pertencentes à radiação *tripunctata*. Com os demais métodos, estas espécies são apresentadas, em geral, em uma politomia basal.

Evidentemente, os baixos valores de suporte exigem que os dados sejam tomados com cautela. Entretanto, o fato de que, mesmo com suportes baixos, estas espécies sejam repetidamente agrupadas com espécies da radiação *immigrans-tripunctata* do subgênero *Drosophila*, em especial

com a radiação *tripunctata*, é um resultado notável. Isto é exemplificado na Figura 13, que destaca que o clado no qual estão inseridas *D. denieri* e *D. lutzii* é composto quase que exclusivamente por espécies da radiação *immigrans-tripunctata*, em especial da radiação *tripunctata*.

Estes resultados, baseados nos primeiros dados moleculares sobre este subgênero, aqui obtidos, são contrários às duas hipóteses anteriores, baseadas em dados morfológicos. Throckmorton (1975) sugeriu que o subgênero *Phloridosa* estaria posicionado dentro da radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila*, enquanto na análise cladística de Grimaldi (1990) este táxon apresentou um posicionamento basal à divergência *Drosophila/Sophophora*, juntamente com *D. nigrosparsa*. Uma análise da morfologia da terminália masculina entre representantes do subgênero *Phloridosa*, da radiação *tripunctata*, da radiação *virilis-repleta* e do grupo *nigrosparsa* suportam, entretanto, a relação entre *Phloridosa* e a radiação *tripunctata*, como visualizado nas Figuras 14-15 e discutido a seguir.

Terminália externa (Figura 14) - Na radiação *virilis-repleta*, os cercos são fusionados com o epândrio, o que não ocorre no subgênero *Phloridosa*, assim como na radiação *tripunctata* e no grupo *nigrosparsa*. Além disso, na radiação *virilis-repleta* é comum a existência de numerosas e longas cerdas na porção inferior do epândrio. A quetotaxia desta região em *Phloridosa*, todavia, novamente é semelhante à dos membros da radiação *tripunctata*, com um número bem menor de cerdas, em geral posicionadas apenas na margem inferior desta região. No grupo *nigrosparsa*, esta região também apresenta numerosas cerdas longas. Adicionalmente, este grupo apresenta um desenvolvimento da porção inferior do epândrio, formando um lobo ventral relativamente pronunciado, o que não ocorre em *Phloridosa*.

Hipândrio (Figura 15) - Duas características desta estrutura aproximam *Phloridosa* da radiação *tripunctata*. Uma delas é a existência de um arco dorsal bem desenvolvido, fusionado na porção mediana e formando aí um processo dorsal. O grupo *nigrosparsa* também apresenta um arco dorsal, mas diferentemente, este não é completamente fusionado na porção mediana, não formando o processo dorsal. O arco dorsal está ausente na radiação *virilis-repleta*. Outra característica que une *Phloridosa* e a radiação *tripunctata* é a fusão das paráfises com os gonópodes, o que também é observado no grupo *nigrosparsa*, mas não na radiação *virilis-repleta*.

Edeago (Figura 16) - Como visto, em *Phloridosa*, na radiação *tripunctata* e no grupo *nigrosparsa* as paráfises estão fusionadas aos gonópodos no hipândrio. Como isto não ocorre na radiação *virilis-repleta*, as paráfises continuam ligadas ao edeago nestas espécies.

Embora tenha usado uma grande quantidade de dados morfológicos, além de ecológicos e biogeográficos, Throckmorton (1975) parece não ter dado tanta atenção à morfologia da terminália masculina em comparação às características morfológicas internas. É preciso lembrar que a

terminália masculina de grande parte das espécies ainda não estava descrita naquela época, embora ela seja hoje o principal caráter taxonômico de Drosophilidae nos dias atuais. Na análise de Grimaldi (1990), *Phloridosa* se manteve basal à divisão *Drosophila/Sophophora* por características como detalhes de vibrissas, cerdas esternopleurais e da lacínia (aparelho bucal), e como grupo-irmão de *D. nigrosparsa* por detalhes do pré-tarso e pelo arco dorsal, considerado como convergente ao arco dorsal da radiação *tripunctata*. *Phloridosa* apresentou ainda uma série de apomorfias, em geral não observadas no subgênero *Drosophila*, como redução de cerdas e modificações do pré-tarso e do aparelho bucal, algumas delas compartilhadas com outras espécies antofílicas. É interessante notar que outro grupo antofílico, o grupo *flavopilosa*, também ficou posicionado de forma bem basal na análise de Grimaldi (1990), muito diferentemente de Throckmorton (1975) e estudos moleculares (Robe *et al.*, 2005, 2010), que concordam sobre o posicionamento deste grupo na radiação *virilis-repleta* (o grupo *bromeliae* não foi analisado por Grimaldi, 1990). É possível que a grande quantidade de apomorfias relacionadas à exploração de flores tenha causado um ruído na análise deste autor.

Outra observação que torna improvável a relação entre *Phloridosa* e grupo *nigrosparsa* pode ser feita com base na biogeografia. Enquanto *Phloridosa* é um táxon exclusivamente neotropical, o grupo *nigrosparsa* tem distribuição paleártica, ocorrendo na Europa, Rússia, Ásia Central e Japão, com algumas espécies apresentando preferências por latitudes bastante elevadas, estando ausente no continente americano. O posicionamento filogenético do grupo *nigrosparsa* não foi um dos objetivos desta tese, mas também carece de uma reavaliação em relação ao estudo de Grimaldi (1990), faltando ainda qualquer dado molecular. Na época, *D. nigrosparsa* ainda estava classificada em um subgênero monotípico, *Spinodrosophila*, o que não é mais válido, já que Bächli *et al.* (2004) reuniram as quatro espécies atualmente incluídas no grupo (anteriormente em *Spinodrosophila* ou no grupo *robusta*) dentro do subgênero *Drosophila*.

Em resumo, o posicionamento filogenético de *Phloridosa* permanece não resolvido, devido ao baixo suporte obtido pelas análises aqui apresentadas, resultado provavelmente derivado da saturação do conjunto de dados. Entretanto, a comparação entre estes dados moleculares preliminares e a morfologia da terminália masculina sugere, ainda que com cautela, uma possível afinidade filogenética entre *Phloridosa* e membros da radiação *immigrans-tripunctata*, mais especificamente com a radiação *tripunctata*, contrariando as hipóteses anteriores de Throckmorton (1975) e Grimaldi (1990) (Figura 17).

Os múltiplos marcadores utilizados nas análises aqui apresentadas têm mostrado resultados congruentes e complementares sobre a evolução dos grupos estudados. O aperfeiçoamento destas

análises, completando algumas lacunas ainda existentes nos fornecerão uma melhor compreensão da evolução dos principais táxons de drosofilídeos antofílicos da Região Neotropical.

Referências

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr* 19:716-723.
- Bächli G, Vilela CR, Escher SA, Saura A (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 39:1-362.
- Brcic D (1962) New Chilean species of the genus *Drosophila*. *Biologica (Santiago)* 33:3-6.
- Brcic D (1978) A note on the *flavopilosa* group of species of *Drosophila* in Rio Grande do Sul, Brazil, with description of two new species (Diptera, Drosophilidae). *Rev Bras Biol* 38:647-651.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer, Sunderland, 545 pp.
- Coyne JA, Kim SY, Chang AS, Lachaise D, Elwyn S, Susannah JF (2002) Sexual isolation between two sibling species with overlapping ranges: *Drosophila santomea* and *Drosophila yakuba*. *Evolution*, 56:2424-2434.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Footit RG, Maw HEL, Von Dohlen CD, Hebert PDN (2008) Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Mol Ecol Resour* 8:1189-1201.
- Greenspan RJ, Ferveur J-F (2000) Courtship in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 34:205-232.
- Grimaldi DA (1990) A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bull Am Mus Nat Hist* 197:103-268.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696-704.
- Hatadani LM, McInermey JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB (2009) Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* 51: 595-600.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313-321.
- Hebert PDN, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol* 54:852-859.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Hunter AS (1979) New anthophilic *Drosophila* of Colombia. *Ann Entomol Soc Am* 72:372-383.

- Hunter AS (1988) High altitude flower-breeding *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). Pan-Pac Entomol 64:299-312.
- Hunter AS (1992) Flower-breeding *Drosophila* of Bogota, Colombia: new species (Diptera: Drosophilidae). Pan-Pac Entomol 68: 192-199.
- Kambysellis MP (1993) Ultrastructural diversity in the egg chorion of Hawaiian *Drosophila* and *Scaptomyza*: ecological and phylogenetic considerations. Int J Insect Morph Embryol 22:417-446.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111-120.
- Kumar S, Gadagkar SR (2001) Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. Genetics 158:1321-1327.
- Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M (2009) DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). Int J Legal Med DOI 10.1007/s00414-009-0395-y
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Patterson JT (1943) The Drosophilidae of the Southwest. Univ Texas Publs 4313:7-216.
- Pélandakis M, Solignac M (1993) Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. J Mol Evol 37:525-543.
- Pipkin SB (1964) New flower breeding species of *Drosophila*. Proc Entomol Soc Wash 66:217-245.
- Posada C, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14:817-818.
- Remsen J, O'Grady P (2002) Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. Mol Phylogenet Evol 24:249-264.
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M, Loreto ELS (2005) Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. Mol Phylogenet Evol 36:623-640.
- Robe LJ, Loreto ELS, Valente VLS (2010) Radiation of the "*Drosophila*" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. J Zool Syst Evol Res doi: 10.1111/j.1439-0469.2009.00563.x
- Sawamura K, Tomaru M (2002) Biology of reproductive isolation in *Drosophila*: toward a better understanding of speciation. Popul Ecol 44:209-219.
- Sene FM, Manfrin MH (1998) A chamber to record the courtship sound in *Drosophila*. Drosoph Inf Serv 81:203-204.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylonetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am 87:651-701.
- Spieth HT, Ringo JM (1983) Mating behavior and sexual isolation in *Drosophila*. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN (eds) The genetics and biology of *Drosophila*, 3c. Academic

Press, London, pp 223-284.

- Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5:233-241.
- Sturtevant AH (1921) The North American species of *Drosophila*. *Carn Inst Wash Publ* 301:1-150.
- Swofford DL (2003) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Tatarenkov A, Ayala FJ (2001) Phylogenetic relationships among species groups of the *virilis-repleta* radiation of *Drosophila*. *Mol Phylogenet Evol* 21:327-31.
- Throckmorton LH (1962) The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. *Univ Texas Publ Stud Genet* 2:207-343.
- Throckmorton LH (1975) The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. *Handb Genet* 3:421-469.
- Val FC (1982) The male genitalia of some Neotropical *Drosophila*: Notes and illustrations. *Pap Avul Zool* 34:309-347.
- Vilela CR (1984) Notes on the holotypes of four Neotropical species of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) described by A.H.Sturtevant. *Rev Bras Entomol* 28:245-256.
- Vilela CR (1986) The type-series of *Drosophila denieri* Blanchard (Diptera, Drosophilidae). *Rev Bras Entomol* 30:223-226.
- Vilela CR (1992) On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev Bras Entomol*: 36:197-221.
- Vilela CR, Bächli G (1990) Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt Schweiz Ent Ges* 63:1-332.
- Vilela CR, Bächli G (2002) On the identity of four poorly known species of neotropical Drosophilidae (Diptera). *Mitt Schweiz Ent Ges* 75:197-210.
- Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92:371-373.

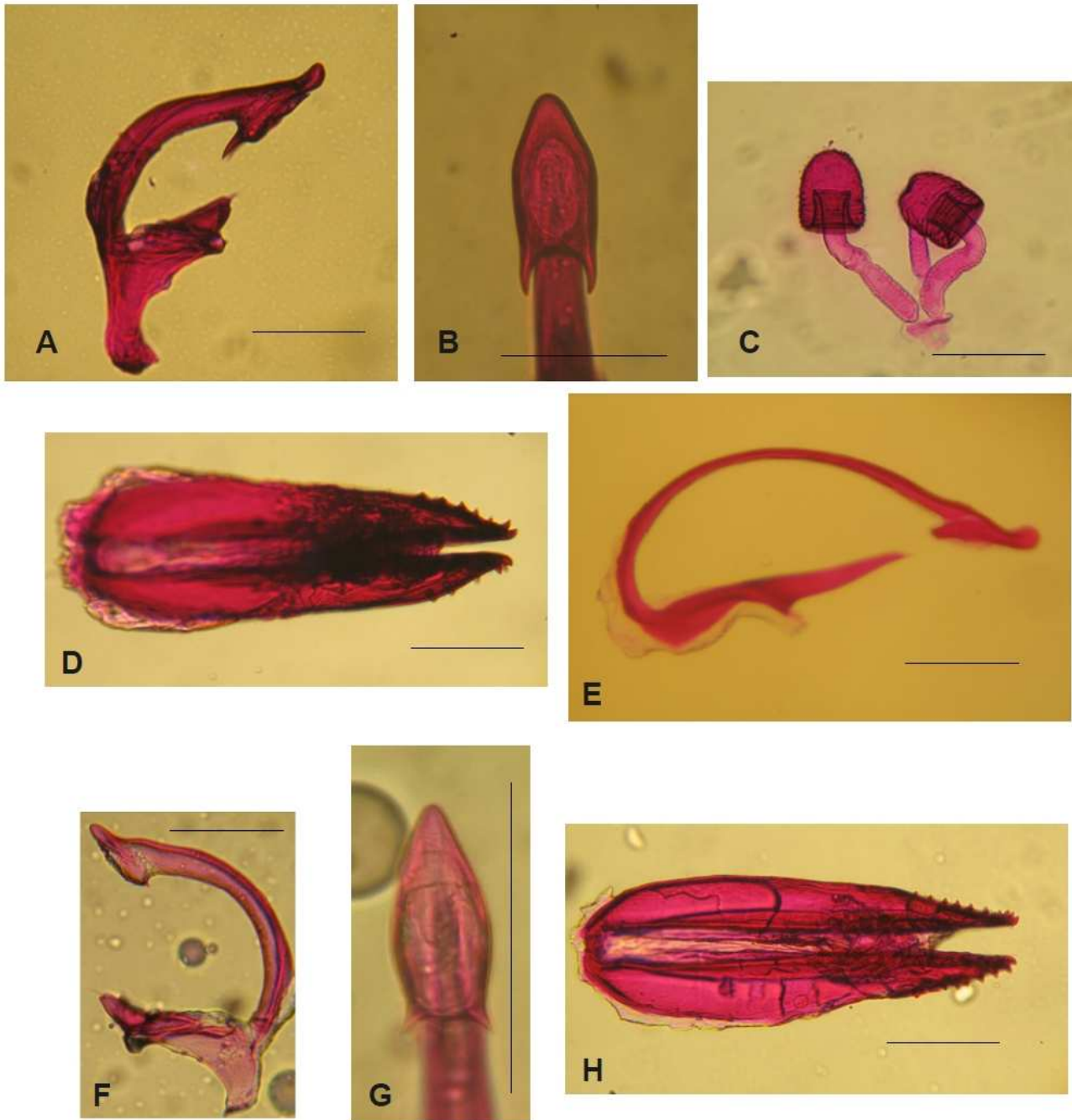


Figura 1. A. Edeago, apódema do edeago e paráfises do tipo III', vista lateral. B. Edeago do tipo III', detalhe da extremidade distal, vista ventral. C. Espermatecas do tipo III'. D. Valvas do ovipositor do tipo III', vista ventral. E. Edeago, apódema do edeago e paráfises do tipo IV', vista lateral. F. Edeago, apódema do edeago e paráfises do tipo VI, vista lateral. G. Edeago do tipo VI, detalhe da extremidade distal, vista ventral. H. Valvas do ovipositor do tipo III', vista ventral.



Figura 2. Experimento de oviposição em *Solanum sisymbriifolium*. A. Flor de *S. sisymbriifolium*. B. Experimento de oviposição: vidro de relógio com meio de cultura, flores de *S. sisymbriifolium* em vários estágios e moscas adultas, em recipiente de vidro. C. Flores de *S. sisymbriifolium* e adultos de tipo V. A seta indica botão floral, estágio da flor em que foram encontrados os ovos desta espécie. D. Ovo de tipo V, encontrado no interior do botão floral, na face interna da pétala. E. Larva de 3^o ínstar de tipo V, no interior da flor em antese. F. Pupário de tipo V, junto à flor em decomposição. G. Ovo de *D. simulans*, visualizado no experimento de oviposição, na base do cálice. H. Ovo de *D. bromelioides*, visualizado no experimento de oviposição, na face interna da pétala da flor em antese.

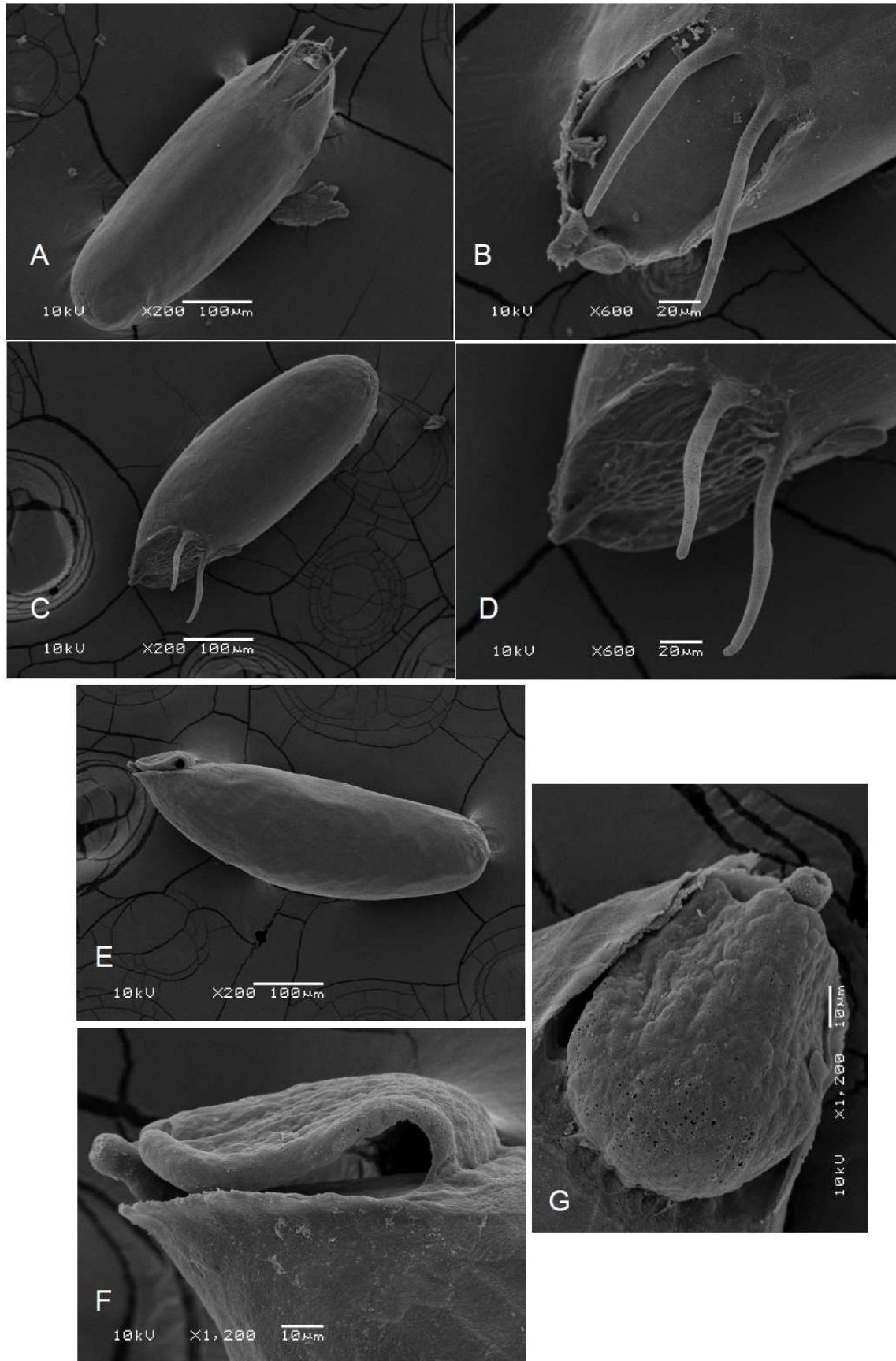


Figura 3. Ovos de três espécies do grupo *bromeliae* de *Drosophila*. A-B. *D. bromeliae*. C-D. *D. bromelioides*. E-F. Tipo III.



Figura 4. Oscilograma do som de corte do macho de *D. bromeliae*. Escala: tempo em s.



Figura 5. Oscilograma do som de corte do macho do tipo III. Escala: tempo em s.

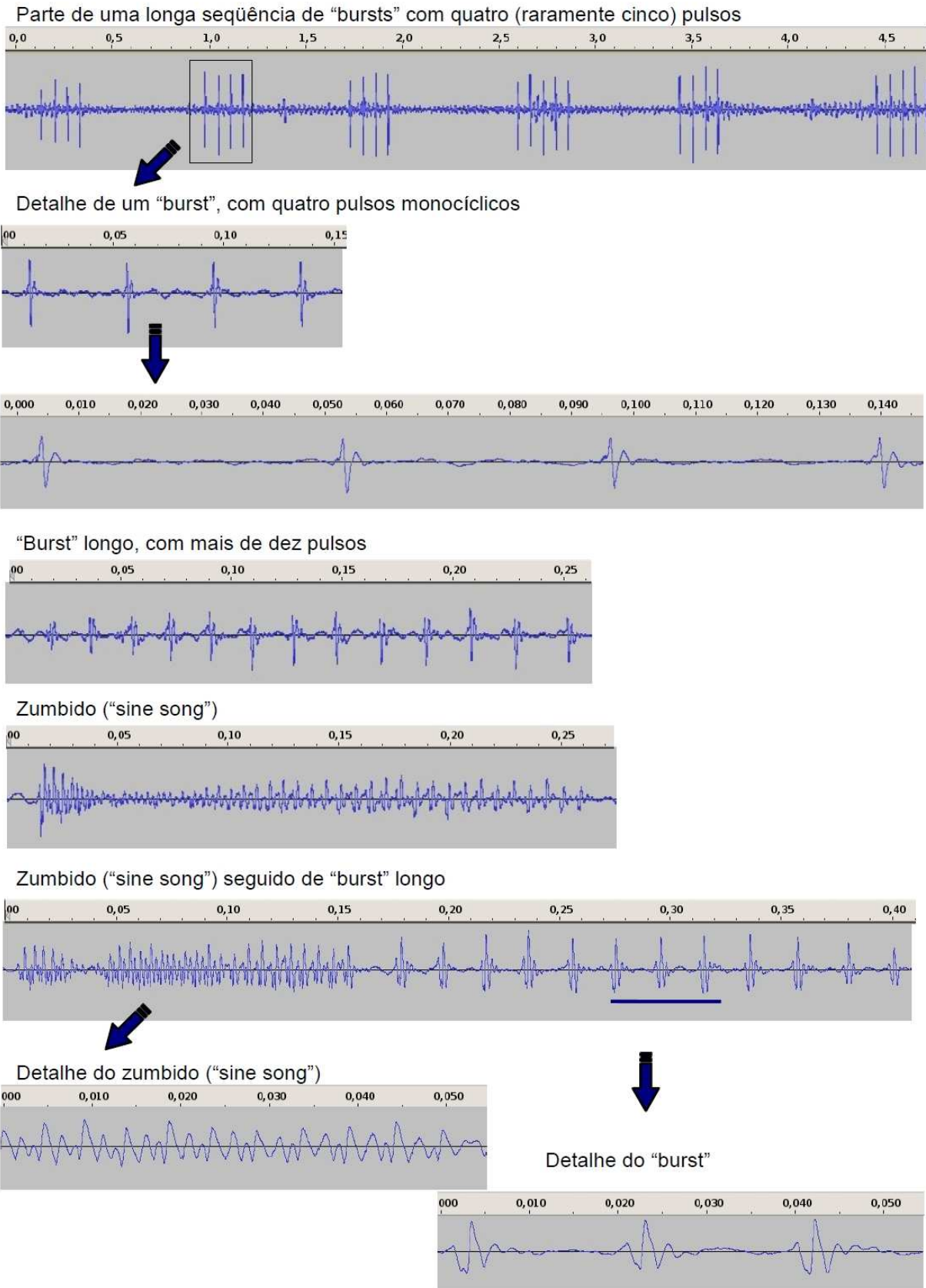


Figura 6. Oscilogramas de vários elementos do som de corte do macho de *D. bromelioides*. Escala: tempo em s.

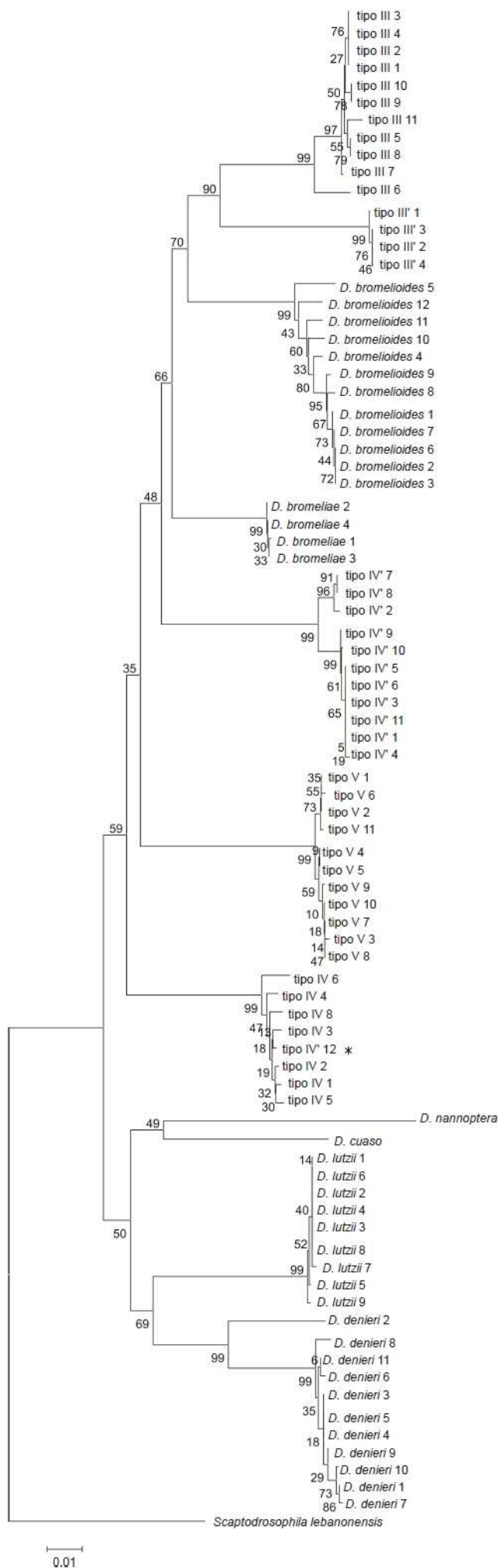


Figura 7. Árvore de *neighbour-joining* obtida para a análise de *barcode* baseada em seqüências de *COI* para espécies do grupo *bromeliae* de *Drosophila* e do subgênero *Phloridosa*. Junto a cada nó, é indicado o respectivo valor de *bootstrap*. O único indivíduo mal classificado é indicado por um asterístico. Escala: 0,01 substituição por nucleotídeo.

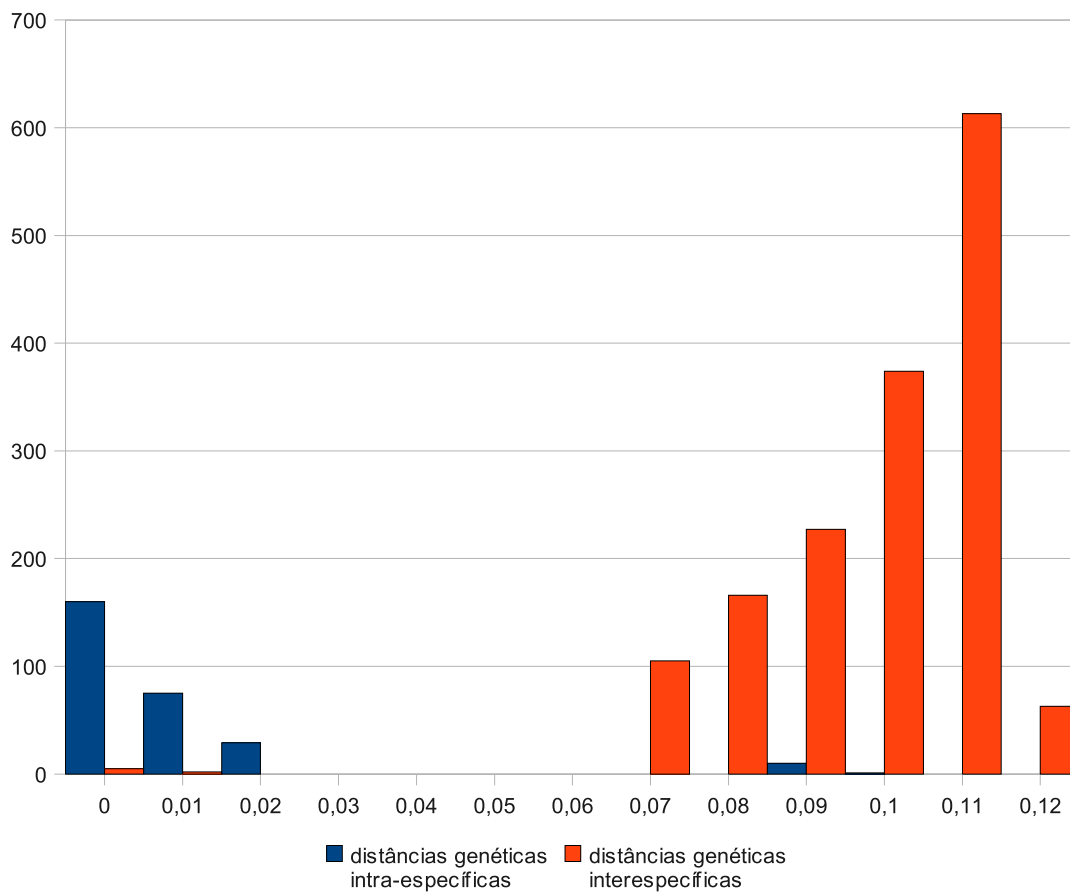


Figura 8. Distribuição das distâncias genéticas intra e interespecíficas obtidas segundo o modelo de Kimura 2-Parâmetros com seqüências de *COI* para o grupo *bromeliae*. O eixo x mostra a distância genética e o eixo y o número de casos para a respectiva distância em cada categoria.

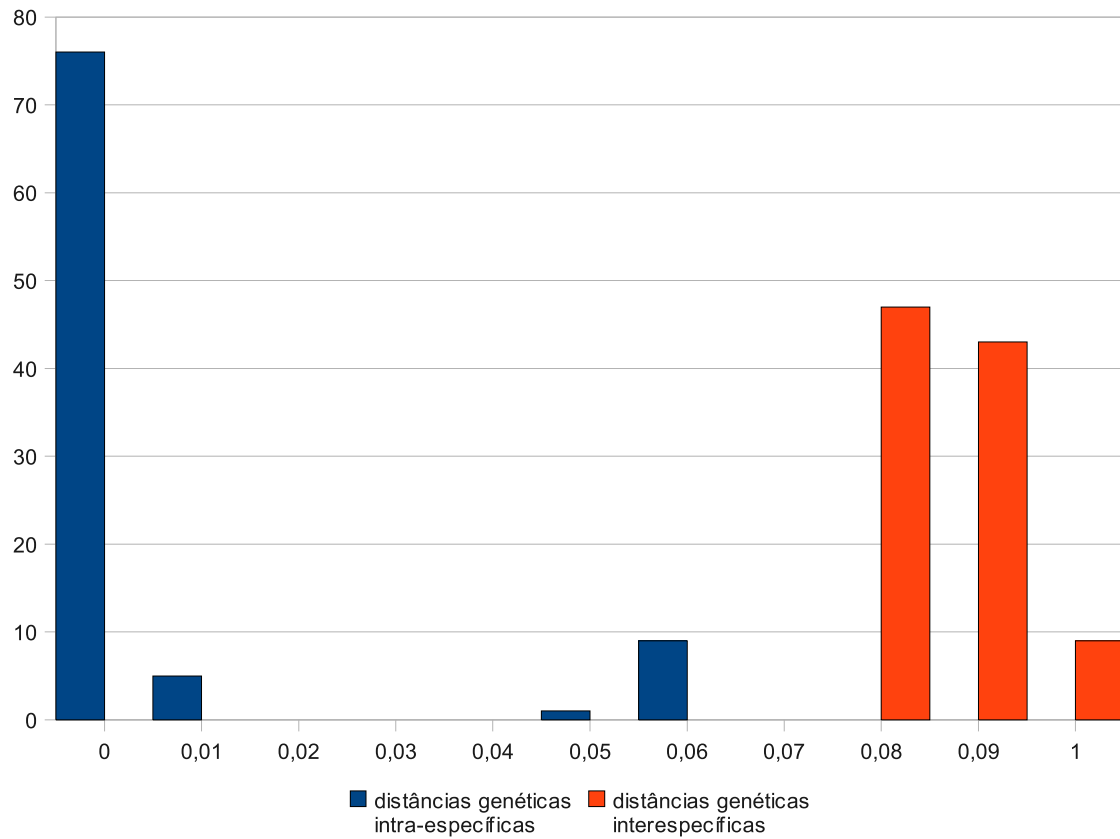


Figura 9. Distribuição das distâncias genéticas intra e interespecíficas obtidas segundo o modelo de Kimura 2-Parâmetros com seqüências de *COI* para o subgênero *Phloridosa*. O eixo x mostra a distância genética e o eixo y o número de casos para a respectiva distância em cada categoria.

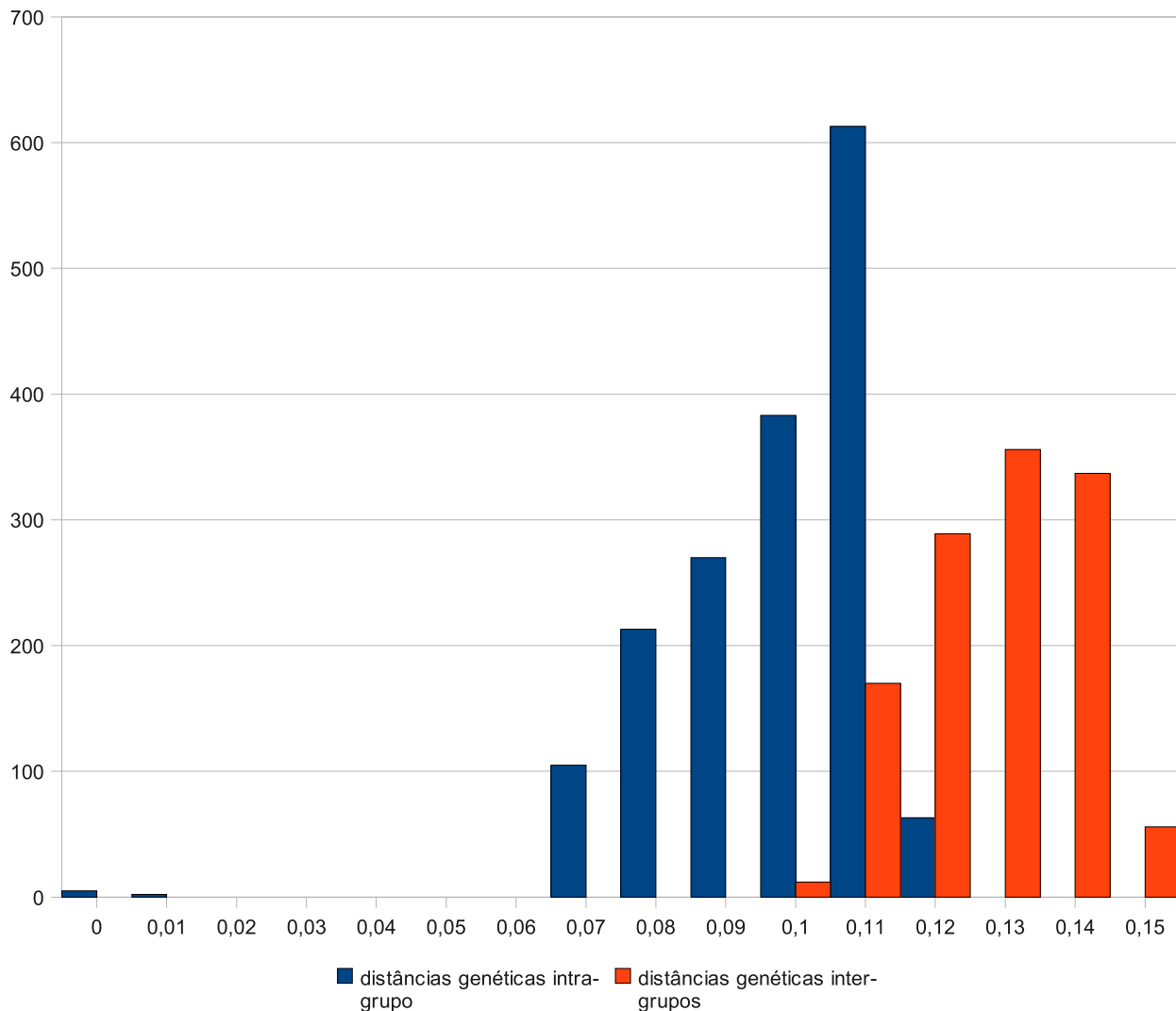


Figura 10. Distribuição das distâncias genéticas obtidas segundo o modelo de Kimura 2-Parâmetros com seqüências de *COI* comparando o grupo *bromeliae* com o subgênero *Phloridosa*. O eixo x mostra a distância genética e o eixo y o número de casos para a respectiva distância em cada categoria. As distâncias genéticas intra-grupo consideram as distâncias entre indivíduos de espécies diferentes do mesmo grupo (grupo *bromeliae* ou subgênero *Phloridosa*), enquanto as distâncias genéticas inter-grupo consideram as comparações entre indivíduos de grupos diferentes.

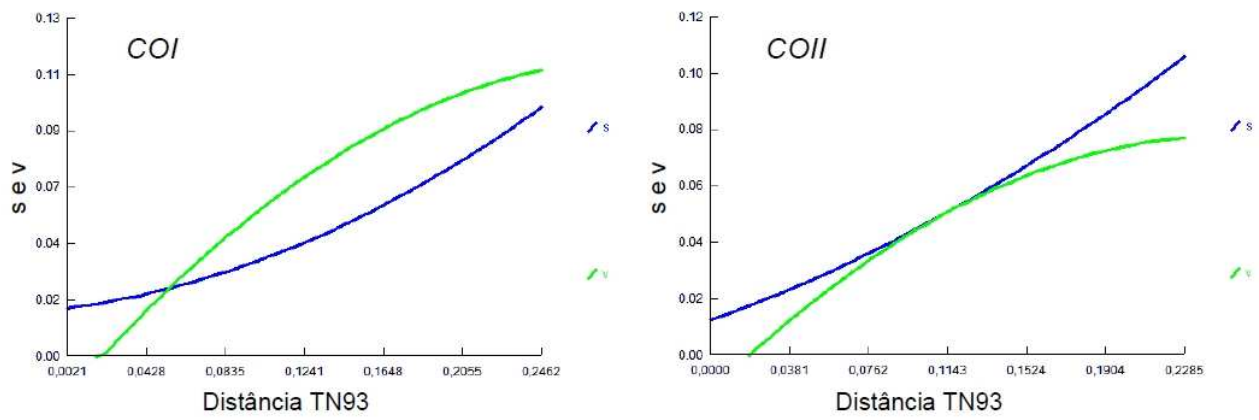


Figura 11. Taxas de transições (s) e transversões (v) plotadas com as distâncias de Tamura-Nei 93 para as matrizes de dados de seqüências de *COI* (à esquerda) e *COII* (à direita).

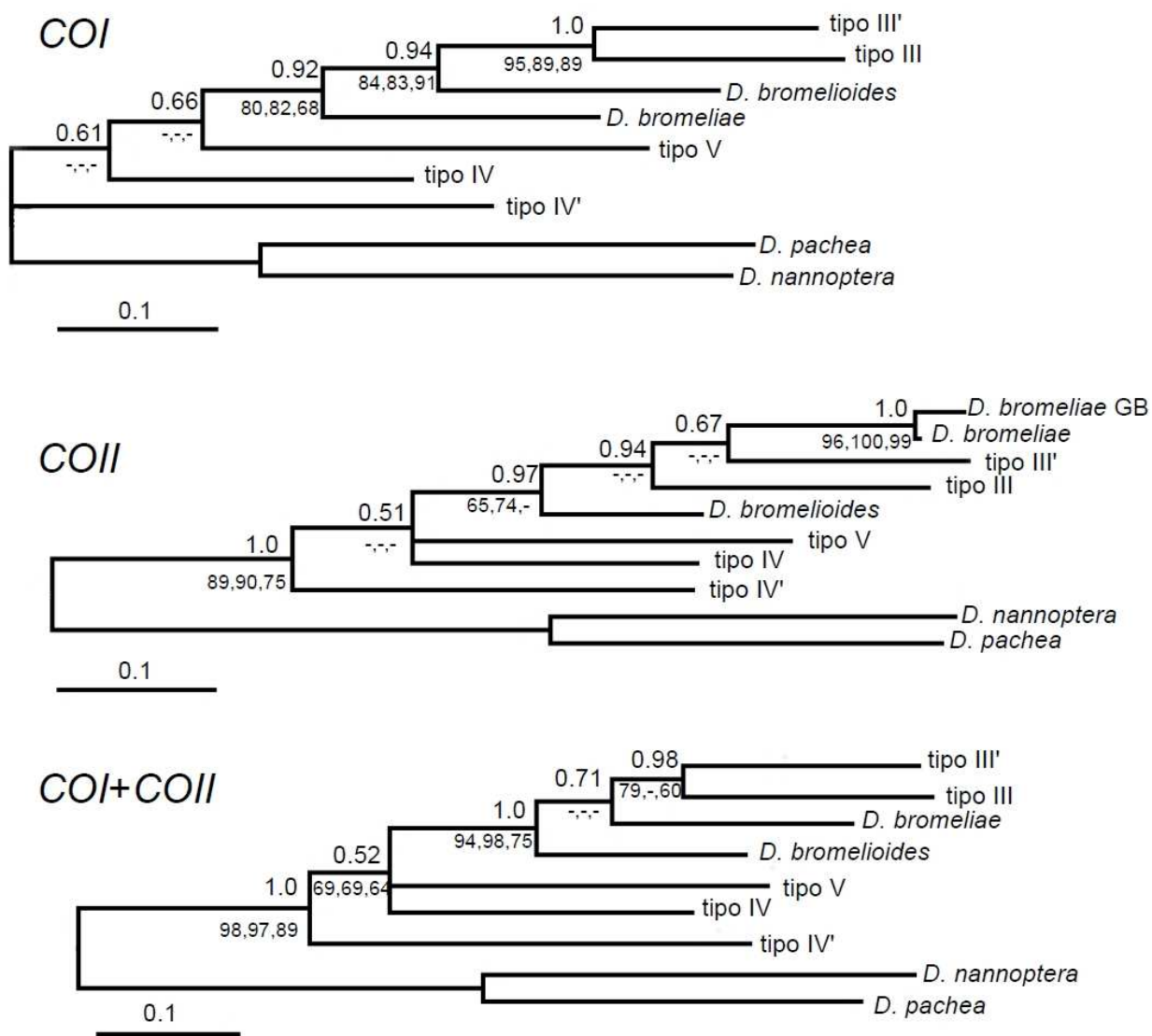


Figura 12. Árvores filogenéticas obtidas para cada conjunto de dados através da análise bayesiana para o grupo *bromeliae* de *Drosophila*. Acima de cada nó é indicada a probabilidade posterior obtida na análise bayesiana para o respectivo clado; abaixo de cada nó estão indicados valores de *bootstrap* obtidos para as análises de máxima verossimilhança, *neighbour-joining* e máxima parcimônia, respectivamente; os traços indicam que uma topologia alternativa ou uma politomia foi obtida na respectiva análise. São mostrados apenas os táxons de interesse. Escala: 0,1 substituição por nucleotídeo.

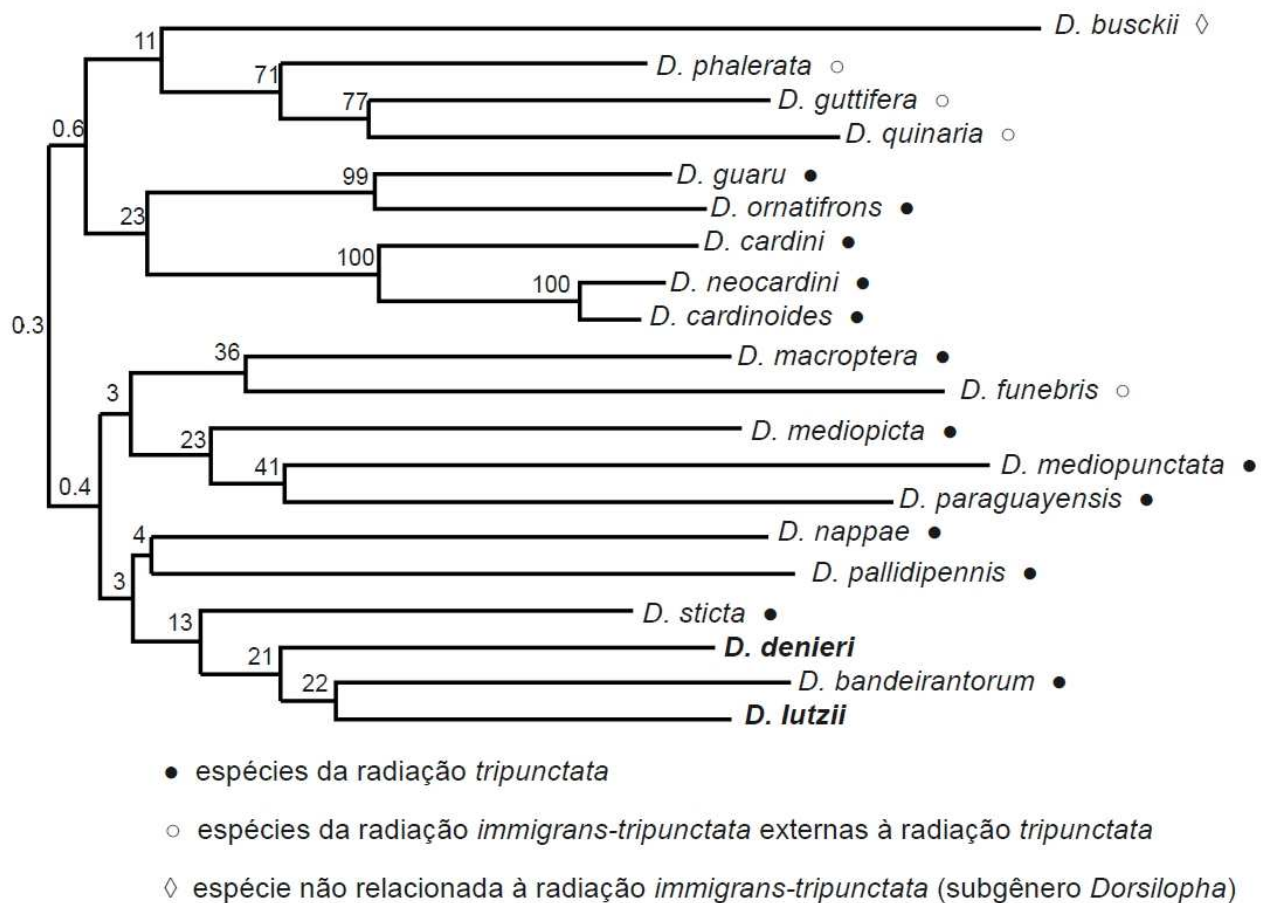
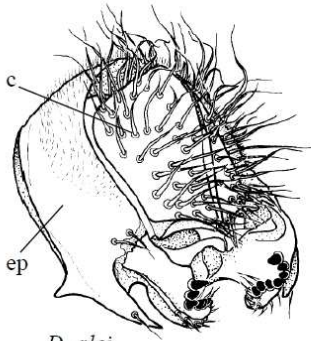


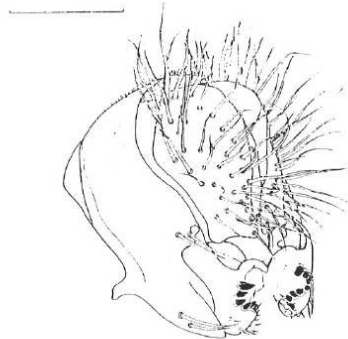
Figura 13. Árvore filogenética obtida para evidências totais segundo a análise de máxima verossimilhança para o posicionamento filogenético do subgênero *Phloridosa*. Acima de cada nó é indicado o valor de "bootstrap" obtido para o respectivo clado. O posicionamento de cada espécie dentro ou fora da radiação *immigrans-tripunctata* e da radiação *tripunctata* é indicado por símbolos, de acordo com Throckmorton (1975), Hatadani *et al.* (2009) e Robe *et al.* (2010). É mostrado apenas o grande clado no qual se inserem as espécies do subgênero *Phloridosa*. Escala: 0,1 substituição por nucleotídeo.

Subgênero *Phloridosa*

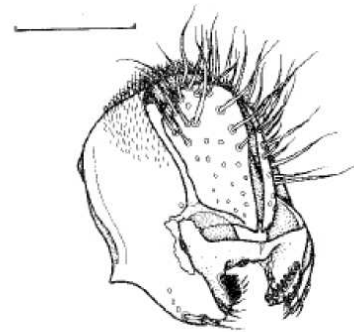
100 µm



D. alei

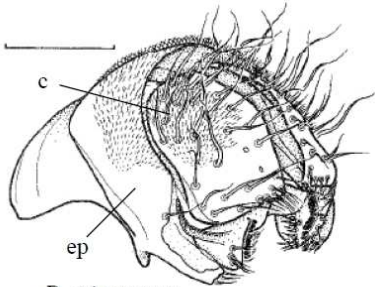


D. denieri

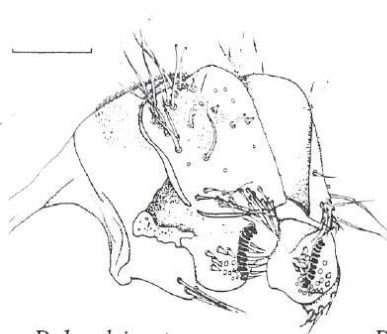


D. lutzii

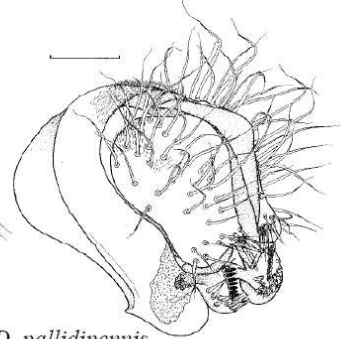
Radiação *tripunctata*



D. tripunctata

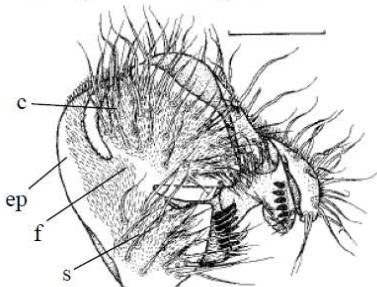


D. bandeirantorum

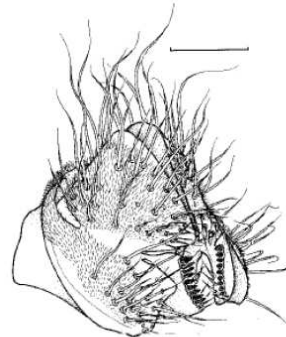


D. pallidipennis

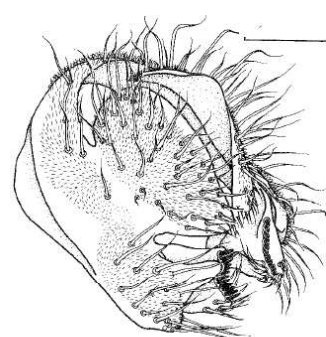
Radiação *virilis-repleta*



D. virilis

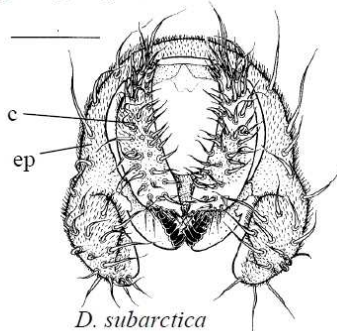


D. canalinea

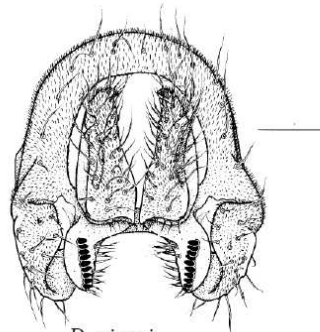


D. mesophragmatica

Grupo *nigrosparisa*



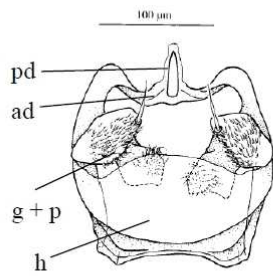
D. subarctica



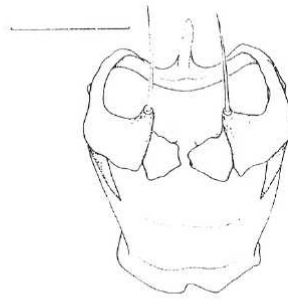
D. vireni

Figura 14. Terminália externa de membros representativos do subgênero *Phloridosa*, da radiação *tripunctata*, da radiação *virilis-repleta* e do grupo *nigrosparisa*. c: cercos; e: epândrio; f: fusão entre cercos e epândrio; s: cerdas longas e numerosas no lobo ventral do epândrio. Modificado a partir de Vilela (1984, 1992), Vilela & Bächli (1990, 2002) e Bächli *et al.* (2004). Escala: 100 µm.

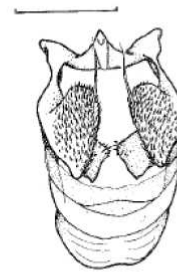
Subgênero *Phloridosa*



D. alei

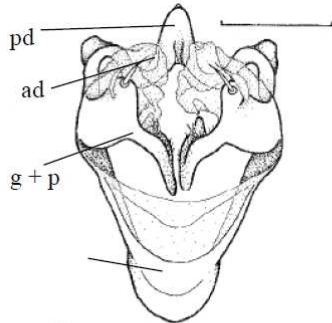


D. demieri

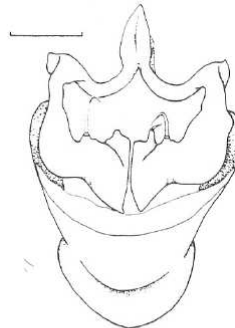


D. lutzii

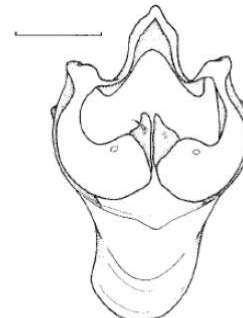
Radiação *tripunctata*



D. tripunctata

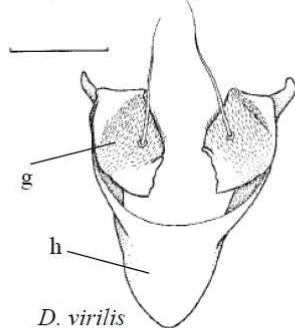


D. bandeirantorum

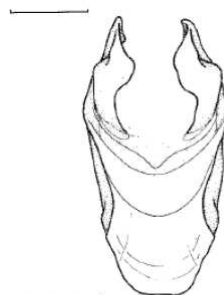


D. pallidipennis

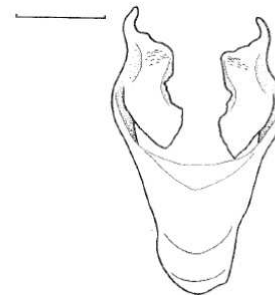
Radiação *virilis-repleta*



D. virilis

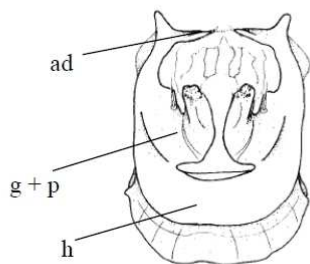


D. canalinea

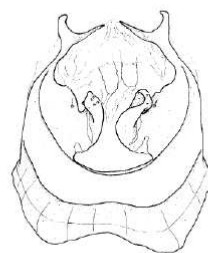


D. mesophragmatica

Grupo *nigrosarsa*



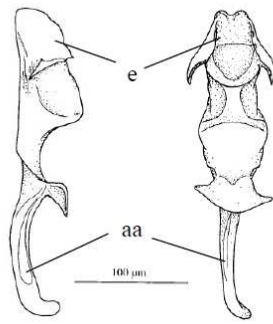
D. subarctica



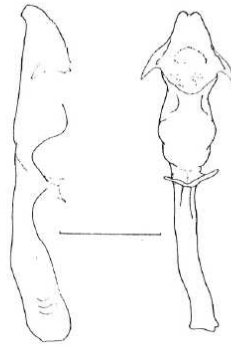
D. vireni

Figura 15. Hipândrio de membros representativos do subgênero *Phloridosa*, da radiação *tripunctata*, da radiação *virilis-repleta* e do grupo *nigrosarsa*. ad: arco dorsal; g: gonópodos; g+p: gonópodos fusionados a paráfises; h: hipândrio; pd: processo dorsal. Modificado a partir de Vilela (1984, 1992), Vilela & Bächli (1990, 2002) e Bächli *et al.* (2004). Escala: 100 µm.

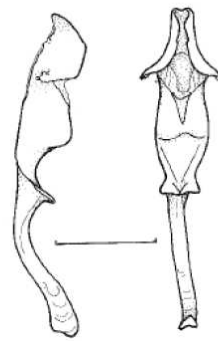
Subgênero *Phloridosa*



D. alei

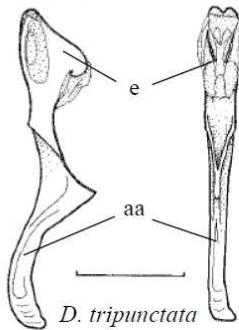


D. denieri

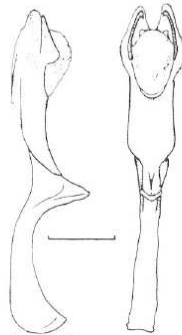


D. lutzii

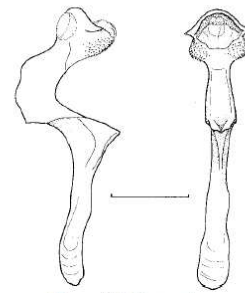
Radiação *tripunctata*



D. tripunctata

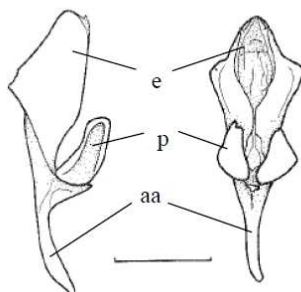


D. bandeirantorum

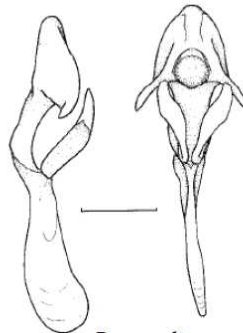


D. pallidipennis

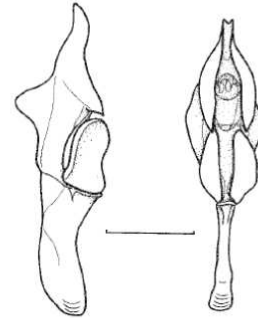
Radiação *virilis-repleta*



D. virilis

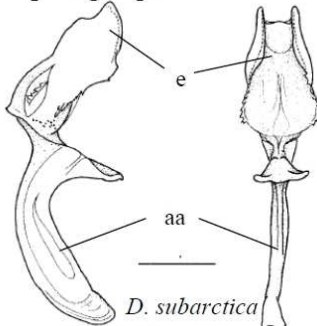


D. canalinea

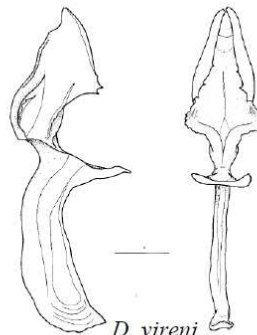


D. mesophragmatica

Grupo *nigrosarsa*



D. subarctica



D. vireni

Figura 16. Edeago de membros representativos do subgênero *Phloridosa*, da radiação *tripunctata*, da radiação *virilis-repleta* e do grupo *nigrosarsa*. a: apódema do edeago; e: edeago; p: paráfise. Modificado a partir de Vilela (1984, 1992), Vilela & Bächli (1990, 2002) e Bächli *et al.* (2004). Escala: 100 µm.

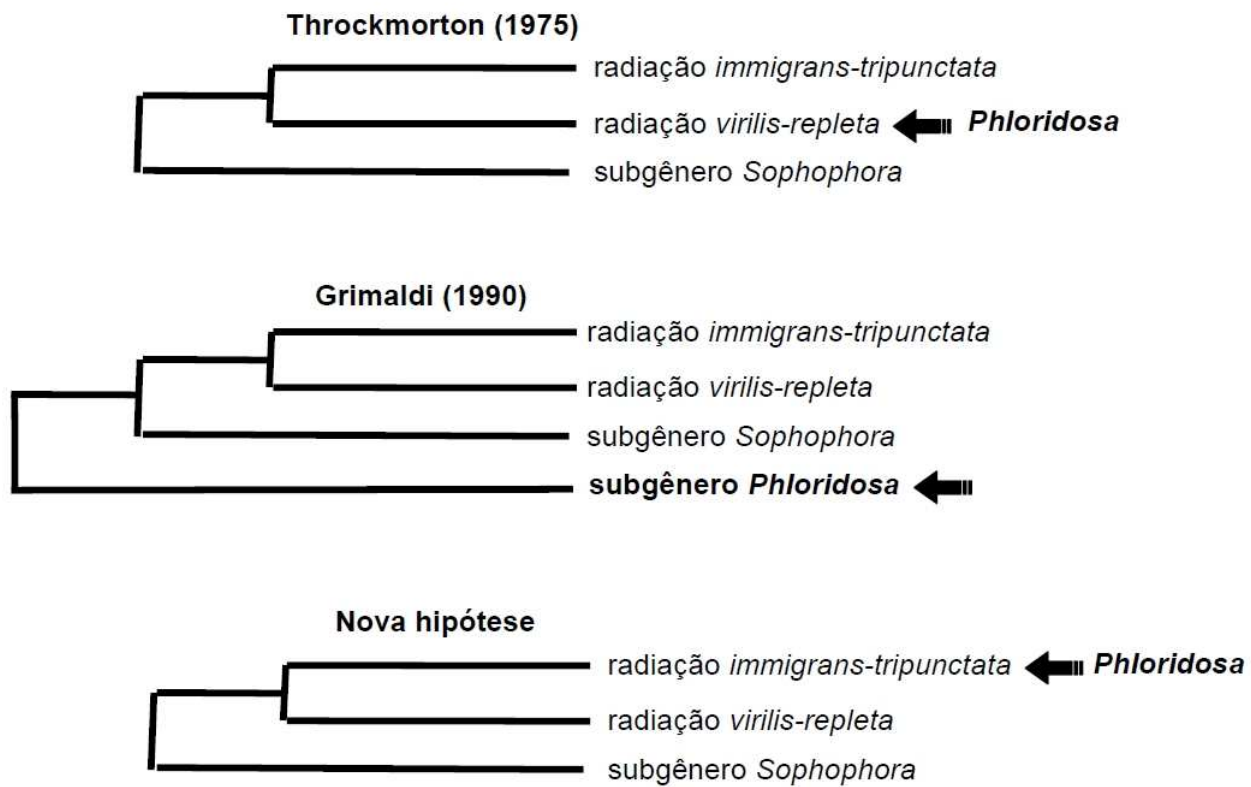


Figura 17. Sumário das hipóteses existentes sobre o posicionamento filogenético do subgênero *Phloridosa*, de acordo com Throckmorton (1975), Grimaldi (1990) e a nova hipótese sugerida no presente estudo.

CAPÍTULO VI

Discussão Geral

Discussão Geral

A fauna de Drosophilidae associada a flores revelada pelo inventário efetuado nesta tese (Cap. II) se mostrou grandemente desconhecida, em especial em relação às espécies de ecologia restrita. Cerca de 40% das espécies encontradas não estavam descritas. Excetuando-se as espécies oportunistas, este número sobe para dois terços. Adicionalmente, para as espécies já descritas, há vários novos registros para alguns estados brasileiros e até para a América do Sul, evidenciando como o conhecimento sobre a biogeografia destas espécies ainda permanece fragmentado.

Estes resultados deixam claro o grande desconhecimento que ainda existe sobre a diversidade de Drosophilidae na Região Neotropical, a despeito da grande tradição do uso de representantes desta família em estudos genéticos, moleculares e evolutivos. Pode-se ressaltar ainda que Drosophilidae é uma das famílias de Diptera mais bem estudadas (Brown, 2005). Além disso, a maior parte das amostras analisadas nesta tese foram obtidas em coletas realizadas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, dois estados relativamente bem amostrados em estudos com diversidade de Drosophilidae (Gottschalk *et al.*, 2008).

Inventários de diversidade de Drosophilidae quase sempre fazem uso de armadilhas artificiais com iscas de frutas, em especial banana. Pesquisas sobre os substratos naturais de criação das espécies são menos comuns, mas também tendem a se concentrar em assembléias colonizadoras de frutos. Estudos recentes de diversidade de Drosophilidae no Brasil baseados em coletas de fungos (Roque *et al.*, 2006; Gottschalk *et al.*, 2008), assim como a presente tese, têm encontrado grande número de espécies que não são habitualmente detectadas pelos tradicionais levantamentos com iscas de frutas. Deste modo, para um levantamento mais completo da fauna de Drosophilidae, faz-se bastante necessária a inclusão de métodos alternativos de coleta nos inventários realizados, como a coleta de flores, fungos e outros potenciais substratos naturais, bem como o uso de métodos como armadilhas Malaise e varreduras com rede entomológica, para a captura de espécies não atraídas por frutos.

Como um esforço para deixar a diversidade brasileira de drosofilídeos antofílicos um pouco menos desconhecida, uma espécie nova foi descrita no Cap. III e outras três no Cap. IV, juntamente com complementos de descrição nos moldes da taxonomia moderna para duas espécies anteriormente descritas. Outras espécies não descritas encontradas neste estudo ainda não receberam um tratamento taxonômico formal, incluindo três espécies do grupo *bromeliae*. O número de espécies não descritas ou pobremente conhecidas, entretanto, permanece grande, e certamente muitas espécies ainda permaneçam não descobertas. Embora o presente estudo se apóie em um amplo esforço amostral, está longe de ser exaustivo, considerando a enorme extensão

territorial do Brasil, com muitas áreas ainda pouco exploradas, em especial nas regiões Norte e Nordeste. Aliado a isto, está a grande diversidade da flora, que oferece uma quantidade enorme de potenciais plantas hospedeiras para drosofilídeos. Como um exemplo, se nenhuma espécie do gênero *Solanum* fosse incluída no presente inventário, quatro espécies não descritas de *Drosophila*, de ecologia especializada, teriam passado completamente despercebidas. Outros casos de alta especialização existem na fauna neotropical de drosofilídeos antofílicos, como o grupo *flavopilosa* de *Drosophila*, em flores de *Cestrum*. É impossível assumir que outras formas especializadas não tenham sido ignoradas pela falta de coletas de suas plantas hospedeiras.

O grupo *bromeliae* e o subgênero *Phloridosa* de *Drosophila* se mostraram os táxons mais representativos da fauna de drosofilídeos associada a flores no Brasil. No entanto, a maior parte das coletas foram realizadas em ambientes ruderais, bordas de mata e de campos, com vegetação pioneira, ou em ambientes urbanos. É possível que em outros tipos de ambientes menos explorados outras espécies apresentem uma representatividade maior, como observado em uma área florestada da Mata Atlântica catarinense, onde *Zygothrica dispar* foi a espécie mais comum. A grande heterogeneidade ambiental presente nos diversos biomas brasileiros certamente oferece mais uma dimensão de complexidade para estudos deste tipo.

A colonização de flores como sítio de criação e a subsequente especialização neste nicho é um fenômeno recorrente na família Drosophilidae, sendo observado em vários táxons não relacionados, em todas as partes do mundo. O grupo *bromeliae* e o subgênero *Phloridosa*, de certa forma, podem ser considerados como equivalentes ecológicos do subgênero *Exalloscapteromyza* de *Scaptomyza* no Havaí, ao grupo *aterrima* de *Scaptodrosophila* na África e ao subgrupo *elegans* do grupo *melanogaster* de *Drosophila* na Ásia, no sentido de representarem espécies polípagas de drosofilídeos associados exclusivamente a flores. Além disso, formas especializadas também têm evoluído em várias regiões do mundo, como o gênero *Colocasiomyia* em Araceae na Ásia, *Scaptodrosophila hibisci* e *S. acclinata* em *Hibiscus* na Austrália, *Drosophila flavohirta* em *Eucalyptus*, também na Austrália, e os grupos neotropicais *flavopilosa* e *onychophora*, respectivamente em *Cestrum* e Asteraceae. A especialização em *Solanum*, como observada em algumas espécies do grupo *bromeliae* neste estudo, não é conhecida para outras partes do globo. Entretanto, como *Solanum* é um gênero pantropical, a ocorrência ou não de drosofilídeos nestas plantas em outras regiões biogeográficas carece de confirmação.

A compreensão dos processos que levam à evolução de nichos ecológicos ligados a flores, no entanto, exige uma sólida base filogenética. Enquanto há um consenso de que grupos antofílicos neotropicais de *Drosophila* como *bromeliae* e *flavopilosa* tenham se originado independentemente dentro da radiação *virilis-repleta* do subgênero *Drosophila*, as relações filogenéticas do subgênero

Phloridosa têm sido alvo de discordâncias. Os resultados aqui apresentados, contrariamente às hipóteses anteriores, sugerem que este táxon teria evoluído dentro da radiação *immigrans-tripunctata* do subgênero *Drosophila*. A ocorrência de grupos exclusivamente associados a flores nesta radiação não é observada, embora algumas espécies pouco conhecidas do grupo *tripunctata* pareçam estar relacionadas a flores de algum modo. Além disso, as relações internas desta radiação estão entre as mais controversas da família Drosophilidae, certamente exigindo extensas revisões taxonômicas ainda não sugeridas devido à falta de consenso.

A ocorrência de espécies próximas com graus variados de amplitude de nicho, como pode ser observado no grupo *bromeliae*, de acordo com os resultados apresentados nesta tese, representam uma ótima oportunidade para o estudo da evolução de mudanças de nicho e da origem de formas especializadas, incluindo talvez eventos de especiação ecológica. Como visto nesta tese, de acordo com a amplitude de nicho, este grupo apresenta espécies (1) polífas, de ecologia bastante generalista, ocorrendo em uma grande variedade de plantas hospedeiras, de diversas famílias; (2) oligófagas, de ecologia generalista, porém ocorrendo em um número consideravelmente menor de plantas hospedeiras quando em comparação com as anteriores; e (3) monófagas, de ecologia especializada, no caso, em flores de plantas do gênero *Solanum*. Interessante notar é a evidente correlação de estruturas morfológicas destas espécies com seus hábitos ecológicos, com um aumento de tamanho dos ovipositores e uma redução (ou modificação) dos filamentos respiratórios dos ovos de acordo com o grau de especialização. Aparentemente, também há uma correlação entre a inclinação da porção distal do edeago em relação ao grau de especialização. Tsacas *et al.* (1988) observaram uma relação entre a morfologia do ovipositor, na fêmea, com o tamanho do surstilo, na terminália masculina do macho, no grupo *aterrima* de *Scaptodrosophila*, sugerindo que esta estrutura nos machos poderia estar sujeita a uma pressão seletiva proporcionada pela morfologia do ovipositor da fêmea, que por sua vez, estaria sujeita às pressões seletivas do substrato de oviposição. Como o edeago é o órgão copulador do macho e entra em contato com o ovipositor da fêmea durante a cópula, é possível que a ecologia das espécies seja um importante fator também na evolução genital de machos. Edeagos curvos e inclinados também são observados em espécies de ecologia restrita a flores nos grupos *flavopilosa* e *onychophora*, em especial nas espécies mais especialistas, que também apresentam importantes modificações nos ovipositores.

Além das diferenças de nicho ecológico, também são notáveis as diferenças nas distribuições geográficas das espécies do grupo *bromeliae*. Embora mais coletas em um número maior de localidades sejam requeridas para se montar um panorama completo da biogeografia do grupo, os resultados apresentados nesta tese sugerem fortemente a ocorrência de dois grupos

geográficos: (1) espécies de distribuição relativamente mais meridional - *D. bromelioides*, tipo III, tipo IV e tipo V; e (2) espécies de distribuição relativamente mais setentrional - *D. bromeliae*, tipo III', tipo IV' e tipo VI. Nota-se também uma relação de equivalência entre as formas encontradas no sul e no norte, em relação à ecologia. Deste modo, *D. bromelioides* e *D. bromeliae* parecem ser as espécies mais generalistas no sul e no norte, respectivamente, enquanto o tipo III e o tipo III' são espécies de amplitude de nicho intermediária, respectivamente no sul e no norte. Adicionalmente, cada região apresenta duas espécies especialistas em *Solanum*: os tipos IV e V, no sul, e os tipos IV' e VI, no norte.

As distribuições geográficas de cada par de espécies, entretanto, não coincidem exatamente. Enquanto a espécie generalista "meridional" *D. bromelioides* foi encontrada neste estudo até Minas Gerais, com registro na literatura até o sul da Bahia (Roque & Tidon, 2008), as demais espécies meridionais não foram encontradas acima de Santa Catarina. Por outro lado, entre as espécies "setentrionais", o tipo IV' parece ser o de maior distribuição geográfica no Brasil, se estendendo da região Nordeste até Santa Catarina. Em parte de sua distribuição, portanto, o tipo IV' se torna simpátrico com as espécies meridionais. Possíveis áreas de simpatria em regiões centrais do Brasil entre os dois grupos de espécies necessitam ser exploradas.

A ocorrência de isolamento reprodutivo incompleto entre espécies crípticas não é incomum no gênero *Drosophila*. Entretanto, pelo menos três espécies do grupo (*D. bromeliae*, *D. bromelioides* e tipo III), que foram submetidas a experimentos de cruzamentos no presente estudo, mostraram ter isolamento reprodutivo completo. A posterior análise do som de corte dos machos nestas três espécies revelou diferenças marcantes, podendo representar um fator importante no reconhecimento espécie-específico e na manutenção do isolamento reprodutivo pré-zigótico entre as espécies, em especial naquelas que ocorrem em simpatria. Seria interessante também se testar o isolamento reprodutivo e potenciais diferenças no padrão de som de corte em espécies aparentemente alopátricas e relacionadas, como os tipos III e III'.

As análises moleculares baseadas em seqüências mitocondriais corroboram as diferenças morfológicas encontradas entre as espécies do grupo *bromeliae*, bem como do subgênero *Phloridosa*. A análise de *barcode* destas espécies foi bastante efetiva na correta discriminação dos espécimes e pode representar uma boa ferramenta para a identificação de espécimes coletados na natureza no futuro, em especial de fêmeas, nas quais a identificação por morfologia é mais difícil.

As relações filogenéticas do grupo *bromeliae* ainda requerem estudos adicionais, com marcadores moleculares diferentes daqueles utilizados na presente tese para sua completa resolução. Os resultados aqui apresentados, entretanto, sugerem fortemente a existência de um clado terminal de espécies generalistas (*D. bromeliae*, *D. bromelioides*, tipo III e tipo III') com as espécies restritas

a *Solanum* (tipo IV, tipo IV' e tipo V) permanecendo como linhagens basais de topologia não resolvida.

Finalmente, a análise combinada e comparativa dos múltiplos marcadores utilizados nesta tese nos permitem sugerir uma primeira hipótese sobre o cenário evolutivo do grupo *bromeliae* (Figura 1). Neste cenário, as linhagens basais do grupo se caracterizariam pela especialização em *Solanum* (monófagas), com as fêmeas apresentando longos ovipositores e os machos edeagos marcadamente inclinados, além de apresentarem ovos sem filamentos. Posteriormente, um grupo generalista (polífago) teria se originado, colonizando grande variedade de plantas hospedeiras, e apresentando uma redução no tamanho do ovipositor das fêmeas e da inclinação do edeago dos machos, bem como o desenvolvimento de pequenos filamentos respiratórios nos ovos. Na posição mais terminal deste clado generalista, todavia, teria ocorrido uma redução na amplitude de nicho, dando origem a espécies oligófagas com novo aumento no tamanho dos ovipositores e da inclinação dos edeagos nos machos até um nível intermediário entre as espécies monófagas e polífagas, bem como com o desenvolvimento de uma estrutura membranosa no lugar dos filamentos nos ovos e a redução da invaginação do ducto na cápsula da espermateca.

Conclusões

As principais conclusões e contribuições geradas por esta tese podem ser sumarizadas como a seguir:

- A diversidade de Drosophilidae associada a flores no Brasil é grandemente desconhecida, com muitas espécies ainda não descritas e espécies de registro geográfico fragmentado.

- Esta tese vem a contribuir com a descrição taxonômica formal de quatro novas espécies - *Rhinoleucophenga joaquina* sp. nov., *Drosophila anaeterrae* sp. nov., *D. solani* sp. nov. e *D. jurubeba* sp. nov., assim como complementos de descrições nos moldes modernos para *D. bromeliae* Sturtevant, 1921 e *D. bromelioides* Pavan & Cunha, 1947.

- Outras espécies não descritas são brevemente apresentadas.

- Os táxons mais representativos de drosofilídeos antofílicos no Brasil são o grupo *bromeliae* e o subgênero *Phloridosa* de *Drosophila*.

- O subgênero *Phloridosa* possivelmente teve sua origem na radiação *immigrans-tripunctata* do subgênero *Drosophila*.

- Análises de *barcode* baseadas em seqüências de *COI* são bastante efetivas na correta identificação de duas espécies do subgênero *Phloridosa* e sete espécies do grupo *bromeliae*.

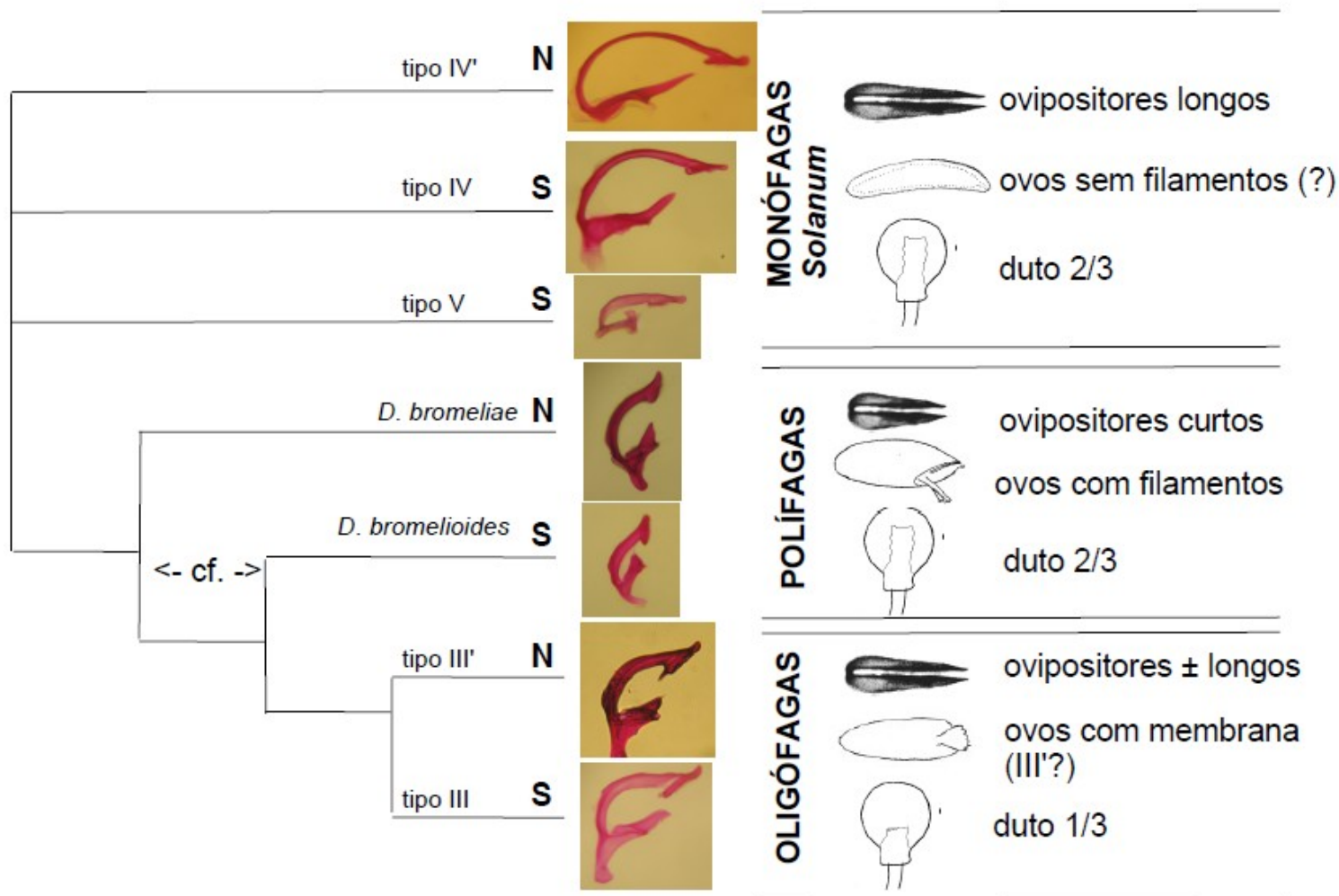


Figura 1. Hipótese sobre o cenário evolutivo do grupo *bromeliae* gerado a partir da combinação de diversas abordagens realizadas no presente estudo. cf. indica posicionamento incerto, sujeito a confirmação; N e S indicam espécies de distribuição predominantemente ao Norte e ao Sul, respectivamente.

- Espécies do grupo *bromeliae* apresentam vários graus de amplitude de nicho, com espécies polífagas (*D. bromeliae* e *D. bromelioides*), oligófagas (tipos III e III') e monófagas (tipos IV, IV', V e VI), sendo que as espécies presentes nas duas últimas categorias são relatadas pela primeira vez nesta tese. As espécies monófagas são especializadas em flores de *Solanum*.

- As diferenças na amplitude de nicho das espécies do grupo *bromeliae* são acompanhadas por diferenças na morfologia dos ovos, do ovipositor e, possivelmente, do edeago.

- As espécies do grupo *bromeliae* dividem-se geograficamente em dois grupos, um com distribuição predominantemente meridional (*D. bromelioides* e tipos III, IV e V) e outro com distribuição predominantemente setentrional (*D. bromeliae* e tipos III', IV' e VI), com equivalentes ecológicos entre os dois grupos geográficos.

- Pelo menos três espécies do grupo *bromeliae* (*D. bromeliae*, *D. bromelioides* e tipo III) apresentam isolamento reprodutivo completo e diferenças marcantes nos padrões de som de corte do macho.

- As análises filogenéticas sugerem um grupo *bromeliae* monofilético, com as linhagens basais se caracterizando por espécies especializadas em *Solanum* e um clado generalista terminal, onde as espécies polífagas são as primeiras linhagens a divergirem, deixando na extremidade terminal as espécies oligófagas.

Perspectivas

As principais perspectivas deixadas por esta tese para trabalhos subseqüentes se referem ao aprofundamento da caracterização do cenário evolutivo do grupo *bromeliae*, apresentado na Figura 1, contemplando os seguintes itens:

- Completar a descrição taxonômica dos tipos III', IV' e VI.

- Caracterizar ultra-estruturalmente os ovos das espécies especialistas de *Solanum*, a fim de se verificar a aparente ausência ou redução dos filamentos respiratórios, e do tipo III', a fim de se investigar a presença da estrutura membranosa observada em sua espécie-irmã, o tipo III.

- Investigar o isolamento reprodutivo entre as espécies não analisadas, em especial entre as espécies-irmãs III e III'.

- Explorar mais detalhadamente o som de corte neste grupo, adicionando mais espécies e realizando análises mais minuciosas como de IPI (intervalo interpulso) e frequência.

- Inserir o tipo VI na análise comparativa, incluindo múltiplos marcadores, assim como outras espécies descritas no grupo (*D. aguape*, *D. speciosa* e *D. florae*), além de outras espécies possivelmente ainda não descobertas.

- Ampliar o registro de plantas hospedeiras das espécies setentrionais, a fim de se verificar empiricamente a amplitude de nicho destas espécies.

- Realizar um levantamento de grande cobertura e detalhamento sobre a distribuição geográfica de cada espécie, a fim de se estabelecer um panorama biogeográfico completo do grupo, reconhecendo possíveis áreas de simpatria ou, se for o caso, da extensão das áreas alopátricas.

- Aperfeiçoar a análise filogenética das espécies do grupo *bromeliae*, bem como sobre o posicionamento do subgênero *Phloridosa*, com a adição de seqüências nucleares, como *Amd* e *Ddc*, a fim de se estabelecer uma base filogenética robusta sobre a qual possam ser sobrepostas as informações morfológicas, ecológicas e biogeográficas de cada espécie, a fim de se estabelecer um cenário evolutivo detalhado, possibilitando a elucidação de eventos como a origem da especialização, a mudança de hospedeiro e potenciais processos de especiação geográfica ou ecológica.

Referências

- Araújo AM (2004) Spreading the evolutionary synthesis: Theodosius Dobzhansky and genetics in Brazil. *Genet Mol Biol* 27:467-475.
- Ashburner M (1981) Entomophagous and other Bizarre Drosophilidae. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson Jr. JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*, 3a. Academic Press, London, pp 395-429.
- Bächli G (2010) Taxodros – The database on taxonomy of Drosophilidae <http://www.taxodros.uzh.ch/> (March 10, 2010).
- Bächli G, Vilela CR, Escher SA, Saura A (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 39:1-362.
- Barbosa PM (2006) Utilização de flores de *Ipomoea* spp. (Convolvulaceae) como sítio de ovoposição de drosofilídeos. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética.
- Barker JSF (2005) Population structure and host-plant specialization in two *Scaptodrosophila* flower-breeding species. *Heredity* 94:129-138.
- Bizzo L, Gottschalk MS, De Toni DC, Hofmann PRP (2009) Seasonal dynamics of a drosophilid assemblage and its potential as bioindicators in open environments. *Iheringia Ser Zool* 99, no prelo.
- Blanchard EE (1938) Descripciones y anotaciones de dípteros argentinos. *An Soc Cient Argent* 126:345-386.
- Blauth ML, Gottschalk MS (2007) A novel record of Drosophilidae species in the Cerrado biome of the state of Mato Grosso, west-central Brazil. *Drosoph Inf Serv* 90:90-96.
- Blaxter M (2003) Molecular systematics: Counting angels with DNA. *Nature* 421:122-124.
- Bock IR (1976) Drosophilidae of Australia. I. *Drosophila* (Insecta: Diptera). *Aust J Zool Suppl Ser* 40:1-105.
- Bock IR, Parsons PA (1981) Species of Australia and New Zealand. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds). *The Genetics and Biology of Drosophila*, 3a. Academic Press, London, pp 291-308.
- Bono JM, Markow TA (2009) Post-zygotic isolation in cactophilic *Drosophila*: larval viability and adult life-history traits of *D. mojavensis*/*D. arizonae* hybrids. *J Evol Biol* 22:1387-1395.
- Breitmeyer CM, Markow TA (1998) Resource availability and population size in cactophilic *Drosophila*. *Funct Ecol* 12:14-21.
- Brcic D (1962a) Chromosomal structure of populations of *Drosophila flavopilosa* studied in larvae collected in their natural breeding sites. *Chromosoma* 13:183-195.
- Brcic D (1962b) New Chilean species of the genus *Drosophila*. *Biologica (Santiago)* 33:3-6.
- Brcic D (1966) Ecological and cytogenetical studies of *Drosophila flavopilosa*, a Neotropical species living in *Cestrum* flowers. *Evolution* 20:16-29.
- Brcic D (1967) Chromosomal polymorphism in an ecologically restricted species of *Drosophila*

living in Chile. Cienc Cult 19:45-53.

Brcic D (1968) The effects of temperature on chromosomal polymorphism of *Drosophila flavopilosa* larvae. Genetics 59:427-432.

Brcic D (1972) Seasonal fluctuations of inversion polymorphism in *Drosophila flavopilosa* and the relationships with certain ecological factors. Univ Texas Publs 7213:103-116.

Brcic D (1978) A note on the *flavopilosa* group of species of *Drosophila* in Rio Grande do Sul, Brazil, with description of two new species (Diptera, Drosophilidae). Rev Bras Biol 38:647-651.

Brcic D (1983) Ecology of flower-breeding *Drosophila*. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson Jr. JN (eds) The genetics and biology of *Drosophila*, 3a. Academic Press, London, pp 333-382.

Brcic D, Napp M (1980) Allozyme and inversion polymorphisms in Chilean natural populations of *Drosophila flavopilosa*. Braz J Genet 7:21-39.

Brown BV (2005) Malaise trap catches and the crisis in Neotropical dipterology. Am Entomol 51:180-183.

Budnik M, Brcic D, Acuña M (1988) Geographical and sexual variation of wing size in the monophagous flower-breeding species *Drosophila flavopilosa*. Zool Syst Evol 26:211-216.

Butler DR, Mettler LE (1963). Ecological and cytological notes on *Drosophila sigmoides*. Drosoph Inf Serv 38:70.

Carson HL (1971) The ecology of *Drosophila* breeding sites. Harold L. Lyon Arboretum Lecture 2. University of Hawaii Press, Honolulu, 28 pp.

Carson HL (2001) Danko Brcic and the flower-flies. Rev Chil Hist Nat 74:33-38.

Carson HL, Okada T (1980) Drosophilidae associated with flowers in Papua New Guinea. I. *Colocasia esculenta*. Kontyû 48:15-29.

Castrezana SJ, Markow TA (2008) Sexual isolation and mating propensity among allopatric *Drosophila mettleri* populations. Behav Genet 38:437-445.

Chassagnard MT, Tsacas L (1992) *Drosophila (Phloridosa) lutzii* Sturtevant (Diptera: Drosophilidae), especie antofila de Mexico. Folia Entomol Mex 85:95-105.

Chassagnard MT, Tsacas L, Lachaise D (1997) Drosophilidae (Diptera) of Malawi. Ann Natal Mus 38:61-131.

Chaves NB, Tidon R (2008) Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. Rev Bras Entomol 52:340-348.

Clayton FE, Wasserman M (1957) Chromosomal studies of several species of *Drosophila*. Univ Texas Publs 5721:125-131.

Cook RM, Parsons PA, Bock IR (1977) Australian endemic *Drosophila*. II. A new *Hibiscus*-breeding species with its description. Aust J Zool 25:755-763.

- Coyne JA, Kim SY, Chang AS, Lachaise D, Elwyn S, Susannah JF (2002) Sexual isolation between two sibling species with overlapping ranges: *Drosophila santomea* and *Drosophila yakuba*. *Evolution*, 56:2424-2434.
- Da Lage J-L, Kergoat GJ, Maczkowiak F, Silvain J-F, Cariou M-L, Lachaise D (2007) A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. *J Zool Syst Evol Res* 45:47-63.
- David J (1973) Toxicité de faibles concentrations d'alcool éthylique pour une espèce tropicale de Drosophile: *Drosophila bromeliae* Sturtevant. *C R Acad Sci* 277:2235-2238.
- David JR, Lemeunier F, Tsacas L, Yassin A (2007) The historical discovery of the nine species in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Genetics* 177:1969-1973.
- de Meijere JCH (1914) Studien über südostasiatische Dipteren. IX. *Tijdschr Entomol* 57:137-275.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1905-1916.
- De Toni DC, Hofmann PRP (1995) Preliminary taxonomic survey of the genus *Drosophila* at Morro da Lagoa da Conceição, Santa Catarina Island, Brazil. *Rev Bras Biol* 55:347-350.
- De Toni DC, Hofmann PRP, Valente VLS (2001) First record of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Biotemas* 14:71-85.
- De Toni DC, Gottschalk MS, Cordeiro J, Hofmann PPR, Valente VLS (2007) Study of the Drosophilidae (Diptera) communities on Atlantic Forest islands of Santa Catarina state, Brazil. *Neotrop Entomol* 36:356-375.
- Döge JS, Valente VLS, Hofmann PRP (2008) Drosophilids (Diptera) from an Atlantic Forest area in Santa Catarina, Southern Brazil. *Rev Bras Entomol* 52:615-624.
- Drosophila* 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-218.
- Duda O (1923) Die orientalischen und australischen Drosophiliden-Arten (Dipteren) des Ungarischen National-Museums zu Budapest. *Ann Mus Nat Hung* 20:24-59.
- Duda O (1924) Die Drosophiliden (Dipteren) des Deutschen Entomologischen Institutes der Kaiser Wilhelm-Gesellschaft (früheres Deutsches Entomologisches Museum) aus H. Sauter's Ausbeute. *Arch Mecklenb Naturf* 90:235-259.
- Duda O (1927) Die südamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter Berücksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen Arten. *Arch Naturgesch* 91:1-228.
- Ebach MC, Holdrege C (2005) DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434:697.
- Fanara JJ, Hasson E (2001) Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution* 55:2615-2619.
- Franco FF, Prado PRR, Sene FM, Costa LF, Manfrin MH (2006) Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related cactophilic species of *Drosophila* (Diptera; Drosophilidae) in South America. *An Acad Bras Cienc* 78:203-212.

- Frèzal L, Leblois R (2008) For years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol* 8:727-736.
- Frota-Pessoa O (1952) Flower-feeding Drosophilidae. *Drosoph Inf Serv* 26:101-102.
- Gao J, Watabe H, Aotsuka T, Pang J, Zhang Y (2007) Molecular phylogeny of the *Drosophila obscura* species group, with emphasis on the Old World species. *BMC Evol Biol* 7:87-98.
- Gleason JM, Caccone A, Moriyama EN, White KP, Powell JR (1997) Mitochondrial DNA phylogenies for the *Drosophila obscura* group. *Evolution* 51:433-440.
- Goñi B, Martinez ME, Valente VLS, Vilela CR (1998) Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. *Rev Bras Entomol* 42:131-140.
- Gottschalk MS, De Toni DC, Valente VLS, Hofmann PRP (2007) Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. *Neotrop Entomol* 36:848-862.
- Gottschalk MS, Döge JS, Profes MS, Hofmann PRP, Valente VLS (2009) Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. *Iheringia Ser Zool* 99:442-448.
- Graber H (1957) Afrikanische Drosophiliden als Blütenbesucher. *Zool Jahrb Syst* 85:305-316.
- Grimaldi DA (1987) Phylogenetics and taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). *Bull Am Mus Nat Hist* 186:103-268.
- Grimaldi DA (1990) A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bull Am Mus Nat Hist* 197:103-268.
- Grimaldi D, Nguyen T (1999) Monograph on the spittlebug flies, genus *Cladochaeta* (Diptera: Drosophilidae: Cladochaetini). *Bull Am Mus Nat Hist* 241:1-326.
- Grimaldi DA, Ervik F, Bernal R (2003) Two new Neotropical genera of Drosophilidae (Diptera) visiting palm flowers. *J Kans Entomol Soc* 76:109-124.
- Hardy DE (1982) *Drosophila (Phloridosa) floricola* Sturtevant. *Proc Hawaii Entomol Soc* 24:7.
- Hatadani LM, McInermey JO, Medeiros HF, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AM, Klaczko LB (2009) Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* 51: 595-600.
- Hebert PDN, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol* 54:852-859.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313-321.
- Hebert PDN, deWaard JR, Landry J-F (2009) DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol Lett* DOI 10.1098/rsbl.2009.0848.
- Heed WB (1956) Apuntes sobre la ecología y la dispersión de los Drosophilidae (Diptera) de El Salvador. *Comun Inst Trop Invest Cient* 5:59-74.
- Heed WB (1957) Ecological and distributional notes on Drosophilidae (Diptera) of El Salvador.

Univ Texas Publs 5721:62-78.

- Heed WB, Mangan RL (1986) Community ecology of the Sonoran Desert *Drosophila*. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds) The genetics and biology of *Drosophila*, 3e. Academic Press, London, pp 311-345.
- Heed WB, Wheeler MR (1957) Thirteen new species in the genus *Drosophila* from the Neotropical region. Univ Texas Publs 5721:17-38.
- Heed WB, Carson HL, Carson MS (1960) A list of flowers utilized by drosophilids in the Bogota region of Colombia. Drosoph Inf Serv 34:84-85.
- Hirai Y, Kimura MT (1997) Incipient reproductive isolation between two morphs of *Drosophila elegans* (Diptera: Drosophilidae). Biol J Linn Soc Lond 61:501-513.
- Hirai Y, Sasaki H, Kimura MT (1999) Copulation duration and its genetic control in *Drosophila elegans*. Zool Sci 16:211-214.
- Hofmann PRP, Napp M (1984) Genetic-environmental relationships in *Drosophila incompta*, a species of restricted ecology. Braz J Genet 7:21-39.
- Hunter AS (1979) New anthophilic *Drosophila* of Colombia. Ann Entomol Soc Am 72:372-383.
- Hunter AS (1988) High altitude flower-breeding *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). Pan-Pac Entomol 64:299-312.
- Hunter AS (1992) Flower-breeding *Drosophila* of Bogota, Colombia: new species (Diptera: Drosophilidae). Pan-Pac Entomol 68: 192-199.
- Hurtado LA, Erez T, Castrezana S, Markow TA (2004) Contrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric Sonoran Desert cactophilic *Drosophila*. Mol Ecol 13:1365-1375.
- Ishii K, Hirai Y, Katagiri C, Kimura MT (2001) Sexual isolation and cuticular hydrocarbons in *Drosophila elegans*. Heredity 87:392-399.
- Ishii K, Hirai Y, Katagiri C, Kimura MT (2002) Mate discrimination and cuticular hydrocarbons in *Drosophila elegans* and *D. gunungcola*. Zool Sci 19:1191-1196.
- Katoh T, Tamura K, Aotsuka T (2000) Phylogenetic position of the subgenus *Lordiphosa* of the genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) inferred from alcohol dehydrogenase (*Adh*) gene sequences. J Mol Evol 51:122-130.
- Kimura MT, Hirai Y (2001) Daily activity and territoriality of *Drosophila elegans* in Sukarami, West Sumatra, Indonesia. Tropics 10:489-495.
- Kwiatowski J, Ayala FJ (1999) Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. Mol Phylogenet Evol 13:319-328.
- Lachaise D, Tsacas L (1983) Breeding-sites in tropical African drosophilids. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds) The Genetics and Biology of *Drosophila*, 3a. Academic Press, London, pp 221-332.
- Lachaise D, Harry M, Solignac M, Lemeunier F, Benassi V, Cariou ML (2000) Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from Sao

Tome. Proc Biol Sci 267:1487-1495.

Lachance M-A, Bowles JM, Kwon S, Marinoni G, Starmer WT, Janzen DH (2001) *Metschnikowia lochheadii* and *Metschnikowia drosophilae*, two new yeast species isolated from insects associated with flowers. Can J Microbiol 47:103-109.

Magnacca KN, Foote D, O'Grady PM (2008) A review of the endemic Hawaiian Drosophilidae and their host plants. Zootaxa 1728:1-58.

Malloch JR (1924) Notes on Australian Diptera. No. IV. Proc Linn Soc N S W 49:348-359.

Malogolowkin C (1951) Drosofilídeos colhidos na Bahia, com descrição de uma espécie nova (Diptera). Rev Bras Biol 11:431-434.

Malogolowkin C (1952). Notas sobre *Zygothrica dispar* (Diptera, Drosophilidae). Rev Bras Biol 12:455-457.

Manfrin MH, Sene FM (2006) Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. Genetica 126:57-75.

Matzkin LM, Watts TD, Bitler BG, Machado CA, Markow TA (2006) Functional genomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. Mol Ecol 15:4635-4643.

McBride CS, Arguello JR, O'Meara BC (2007) Five *Drosophila* genomes reveal nonneutral evolution and the signature of host specialization in the chemoreceptor superfamily. Genetics 177:1395-1416.

McEvey SF, Barker JSF (2001) *Scaptodrosophila aclinata*: a new *Hibiscus* flower-breeding species related to *S. hibisci* (Diptera: Drosophilidae). Rec Aust Mus 53:255-262.

McEvey SF, Aulard S, Ralisoa-Randrianasolo O (1989) An Australian drosophilid (Diptera) on *Eucalyptus* and *Eugenia* (Myrtaceae) flowers in Madagascar. J Aust Ent Soc 28:53-54.

Miyake T, Yafuso M (2003) Floral scents affect reproductive success in fly-pollinated *Alocasia odora* (Araceae). Am J Bot 90:370-376.

Montague JR (1984) The ecology of Hawaiian flower-breeding Drosophilids. I. Selection in the larval habitat. Am Nat 124:712-722.

Montague JR (1989) The ecology of Hawaiian flower-breeding Drosophilids. II. Adult dispersions and reproductive ecology. Am Nat 133:71-82.

Montague JR, Kaneshiro KY (1982) Flower-breeding species of Hawaiian Drosophilids in an early stage of sympatry. Pacif Ins 24:209-213.

Moraes EM, Sene FM (2002) Breeding structure of an isolated cactophilic *Drosophila* population on a sandstone table hill. J Zool Syst Evol Res 40:123-128.

Moraes EM, Spressola VL, Prado PRR, Costa LF, Sene FM (2004) Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. J Zool Syst Evol Res 42:154-158.

Moraes EM, Yotoko KSC, Manfrin MH, Solferini VN, Sene FM (2009) Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. J Biogeogr 36:2136-2147.

- Mori Y, Okada H (2001) Reproductive biology and pollen flow of a rheophytic aroid, *Furtadoa sumatrensis* (Araceae) in the Malesian wet tropics. *Plant Syst Evol* 227:37-47.
- O'Grady PM (1999) Reevaluation of phylogeny in the *Drosophila obscura* species group based on combined analysis of nucleotide sequences. *Mol Phylogenet Evol* 12:124-139.
- O'Grady PM, Kidwell MG (2002) Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. *Mol Phylogenet Evol* 22:442-453.
- Okada T (1980) Synhospitolic evolution of the genus *Drosophilella* Duda (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of a new species from Okinawa and Taiwan. *Kontyû* 48:218-225.
- Okada T (1986) Estimation of the routes of synhospitolic distribution of the genus *Drosophilella* Duda (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of three new species from Malaysia and Indonesia. *Proc Jap Soc Syst Zool* 33:32-39.
- Okada T (1988) Taxonomic note on *Colocasiomyia cristata* de Meijere (Diptera, Drosophilidae) with generic synonymy. *Proc Jap Soc Syst Zool* 37:34-39.
- Okada T (1990) Subdivision of the genus *Colocasiomyia* de Meijere (Diptera, Drosophilidae) with descriptions of two new species from Sulawesi and note on color adaptation of synhospitolic species. *Proc Jap Soc Syst Zool* 42:66-72.
- Okada T, Carson HL (1980) Drosophilidae associated with flowers in Papua New Guinea. II. Alocasia (Araceae). *Pacif Ins* 22:217-236.
- Okada T, Carson HL (1982a) Drosophilidae associated with flowers in Papua New Guinea. IV. Araceae, Compositae, Convolvulaceae, Leguminosae, Malvaceae, Rubiaceae. *Kontyû* 50:511-526.
- Okada T, Carson HL (1982b) Drosophilidae associated with flowers in Papua New Guinea. III. Zingiberales. *Kontyû* 50:396-410.
- Okada T, Yafuso M (1989) The genus *Colocasiomyia* Duda (Diptera, Drosophilidae) from Sulawesi. *Proc Jap Soc Syst Zool* 39:48-55.
- Patterson JT, Mainland GB (1944) The Drosophilidae of Mexico. *Univ Texas Publs* 4445:9-101.
- Patterson JT, Stone WS (1952) Evolution in the genus *Drosophila*. Macmillan, New York, 610 pp.
- Pavan C, Cunha AB (1947) Espécies brasileiras de *Drosophila*. *Bolm Fac. Filos. Cienc. S. Paulo* 86:20-64.
- Pavan C, Cunha AB (2003) Theodosius Dobzhansky and the development of Genetics in Brazil. *Genet Mol Biol* 26:387-395.
- Pélandakis M, Solignac M (1993) Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol* 37:525-543.
- Perlman SJ, Spicer GS, Shoemaker DD, Jaenike J (2003) Associations between mycophagous *Drosophila* and their *Howardula* nematode parasites: a worldwide phylogenetic shuffle. *Mol Ecol* 12:237-249.
- Petersen JA (1960) Studies on the ecology of the genus *Drosophila*. I. Collections in two different

life zones and seasonal variations in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Biol* 20:3-16.

- Pfeiler E, Markow TA (2001) Ecology and population genetics of Sonoran Desert *Drosophila*. *Mol Ecol* 10:1787-1791.
- Pilares GLV, Suyo MP (1982). Distribution of different species of *Drosophila* from Peru (South America). *Drosoph Inf Serv* 58:122-124.
- Pipkin SB (1964) New flower breeding species of *Drosophila*. *Proc Entomol Soc Wash* 66:217-245.
- Pipkin SB (1966) A new flower-feeding species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Proc Entomol Soc Wash* 68:4-5.
- Pipkin SB, Rodríguez RL, León J (1966) Plant host specificity among flower-feeding neotropical *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Am Nat* 100:135-155.
- Polak M, Starmer WT, Barker JSF (1998) A mating plug and male mate choice in *Drosophila hibisci* Bock. *Animal Behaviour* 56:919-926.
- Polak M, Wolf LL, Starmer WT, Barker JSF (2001) Function of the mating plug in *Drosophila hibisci* Bock. *Behav Ecol Sociobiol* 49:196-205.
- Powell JR (1997) Progress and Prospects in Evolutionary Biology. The *Drosophila* Model. Oxford University Press, New York, 562 pp.
- Prakash HS, Sreerama Reddy G (1979) *Drosophila* fauna of Sahyadri Hills (Western Ghats) with description of a new species. *Proc Indian Natl Sci Acad B Biol Sci* 88B: 65-72.
- Remsen J, DeSalle R (1998) Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. *Mol Phylogenet Evol* 9:225-235.
- Remsen J, O'Grady P (2002) Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. *Mol Phylogenet Evol* 24:249-264.
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M, Loreto ELS (2005) Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. *Mol Phylogenet Evol* 36:623-640.
- Robe LJ, Loreto ELS, Valente VLS (2010) Radiation of the "*Drosophila*" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *J Zool Syst Evol Res* doi: 10.1111/j.1439-0469.2009.00563.x
- Roque F, Tidon R (2008) Eight new records of drosophilids (Insecta; Diptera) in the Brazilian savanna. *Drosoph Inf Serv* 91:94-98.
- Ruiz A, Cansian AM, Kuhn GCS, Alves MAR, Sene FM (2000) The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. *Genetica* 108:217-227.
- Ruiz-Linares A, Hancock JM, Dover GA (1991) Secondary structure constraints on the evolution of *Drosophila* 28S ribosomal RNA expansion segments. *J Mol Biol* 219:381-390.
- Russo CAM, Takezaki N, Nei M (1995) Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol Biol Evol* 12: 391-404.
- Sakai, S (2002) *Aristolochia* spp. (Aristolochiaceae) pollinated by flies breeding on decomposing flowers in Panama. *Am J Bot* 89:527-534.

- Santos RCO, Vilela CR (2005) Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). Rev Bras Entomol, 49:544-551.
- Sawamura K, Tomaru M (2002) Biology of reproductive isolation in *Drosophila*: toward a better understanding of speciation. Popul Ecol 44:209-219.
- Schmitz HJ, Hofmann PRP (2005) First record of subgenus *Phloridosa* of *Drosophila* in southern Brazil, with notes on breeding sites. Drosoph Inf Serv 88:97-101.
- Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP (2007) Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, southern Brazil. Neotrop Entomol 36:53-64.
- Sepel LMN, Golombieski RM, Napp M, Loreto ELS (2000) Seasonal fluctuations of *D. cestri* and *D. incompta*, two species of *flavopilosa* group. Drosoph Inf Serv 83:122-126.
- Silva AAR, Martins MB (2004) A new anthophilic species of *Drosophila* Fallén belonging to the *bromeliae* group of species (Diptera, Drosophilidae). Rev Bras Zool 21:435-437.
- Silva AFG, Sene FM (1991) Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). Rev Bras Entomol 35:455-468.
- Silva-Bernardi ECC, Morales AC, Sene FM, Manfrin MH (2006) Phylogentic relationships in the *Drosophila fasciola* species subgroup (Diptera, Drosophilidae) inferred from partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene. Genet Mol Biol 29:566-571.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylonetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am 87:651-701.
- Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ, Hasson E (2007) Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. BMC Evol Biol 7:77-88.
- Starmer WT, Bowles JM (1994) The spatial distribution of endemic and introduced flower-breeding species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) during their early history of encounter on the islands of Hawaii. Pan-Pac Entomol 70:230-239.
- Starmer WT, Wolf LL, Barker JSF, Bowles JM, Lachance M (1997) Reproductive characteristics of the flower breeding *Drosophila hibisci* Bock (Drosophilidae) along a latitudinal gradient in eastern Australia: relation to flower and habitat features. Biol J Linn Soc 62:459-473.
- Starmer WT, Polak M, Wolf LL, Barker JSF (1998) Reproductive characteristics of the flower breeding *Drosophila hibisci* Bock (Drosophilidae) in eastern Australia: genetic and environmental determinants of ovariole number. Evolution 52:806-815.
- Starmer WT, Polak M, Wolf LL, Barker JSF (2000) Reproductive characteristics of the flower breeding *Drosophila hibisci* Bock (Drosophilidae) in eastern Australia: within-population genetic determinants of ovariole number. Heredity 84:90-96.
- Sturtevant AH (1916) Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. Ann Entomol Soc Am 9:323-343.

- Sturtevant AH (1921) The North American species of *Drosophila*. Carn Inst Wash Publ 301:1-150.
- Sturtevant AH (1942) The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. Univ Texas Publs 4213:5-51.
- Sultana F, Kimura MT, Toda M (1999) Anthophilic *Drosophila* of the *elegans* species-subgroup from Indonesia, with description of a new species (Diptera: Drosophilidae). Entomol Sci 2:121-126.
- Sultana F, Hu YG, Toda MJ, Takenaka K, Yafuso M (2006) Phylogeny and classification of *Colocasiomyia* (Diptera, Drosophilidae), and its evolution of pollination mutualism with aroid plants. Syst Entomol 31:684-702.
- Suwito A, Ishida TA, Hattori K, Kimura MT (2002) Environmental adaptations of two flower breeding species of *Drosophila* from Java, Indonesia. Entomol Sci 5:399-406.
- Takenaka K, Yin JT, Wen SY, Toda MJ (2006) Pollination mutualism between a new species of the genus *Colocasiomyia* de Meijere (Diptera: Drosophilidae) and *Steudnera colocasiifolia* (Araceae) in Yunnan, China. Entomol Sci 9:79-91.
- Tatarenkov A, Ayala FJ (2001) Phylogenetic relationships among species groups of the *virilis-repleta* radiation of *Drosophila*. Mol Phylogenet Evol 21:327-31.
- Tatarenkov A, Kwiatowski J, Skarecky D, Barrio E, Ayala FJ (1999) On the evolution of dopa decarboxylase (*Ddc*) and *Drosophila* systematics. J Mol Evol 48:445-462.
- Tatarenkov A, Zurovcova M, Ayala FJ, Peigler RS (2001) *Ddc* and *amd* sequences resolve phylogenetic relationships of *Drosophila*. Mol Phylogenet Evol 20:321-325.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol Evol 18:70-74.
- Throckmorton LH (1962) The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. Univ Texas Publs Stud Genet 2:207-343.
- Throckmorton LH (1975) The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. Handb Genet 3:421-469.
- Tidon-Sklorz, R, Sene FM (2001) Two New Species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). Iheringia Ser Zool 90:141-146
- Toda MJ, Okada T (1983) Ecological studies of floricolous *Drosophilella* in Burma with description of three new species from Burma and the Philippines (Diptera, Drosophilidae). Kontyû 51:169-184.
- Tosi D, Martins M, Vilela CR, Pereira MAQR (1990) On a new cave-dwelling species of bat-guano-breeding *Drosophila* closely related to *D. repleta* Wollaston (Diptera, Drosophilidae). Braz J Genet 13:19-31.
- Tribe GD (1991) *Drosophila flavohirta* Malloch (Diptera: Drosophilidae) in *Eucalyptus* flowers: occurrence and parasites in eastern Australia and potential for biological control on *Eucalyptus grandis* in South Africa. J Aust Entomol Soc 30:257-262.
- Tsacas L, Chassagnard T (1992) Les relations Araceae-Drosophilidae. *Drosophila aracea* une espèce anthophile associée à l'aracée *Xanthosoma robustum* au Mexique (Diptera:

- Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr* 28:421-439.
- Tsacas L, Chassagnard MT, David, JR (1988) Un nouveau groupe d'espèces afrotropicales anthophiles dans le sous-genre *Scaptodrosophila* du genre *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr* 24:181-202.
- Val FC (1982) The male genitalia of some Neotropical *Drosophila*: notes and illustrations. *Pap Avul Zool* 34:309-347.
- Val FC, Marques MD (1996) Drosophilidae (Diptera) from the *Pantanal* of Mato Grosso (Brazil), with the description of a new species belonging to the *bromeliae* group of the genus *Drosophila*. *Pap Av Zool* 39:223-230.
- van der Linde K, Houle D (2008) A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and closely related genera (Diptera, Drosophilidae) *Insect Syst Evol* 39:241-268.
- van Klinken RD, Walter GH (2001) Larval hosts of Australian Drosophilidae (Diptera): a field survey in subtropical and tropical Australia. *J Trop Ecol* 40:163-179.
- Vilela CR (1984a) Occurrence of the *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) in the state of São Paulo (Brazil) with description of one new species. *Rev Bras Zool* 2:63-69.
- Vilela CR (1984b) Notes on the holotypes of four Neotropical species of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) described by A.H.Sturtevant. *Rev Bras Entomol* 28:245-256.
- Vilela CR (1986) The type-series of *Drosophila denieri* Blanchard (Diptera, Drosophilidae). *Rev Bras Entomol* 30:223-226.
- Vilela CR, Bächli G (1990) Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt Schweiz Ent Ges* 63:1-332.
- Vilela CR, Bächli G (2000) Morphological and ecological notes on the two species of *Drosophila* belonging to the subgenus *Siphlodora* Patterson & Mainland, 1944 (Diptera, Drosophilidae). *Mitt Schweiz Ent Ges* 73:23-47.
- Vilela CR, Bächli G (2002a) Two new North American *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae). *Mitt Schweiz Ent Ges* 75:211-221.
- Vilela CR, Bächli G (2002b) On the identity of four poorly known species of neotropical Drosophilidae (Diptera). *Mitt Schweiz Ent Ges* 75:197-210.
- Vilela CR, Mori L (1999) The genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the Serra do Cipó: further notes. *Rev Bras Entomol* 43:319-128.
- Vilela CR, Pereira MAQR (1992) Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). *Rev Bras Entomol* 36:475-482.
- Ward BL, Starmer WT, Russel JS, Heed WB (1975) The correlation of climate and host plant morphology with a geographic gradient of an inversion polymorphism in *Drosophila pachea*. *Evolution* 28:565-575.
- Wheeler MR (1956) *Zapriothrica*, a new genus based upon *Sigaloessa dispar* Schiner, 1868 (Diptera, Drosophilidae). *Proc Entomol Soc Wash* 58:113-115.

- Wheeler MR (1957) Taxonomic and distributional studies of Nearctic and Neotropical Drosophilidae. Univ Texas Publs 5721:79-114.
- Wheeler MR (1959) Three new species of *Zaprionus* Wheeler (Diptera, Drosophilidae). Southwest Nat 4:83-87.
- Wheeler MR (1968) Some remarkable new species of Neotropical Drosophilidae. Univ Texas Publs Stud Genet 4:431-442.
- Whiteman NK, Pierce NE (2008) Delicious poison: genetics of *Drosophila* host plant preference. Trends Ecol Evol 23:473-478.
- Will KW, Rubinoff D (2004) Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. Cladistics 20:47-55.
- Wilson ACC, Sunnucks P, Barker JSF (2002) Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite loci for *Scaptodrosophila hibisci*. Mol Ecol Notes 2:242-244.
- Wilson AC, Sunnucks P, Bedo DG, Barker JS (2006) Microsatellites reveal male recombination and neo-sex chromosome formation in *Scaptodrosophila hibisci* (Drosophilidae). Genet Res 87:33-43.
- Wolf LL, Polak M, Barker JSF, Bowles J, Starmer WT (2000a) Reproductive characteristics of *Drosophila hibisci* in the Northern Territory, Australia. Biol J Linn Soc Lond 71:549-562.
- Wolf LL, Starmer WT, Polak M, Barker JS (2000b) Genetic architecture of a wing size measure in *Drosophila hibisci* from two populations in eastern Australia. Heredity 85:521-529.
- Yafuso M, Okada T (1990) Complicated routes of the synhospitalic pairs of the genus *Colocasiomyia* in Java, with descriptions of two new species (Diptera, Drosophilidae). Esakia 1:137-150.
- Yafuso M, Toda MJ, Sembel DT (2008) *Arengomyia*, new genus for the *Colocasiomyia arenga* species group (Diptera: Drosophilidae), with description of a new species. Entomol Sci 11:391-400.
- Yassin A, Capy P, Madi-Ravazzi L, Ogereau D, David JR (2008) DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. Mol Ecol Resour 8:491-501.
- Yeh SD, Liou SR, True JR (2006) Genetics of divergence in male wing pigmentation and courtship behavior between *Drosophila elegans* and *D. gunungcola*. Heredity 96:383-395.
- Yotoko KSC, Medeiros HF, Solferini VN, Klaczko LB (2003) A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. Mol Phylogenet Evol 28:614-619.

ANEXOS

ANEXO 1

Meio de Cultura com Ágar e Banana

Misturar:

- 640mL de água destilada
- 24g de farinha de centeio
- 22g de fermento biológico seco
- 6g de ágar ágar especial em pó
- 2 g de metilparabeno

Ferver duas vezes no microondas.

Misturar no liquidificador:

- 110g de banana
- 38g de glucose de milho
- 160mL de água

Acrescentar à mistura inicial e ferver três vezes.

ANEXO 2

Meio de Oviposição

Misturar:

- 100mL de água destilada
 - 1,5g de ágar ágar especial em pó
 - 15g de mel
 - 10g de fermento biológico fresco
 - corante alimentício vermelho Ponceau até ficar bem vermelho.
- Ferver uma vez e acrescentar 0,3mL de ácido propiônico, misturando.

ANEXO 3

Preparação de Amostras para Microscopia Eletrônica (fornecido pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS)

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA MEV:

Para obtermos boas imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura, devemos primeiro saber um pouco sobre a preparação dessas amostras.

A etapa mais importante neste processo é a fixação, é a primeira etapa, é quando se deixa principalmente a superfície do material o mais resistente possível.

O fixador ideal para Microscopia Eletrônica de Varredura ou Transmissão é aquele que contém na fórmula o Glutaraldeído. A escolha do fixador dependerá do pesquisador, do tipo de material que ele está trabalhando, do tipo de técnica que usará para alcançar seus propósitos.

O fixador faz com que o material fique exatamente como estava na forma viva, também deixará o tecido mais rígido, para que quando a amostra receba o feixe de elétrons ou passe pelo aparelho de “ponto crítico” por exemplo, não ocorram danos na superfície, que para MEV é o que interessa.

Após a fixação o material é lavado em uma solução tampão, que serve para retirar o excesso de fixador. Após então, será desidratado de uma maneira lenta e gradual. Na etapa em que o desidratante está puro (100%) podemos então levar as amostras para o aparelho de Ponto Crítico.

Dicas:

- Para uma boa fixação o volume de fixador deve ser mais ou menos 5X o volume da peça.
- Ao manusear as peças procure tocá-las o mínimo possível, use de preferência um pincel que não solte pêlos ou uma pinça, sempre delicadamente.
- Quanto menor e mais plana a peça, melhor será a sua visualização ao MEV. Se for preciso diminuir ou limpar o seu material, faça isso de preferência na terceira lavagem do Glutaraldeído.
- As amostras depois de prontas devem ser mantidas longe de pó e principalmente de umidade. Utilize um dessecador para guardá-las ou uma caixa com sílica.

PROTOCOLO BÁSICO :

FIXAÇÃO:

Glutaraldeído_ 25% ----- 1,2ml

Tampão Fosfato 0,2M ----- 5,0ml

H₂O destilada ----- 3,8ml

- A Fixação do material, por imersão, deve ser feita imediatamente após a coleta. O período de fixação varia conforme a amostra. Sugere-se de no mínimo uma semana.

LAVAGEM:

Tampão Fosfato 0,2M + H₂O destilada Proporção de 1:1

- O material deve passar por 3 lavagens (30min./cada).

DESIDRATAÇÃO:

Acetona 30% ----- 10min.

Acetona 50% ----- 10min.

Acetona 70% ----- 10min.

Acetona 90% ----- 10min.

Acetona 90% ----- 20min.

Acetona 100% ----- 10min.

Acetona 100% ----- 20min.

DESSECAÇÃO:

- No aparelho de Ponto Crítico, seguir exatamente o que diz o manual. Para se obter principalmente uma boa imagem ao Microscópio, esta etapa é de suma importância. Caso não tenha experiência com o equipamento peça auxílio ao técnico responsável.

No CME utilizamos um CRITICAL POINT DRYER da BALZERS CPD030.

Após o Ponto Crítico as peças deverão ser colocadas no Stub, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização do ponto ou área de interesse, peça ajuda ao técnico para orientação na escolha do Stub.

METALIZAÇÃO:

- Esta etapa é feita na Metalizadora, tornamos o material condutivo por meio de deposição de um metal sobre a amostra. No CME temos alvo de Ouro e de Platina. Para uma boa cobertura deve-se seguir exatamente o que diz o manual, caso não tenha experiência com o equipamento peça auxílio ao técnico responsável.

No CME utilizamos um SPUTTER COATER da BALZERS SCD050.

ANEXO 4

Extração de DNA (para ~10 moscas)

Tampão de extração
(para 100mL):

5mL Tris 8,0 1M
4mL EDTA ph 8,0 0,5M
6,43g NaCl
1,69g LiCl
1g CTAB
2g PVP 40
0,5mL Tween 20
Completar para 100mL com água deionizada)
Autoclavar

- Macerar uma mosca em nitrogênio líquido
- Adicionar 600µl de tampão de extração e misturar
- Adicionar 1,2µl de β-mercaptoetanol
- Incubar a 60°C por 25 min e deixar resfriar em temperatura ambiente
- Adicionar 600µl de octanol:clorofórmio e misturar suavemente invertendo os tubos para formar uma emulsão durante 10 min
- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente
- Transferir a fase aquosa (~500µl) para um novo tubo
- (Fazer uma segunda extração octanol: clorofórmio caso a fase aquosa estiver turva devido ao PVPP)
- Adicionar 250µl de NaCl 5M na fase aquosa e misturar bem
- Dar um spin
- Adicionar ~750µl de isopropanol gelado (-20 °C) e refrigerar (4-6°C) por no mínimo 15-20 min até o DNA precipitar (até ficar visível, pode demorar mais de 1h)
- (Neste ponto é possível parar o protocolo e estocar a -20°C)
- Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente
- Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com etanol 76% gelado (0-4°C)
- Secar o *pellet* por 20-30 min a 37°C
- Dissolver em 30µl de TE ou água deionizada
- Tratar com 1µl de RNase a 10mg/mL para cada 100µl de solução e incubar a 50°C por 15 min (ou a 37°C por 1h)

ANEXO 5

Extração de DNA (para uma mosca)

- Triar uma mosca sem ácaros
- Macerar a mosca em nitrogênio líquido
- Adicionar 100µl de tampão de lise (Tris-HCl 0,1M; EDTA 0,1M; SDS 1%)
- Homogeneizar
- Adicionar 1µl de Proteinase K a 20ng/µl
- Deixar 1h a 65°C
- Colocar o tubo no gelo por 10 min
- Adicionar 13µl de acetato de potássio 8M e misturar bem
- Deixar no gelo por 30 min
- Centrifugar por 10 min (13.000 rpm)
- Retirar o sobrenadante, com cuidado para não sugar a camada de lipídeos na superfície nem o resto do macerado precipitado
- Adicionar 1V de fenol-clorofórmio 1:1 e homogeneizar
- Centrifugar por 10 min
- Recuperar o sobrenadante
- Adicionar 1V de clorofórmio e homogeneizar
- Centrifugar por 10 min
- Recuperar o sobrenadante
- Acrescentar 1V de isopropanol
- Deixar a temperatura ambiente por 15 min
- Centrifugar por 30 min
- Descartar o sobrenadante
- Adicionar etanol 70%
- Deixar 10 min no gelo
- Centrifugar 5 min
- Descartar etanol, retirando excesso com pipeta
- Secar em estufa a 37°C, de 30 a 40 min
- Ressuspender em TE ou água deionizada (~15µl)
- Deixar em geladeira *overnight*
- Aplicar µl de RNase
- Deixar em banho-maria a 37°C por 1h

ANEXO 6

Indivíduos utilizados para a análise de *barcode*

Localidade de origem de cada um dos espécimes utilizados para a análise de *barcoding*; espécimes provenientes de linhagens de laboratório estão indicados, junto com a respectiva localidade onde foram coletados os fundadores; demais espécimes são provenientes diretamente de campo. As seqüências serão submetidas ao *GenBank*.

Espécime	Origem
Grupo <i>bromeliae</i>	
<i>D. bromeliae</i>	
<i>Dbromeliae1</i>	Ilha Grand Cayman, Ilhas Cayman (linhagem)
<i>Dbromeliae2</i>	Ilha Grand Cayman, Ilhas Cayman (linhagem)
<i>Dbromeliae3</i>	Ilha Grand Cayman, Ilhas Cayman (linhagem)
<i>Dbromeliae4</i>	Ilha Grand Cayman, Ilhas Cayman (linhagem)
<i>D. bromelioides</i>	
<i>Dbromelioides1</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>Dbromelioides2</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>Dbromelioides3</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>Dbromelioides4</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>Dbromelioides5</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>Dbromelioides6</i>	Campus UFSC, Florianópolis, SC
<i>Dbromelioides7</i>	Centro, Antônio Carlos, SC
<i>Dbromelioides8</i>	Ilha de Ratoes Grande, Florianópolis, SC
<i>Dbromelioides9</i>	Ilha de Anhatomirim, Governador Celso Ramos, SC
<i>Dbromelioides10</i>	Parque do Lago, Guarapuava, PR
<i>Dbromelioides11</i>	Balneário dos Prazeres, Pelotas, RS
<i>Dbromelioides12</i>	Fragata, Pelotas, RS
Tipo III (<i>D. anaeterrae</i> sp. nov.)	
<i>III1</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>III2</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>III3</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>III4</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS (linhagem)
<i>III5</i>	Rachadel, Antônio Carlos, SC
<i>III6</i>	Rachadel, Antônio Carlos, SC

<i>III7</i>	Rachadel, Antônio Carlos, SC
<i>III8</i>	Rachadel, Antônio Carlos, SC
<i>III9</i>	Ponta Grossa, Porto Alegre, RS
<i>III10</i>	Ponta Grossa, Porto Alegre, RS
<i>III11</i>	Balneário dos Prazeres, Pelotas, RS

Tipo III'

<i>IIIR1</i>	Campus UFPE, Recife, PE (linhagem)
<i>IIIR2</i>	Campus UFPE, Recife, PE (linhagem)
<i>IIIR3</i>	Campus UFPE, Recife, PE (linhagem)
<i>IIIR4</i>	Campus UFPE, Recife, PE (linhagem)

Tipo IV (*D. solani* sp. nov.)

<i>IV1</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>IV2</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>IV3</i>	Córrego Grande, Florianópolis, SC
<i>IV4</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>IV5</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>IV6</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>IV8</i>	RS-122, Flores da Cunha, RS

Tipo IV'

<i>IVN1</i>	Centro, Monte Sião, MG
<i>IVN2</i>	Centro, Monte Sião, MG
<i>IVN3</i>	Centro, Monte Sião, MG
<i>IVN4</i>	Centro, Monte Sião, MG
<i>IVN5</i>	Centro, Monte Sião, MG
<i>IVN6</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>IVN7</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>IVN8</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>IVN9</i>	Rachadel, Antônio Carlos, SC
<i>IVN10</i>	Rachadel, Antônio Carlos, SC
<i>IVN11</i>	Águas Belas, São José dos Pinhais, PR
<i>IVN12</i>	Águas Belas, São José dos Pinhais, PR

Tipo V (*D. jurubeba* sp. nov.)

<i>V1</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
-----------	--

V2	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
V3	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
V4	Córrego Grande, Florianópolis, SC
V5	Córrego Grande, Florianópolis, SC
V6	Córrego Grande, Florianópolis, SC
V7	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
V8	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
V9	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
V10	Balneário dos Prazeres, Pelotas, RS
V11	Balneário dos Prazeres, Pelotas, RS

Subgênero *Phloridosa*

D. denieri

<i>Ddenieri1</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>Ddenieri2</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>Ddenieri3</i>	Centro, Antônio Carlos, SC
<i>Ddenieri4</i>	Centro, Antônio Carlos, SC
<i>Ddenieri5</i>	Centro, Antônio Carlos, SC
<i>Ddenieri6</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
<i>Ddenieri7</i>	Arroio Fragata, Pelotas, RS
<i>Ddenieri8</i>	Arroio Fragata, Pelotas, RS
<i>Ddenieri9</i>	Arroio Fragata, Pelotas, RS
<i>Ddenieri10</i>	Fragata, Pelotas, RS
<i>Ddenieri11</i>	Arroio Fragata, Pelotas, RS

D. lutzii

<i>Dlutzii1</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>Dlutzii2</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>Dlutzii3</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>Dlutzii4</i>	Morro do Cruzeiro, Águas de Lindóia, SP
<i>Dlutzii5</i>	Ilha de Anhatomirim, Governador Celso Ramos, SC
<i>Dlutzii6</i>	Campus UFSC, Florianópolis, SC
<i>Dlutzii7</i>	Parque do Lago, Guarapuava, PR
<i>Dlutzii8</i>	Parque do Lago, Guarapuava, PR
<i>Dlutzii9</i>	Marcopolo/BR-116, Caxias do Sul, RS

ANEXO 7

Indivíduos utilizados para a análise filogenética

Localidade de origem de cada um dos espécimes utilizados para a análise filogenética cujas seqüências foram obtidas nesta tese; em cada espécie, as seqüências de *COI* e *COII* foram obtidas a partir dos mesmos espécimes, ou pelo menos, da mesma linhagem, no caso de *D. bromeliae*, *D. bromelioides* e tipo III. As seqüências serão submetidas ao *GenBank*.

Espécie	Origem
Grupo <i>bromeliae</i>	
<i>D. bromeliae</i>	Ilha Grand Cayman, Ilhas Cayman
<i>D. bromelioides</i>	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
Tipo III (<i>D. anaeterrae</i> sp. nov.)	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
Tipo III'	Campus UFPE, Recife, PE
Tipo IV (<i>D. solani</i> sp. nov.)	Córrego Grande, Florianópolis, SC
Tipo IV'	Rachadel, Antônio Carlos, SC
Tipo V (<i>D. jurubeba</i> sp. nov.)	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS
Subgênero <i>Phloridosa</i>	
<i>D. denieri</i>	Centro, Antônio Carlos, SC
<i>D. lutzii</i>	Arroio Fragata, Pelotas, RS

ANEXO 8

Espécies utilizadas para as análises filogenéticas

Espécies utilizadas para as análises filogenéticas e números de acessos das seqüências obtidas no *GenBank*

Espécie	COI	COII
<i>Drosophila adunca</i>	EU493644	EU493773
<i>Drosophila affinis</i>	EU493629	GQ244451
<i>Drosophila ananassae</i>	genoma	AF474077
<i>Drosophila annulimana</i>	-	AY847756
<i>Drosophila araccataca</i>	DQ471599	EF468107
<i>Drosophila bandeirantorum</i>	EF569989	AY162991
<i>Drosophila brncici</i>	-	AY847757
<i>Drosophila bromeliae</i>	-	AF478418
<i>Drosophila busckii</i>	AF519411	AF519347
<i>Drosophila buzzatii</i>	AF146157	DQ202011
<i>Drosophila camargoi</i>	EU493578	EU493709
<i>Drosophila cardini</i>	EF569991	AY162974
<i>Drosophila cardinoides</i>	EF569992	AY162975
<i>Drosophila cestri</i>	LJ Robe	AY847758
<i>Drosophila ellisoni</i>	-	DQ202012
<i>Drosophila eohydei</i>	DQ471601	EU493736
<i>Drosophila funebris</i>	EU390731	EU493710
<i>Drosophila gasici</i>	-	AY847762
<i>Drosophila gaucha</i>	EU390733	AF478423
<i>Drosophila grimshawi</i>	genoma	genoma
<i>Drosophila griseolineata</i>	EF569995	AF478426
<i>Drosophila guaru</i>	EF569997	AY847763
<i>Drosophila guttifera</i>	EU493604	AF147119
<i>Drosophila hydei</i>	DQ471603	GQ376047
<i>Drosophila immigrans</i>	EU493586	EU493716
<i>Drosophila imparisetae</i>	EU493660	EU493789

<i>Drosophila incompta</i>	LJ Robe	AY847764
<i>Drosophila lacertosa</i>	DQ471590	EU493740
<i>Drosophila macroptera</i>	EU493597	EU493727
<i>Drosophila maculifrons</i>	EF569998	AY847766
<i>Drosophila mediopicta</i>	EF570000	AY847768
<i>Drosophila mediopunctata</i>	EF570001	AY162989
<i>Drosophila mediotriata</i>	EF570003	AY847767
<i>Drosophila melanica</i>	EU493611	EU390749
<i>Drosophila mercatorum</i>	DQ471607	DQ202028
<i>Drosophila mesophragmatica</i>	-	AY847769
<i>Drosophila mimica</i>	EU493664	EU493793
<i>Drosophila mojavensis</i>	genoma	genoma
<i>Drosophila mulleri</i>	DQ437708	DQ202032
<i>Drosophila multiciliata</i>	EU493665	EU493794
<i>Drosophila nannoptera</i>	DQ471531	EU493729
<i>Drosophila nappae</i>	EF570005	AY162983
<i>Drosophila nebulosa</i>	EU493640	EU493769
<i>Drosophila neocardini</i>	EF570006	AY847770
<i>Drosophila neocordata</i>	EU493636	AF045088
<i>Drosophila ornatifrons</i>	EF570009	AY162977
<i>Drosophila ornatipennis</i>	EU493573	EU493704
<i>Drosophila pachea</i>	AY533788	AF183969
<i>Drosophila pallidipennis</i>	AY162974	AY162981
<i>Drosophila paraguayensis</i>	EF570012	AY162986
<i>Drosophila paulistorum</i>	-	AF474100
<i>Drosophila pavani</i>	EU390732	AY847771
<i>Drosophila persimilis</i>	genoma	genoma
<i>Drosophila phalerata</i>	AF147105	AF147115
<i>Drosophila polychaeta</i>	DQ471555	AF478427
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	EU493633	AF519348
<i>Drosophila quinaria</i>	EU493605	AF478428
<i>Drosophila repleta</i>	DQ471533	GQ376044
<i>Drosophila repletoides</i>	-	EU161098

<i>Drosophila robusta</i>	AY750112	GQ244457
<i>Drosophila simulans</i>	M57909	GQ376045
<i>Drosophila sordidula</i>	AY750113	EU390759
<i>Drosophila sticta</i>	EF570018	EF570044
<i>Drosophila tripunctata</i>	EU493619	AF478432
<i>Drosophila viracochi</i>	-	AY847773
<i>Drosophila virilis</i>	DQ471577	GQ244459
<i>Drosophila waddingtoni</i>	EU493673	EU493803
<i>Drosophila willistoni</i>	genoma	AY335207
<i>Hirtodrosophila histrioides</i>	EU493815	AF519323
<i>Hirtodrosophila pictiventris</i>	-	AF478434
<i>Liodrosophila aerea</i>	-	AF478434
<i>Samoaia leonensis</i>	EU493683	EU493812
<i>Scaptodrosophila lebanonensis</i>	EU493686	EU493815
<i>Scaptomyza crassifemur</i>	EU493677	EU493806
<i>Scaptomyza palmae</i>	EU493680	EU493809
<i>Zaprionus indianus</i>	EF632372	AY847774
<i>Zaprionus tuberculatus</i>	EU493691	AF478440
<i>Zygothrica</i> sp3c	EU493692	EU493821
