

Bruna Emília Roman

Reconstrução filogenética do grupo *saltans* de *Drosophila*
utilizando marcadores morfológicos e moleculares

São José do Rio Preto

2018

Bruna Emília Roman

Reconstrução filogenética do grupo *saltans* de *Drosophila*
utilizando marcadores morfológicos e moleculares

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Madi Ravazzi

São José do Rio Preto

2018

Roman, Bruna Emília.

Reconstrução filogenética do grupo saltans de *Drosophila* utilizando marcadores morfológicos e moleculares / Bruna Emília Roman. -- São José do Rio Preto, 2018

78 f. : il., tabs.

Orientador: Lilian Madi Ravazzi

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. *Drosophila* - Filogenia. 3. Marcadores genéticos. 4. Microscopia eletrônica de varredura I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 591.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Emília Roman

Reconstrução filogenética do grupo *saltans* de *Drosophila*
utilizando marcadores morfológicos e moleculares

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Lilian Madi Ravazzi
UNESP São José do Rio Preto
Orientadora

Prof Dr. Diego José Santana Silva
UFMS Campo Grande

Prof^a Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
UNESP São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
05 de março de 2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para o término de mais uma etapa.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Brás e Néia, e à minha irmã Monique, por serem minha base, por tudo o que sou, por cada oração, pelo apoio fundamental e pela compreensão ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, por todo incentivo, paciência, confiança e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do IBILCE-UNESP, pela concessão de minha bolsa de Mestrado e por darem suporte ao presente trabalho.

À Direção da UNESP por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento do meu mestrado e aos funcionários por me auxiliarem sempre que necessário. Em especial, ao Tião pela disponibilidade e por toda ajuda com os meios de cultura.

Aos meus amigos do laboratório, Samara, Bruna, Segala, Gabriel, Larissa, Jéssica e Rafael por sempre me apoiarem e me ajudarem em momentos de dúvidas e dificuldades.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência e companheirismo.

Aos meus amigos da vida, por estarem sempre comigo.

Aos colaboradores e professores que ajudaram no esclarecimento de dúvidas neste meu caminhar.

E, por fim, agradeço a Deus!

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

RESUMO

A reconstrução filogenética é fundamental para o entendimento de muitos fenômenos evolutivos. A obtenção de árvores filogenéticas a partir da utilização de marcadores moleculares distintos aliada à análise de caracteres morfológicos torna-se imprescindível, pois ambas informações são muitas vezes complementares, aumentando a robustez das análises. As espécies do grupo *saltans* de *Drosophila* são amplamente distribuídas nas Américas do Sul, Central e do Norte e as informações a respeito da filogenia do grupo presentes na literatura apresentam incongruências. Assim, o presente trabalho teve por objetivo reconstruir a filogenia para as espécies do grupo *saltans*, utilizando 16 das 21 espécies que o constituem. O estudo foi realizado a partir da análise de 48 caracteres morfológicos da terminália masculina por microscopia eletrônica de varredura, e marcadores moleculares baseado nas análises dos genes *COI* e *COII*. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os critérios de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Uma árvore particionada foi realizada por meio do critério de Inferência Bayesiana para as três partições (morfológica, *COI*, *COII*). Os resultados obtidos indicaram o grupo *saltans* como monofilético. Em geral, as árvores suportaram as relações de parentesco das espécies dentro dos subgrupos *sturtevanti* e *elliptica*. O relacionamento do subgrupo *sturtevanti* foi estabelecido em dois clados irmãos, sendo um composto pelas espécies *D. sturtevanti* e *D. sturt-like* e outro por *D. dacunhai* e *D. milleri*. O subgrupo *elliptica* também foi recuperado em dois clados irmãos, um composto por *D. emarginata* e *D. neoelliptica* e outro por *D. neosaltans*. Politomias foram geradas no subgrupo *saltans*, mas destaca-se que a relação de parentesco entre as espécies irmãs *D. austrosaltans* e *D. saltans* e próxima a elas *D. nigrosaltans* foi bem suportada e corroborada com dados da literatura. Entretanto, o relacionamento entre a maioria das espécies do subgrupo *saltans* não foi resolvido, e uma das possíveis explicações poderia ser a recente divergência deste subgrupo.

Palavras-chave: edeago, especiação, genes mitocondriais, Microscopia Eletrônica de Varredura, terminalia.

ABSTRACT

Phylogenetic reconstruction is fundamental to understand many evolutionary phenomena. The obtainment of phylogenetic trees using different molecular markers allied to the analysis of morphological characters becomes essential, due both information are often complementary, increasing the strength of the analyses. The species of *Drosophila saltans* group are widely distributed in South, Central and North America and the information concerning the group's phylogeny available on the literature show incongruities. Therefore, the present work aims to reconstruct the phylogeny for this group, using 16 of the 21 species which constitute it. The study was carried out from the analysis of 48 morphological characters of the male Terminalia by Scanning Electron Microscopy, and molecular markers based on the analyses of COI and COII genes. The phylogenetic analyses were performed using the criteria of Maximum Parsimony and Bayesian Inference. A partitioned tree was performed using Bayesian Inference criterion for three partitions (morphological, COI and COII). The obtained results indicated the *saltans* group as monophyletic. The trees supported the relationship of the species within *sturtevanti* and *elliptica* subgroups. The relationship of *sturtevanti* subgroup was established in two sibling clades, the first one composed by *D. sturtevanti* and *D. sturt-like* and the other one by *D. dacunhai* and *D. milleri*. The *elliptica* subgroup was also recovered in two sibling clades, one composed by *D. emarginata* and *D. neoelliptica* and another by *D. neosaltans*. Politomies were generated in the *saltans* subgroup but we stand out that the relationship among *D. austrosaltans*, *D. saltans* and *D. nigrosaltans* was well-supported and corroborated with data from literature. However, the relationship among most species of the *saltans* subgroup was not resolved and one of the possible explanations could be the recent divergence of this subgroup.

Keywords: aedeagus, mitochondrial gene, Scanning Electron Microscopy, speciation, terminalia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Sistemática Filogenética: princípios	8
1.2. Grupo <i>saltans</i> de <i>Drosophila</i> (família Drosophilidae, subgênero <i>Sophophora</i>)	8
1.3. Marcadores moleculares	21
1.4. Importância do uso de marcadores morfológicos em análises filogenéticas	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Espécies utilizadas	24
3.2. Preparação das amostras para as análises moleculares e sequenciamento	24
3.3. Edição das sequências	25
3.4. Preparação das amostras para as análises morfológicas	25
3.5. Análises morfológicas	27
3.6. Reconstrução filogenética	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Análises morfológicas	29
4.1.1. Máxima Parcimônia	54
4.1.2. Inferência Bayesiana	56
4.2. Citocromo Oxidase I	58
4.2.1. Máxima Parcimônia	58
4.2.2. Inferência Bayesiana	60
4.3. Citocromo Oxidase II	62
4.3.1. Máxima Parcimônia	62
4.3.2. Inferência Bayesiana	64
4.4. Análise particionada por Inferência Bayesiana	66
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemática filogenética: princípios

Diferentes tipos de sistemas de classificação de organismos já haviam sido propostos anteriormente, porém apenas em 1950, Hennig sugeriu um método que permitia classificar os organismos buscando entender a história evolutiva e reconstruir as relações de parentesco entre grupos de organismos, propondo assim uma metodologia baseada na sistemática filogenética (HENNIG, 1950).

A sistemática filogenética tem por objetivo descrever os padrões hierárquicos de relações entre entidades biológicas de um grupo, podendo ser abordada de diversas maneiras, utilizando características morfológicas, comportamentais, ecológicas, fisiológicas, citogenéticas e moleculares para compreender como ocorreu o processo evolutivo (BERNARDO, 2007).

Uma árvore filogenética representa a história evolutiva dos grupos de organismos ali estudados. Segundo essa linha de pensamento, a sistemática filogenética sugere que o grupo de organismos que compartilham condições modificadas de um determinado caráter, ou seja, apomorfias, descendem de uma mesma espécie ancestral desta forma, os cladogramas apresentam relações filogenéticas entre táxons terminais, demonstrando as sinapomorfias (AMORIM, 1997).

A filogenia corresponde a uma entidade transtemporal, porém o que conseguimos ver e analisar é um corte temporal, de forma que seria impossível afirmar que estamos utilizando, para uma análise, todas as espécies existentes, mesmo com organismos fósseis (AMORIM, 2011).

1.2. Grupo *saltans* de *Drosophila* (família Drosophilidae, subgênero *Sophophora*)

As espécies que constituem a família Drosophilidae (Insecta, Diptera) são amplamente distribuídas no mundo e possuem importante função nas cadeias alimentares saprofíticas, pois se alimentam de organismos fermentadores. Esta

família se originou em regiões tropicais há aproximadamente 50-60 milhões de anos (THROCKMORTON, 1975). Dentre os 78 gêneros que compoem a família Drosophilidae, encontra-se o gênero *Drosophila* que compreende mais de 2000 espécies descritas (MARKOW; O'GRADY, 2005, 2006, 2007; BACHLI, 2018; BACHLI, 2018). Este gênero é constituído por oito subgêneros e dentre estes, destacam-se pela grande diversidade de espécies apresentadas, os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* (BACHLI, 2018).

O subgênero *Sophophora* foi estabelecido por Sturtevant (1939) e atualmente é subdividido em nove grupos, destacando entre eles os quatro grandes grupos: *melanogaster*, *obscura*, *saltans* e *willistoni* (BACHLI, 2018). O grupo *saltans* forma, juntamente com o grupo *willistoni*, clados irmãos da diversificação do Novo Mundo (THROCKMORTON, 1975).

O grupo *saltans* foi dividido inicialmente em dois subgrupos abrangendo apenas as espécies escuras, o primeiro subgrupo composto por espécies que apresentavam padrão acinzentado no mesonoto e presença de pequenos pelos abaixo da carina, e outro subgrupo caracterizado pela ausência dessas características (STURTEVANT, 1942). Mais tarde, essa divisão foi invalidada por Pavan e Magalhães (1950) que encontraram espécies sem o padrão acinzentado do mesonoto e com pelos abaixo da carina e, por Magalhães (1956), que descreveu duas novas espécies amarelas (*D. parasaltans* e *D. subsaltans*) e as incluiu dentro do grupo. Em 1957, Magalhães e Bjornberg dividiram o grupo *saltans* em cinco subgrupos, a distinção das espécies irmãs deste grupo foi realizada por meio de caracteres morfológicos externos, principalmente, pela terminália masculina, por apresentar grande variação morfológica e rápida evolução (EBERHARD, 1985). Em 1962, Magalhães nomeou os subgrupos utilizando o nome de uma das espécies de cada subgrupo. No trabalho de Mourão e Bicudo (1967), duas novas espécies do subgrupo *sturtevanti* foram descritas, sendo elas: *D. magalhaesi* e *D. dacunhai*.

Segundo a literatura, o grupo *saltans* é constituído por 21 espécies e dividido em cinco subgrupos. Os trabalhos incluem a espécie *D. pulchella* a qual foi descrita por meio de um único exemplar fêmea por Sturtevant (1921) e, inserida no grupo *saltans* por Wheeler (1957). Entretanto, Magalhães (1962) avaliou o exemplar e verificou que se tratava de *D. sturtevanti*, não concordando com a descrição de uma nova espécie (*D. pulchella*). Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou uma nova espécie do subgrupo *sturtevanti*, denominada até o momento de *D. sturt-like*,

ainda não descrita (comunicação pessoal, Lilian Madi-Ravazzi), desta forma o grupo consta de 21 espécies (Tabela 1).

A espécie *D. rectangularis* descrita por Sturtevant (1942) e incluída no subgrupo *sturtevanti* por Magalhães e Bjornberg (1957) não é por nós considerada incluída neste subgrupo, principalmente pela principal característica diagnóstica que é a forma do edeago ser muito diferente das demais espécies, de acordo com os desenhos de Magalhães e Bjornberg (1957). Além disto, esta espécie nunca mais foi coletada por nenhum outro pesquisador, o que impossibilita uma análise mais detalhada.

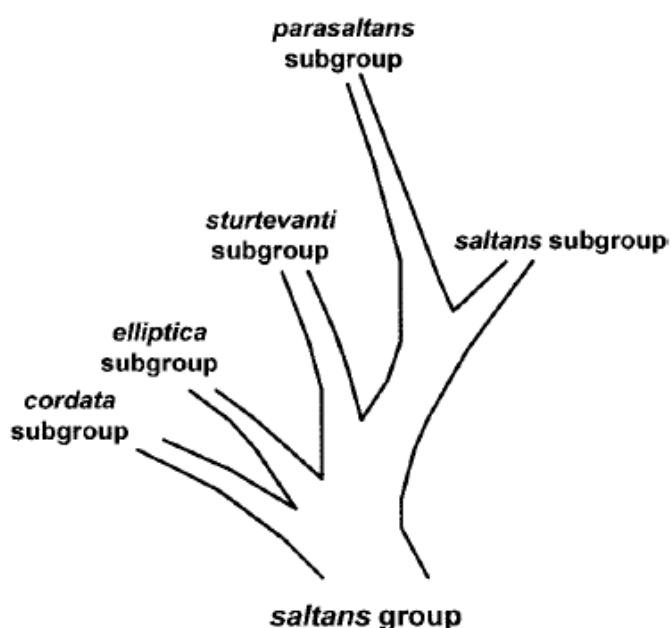
Tabela 1. Espécies do grupo *saltans*, com os nomes dos autores e datas das descrições

Subgrupos	Espécies	Autores/datas das descrições
<i>saltans</i>	<i>D. saltans</i>	Sturtevant, 1916 (Sinônimo de <i>D. sellata</i> Sturtevant, 1942)
	<i>D. prosaltans</i>	Duda, 1925
	<i>D. austrosaltans</i>	Spassky, 1957
	<i>D. pseudosaltans</i>	Magalhães, 1956
	<i>D. nigrosaltans</i>	Magalhães, 1962
	<i>D. septentrionsaltans</i>	Magalhães, 1962
	<i>D. lusaltans</i>	Magalhães, 1962
<i>sturtevanti</i>	<i>D. sturtevanti</i>	Duda, 1925 (Sinônimo de <i>D. earlei</i> Sturtevant, 1916; <i>D. pilifacies</i> Malloch, 1926; <i>D. biopaca</i> Sturtevant, 1942)
	<i>D. sturt-like</i>	Madi-Ravazzi, comunicação pessoal
	<i>D. milleri</i>	Magalhães, 1962
	<i>D. magalhaesi</i>	Mourão e Bicudo, 1967
	<i>D. dacunhai</i>	Mourão e Bicudo, 1967
<i>parasaltans</i>	<i>D. parasaltans</i>	Magalhães, 1956
	<i>D. subsaltans</i>	Magalhães, 1956
<i>elliptica</i>	<i>D. elliptica</i>	Sturtevant, 1942
	<i>D. emarginata</i>	Sturtevant, 1942
	<i>D. neoelliptica</i>	Pavan e Magalhães, 1950
	<i>D. neosaltans</i>	Pavan e Magalhães, 1950
<i>cordata</i>	<i>D. cordata</i>	Sturtevant, 1942
	<i>D. neocordata</i>	Magalhães, 1956
subgrupo não identificado	<i>D. rectangularis</i>	Sturtevant, 1942

A distribuição geográfica das espécies do grupo *saltans* abrange desde o México ao Estado do Rio Grande do Sul no Brasil (MAGALHÃES, 1962; MOURÃO; BICUDO, 1967; SOUZA et al., 2014). Os subgrupos *parasaltans* e *cordata* são encontrados na região Neotropical e algumas espécies dos subgrupos *elliptica*, *sturtevanti* e *saltans* são encontradas nas regiões Neotropical e Neoártica (MAGALHÃES, 1962).

A primeira discussão sobre a filogenia do grupo *saltans* foi apresentada por Throckmorton e Magalhães (1962), utilizando mudanças do acúmulo do pigmento pteridina no corpo das espécies. Os autores representaram de forma esquemática uma relação entre os cinco subgrupos, colocando o subgrupo *cordata* como o mais basal, seguido de *elliptica*, *sturtevantii*, *parasaltans* e como representante do ápice do tronco, o subgrupo *saltans* (Figura 1) (Tabela 2).

Figura 1. Representação esquemática do relacionamento entre os subgrupos do grupo *saltans* proposta por Throckmorton e Magalhães (1962).



O trabalho de Throckmorton (1975) foi pioneiro na discussão da origem do grupo *saltans*. O autor utilizou um esquema do relacionamento entre os subgrupos do grupo *saltans*, proposto por Throckmorton e Magalhães (1962) (Figura 1), e também utilizou o mapa de distribuição geográfica das espécies do grupo, feito por Magalhães (1962) (Figura 2), com o objetivo de sugerir a origem do grupo *saltans* na América do Norte, devido à ocorrência do México ao Brasil da maioria das espécies dos subgrupos mais basais: *cordata* e *elliptica*. O autor sugeriu também, que um grupo ancestral teria então colonizado o continente sul-americano, dando origem aos subgrupos *sturtevantii*, *parasaltans* e *saltans*, possivelmente antes da formação do Istmo do Panamá. E, após o soerguimento do Istmo, as espécies destes subgrupos invadiram e se dispersaram para o Norte. Algumas espécies do subgrupo *saltans* se dispersaram

na América Central, México e Ilhas do Caribe há aproximadamente 4,5 milhões de anos, no final do período Plioceno (THROCKMORTON, 1975).

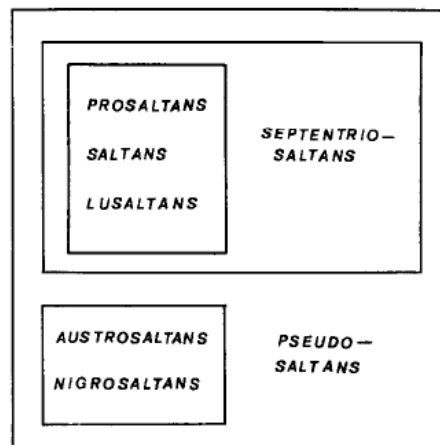
Figura 2. Distribuição geográfica das espécies dos subgrupos sugeridos como basais do grupo *saltans*, de acordo com Magalhães (1962).



Bicudo (1973a), utilizando as sete espécies do subgrupo *saltans*, inferiu a proximidade entre as espécies do subgrupo com base no grau de isolamento reprodutivo, assumindo que quanto menor o grau de isolamento mais relacionada uma espécie está da outra. Apesar de existirem diferentes fatores que influenciam em graus variados o isolamento reprodutivo, até mesmo dentro de populações da mesma espécie, os resultados obtidos mostraram que as espécies *D. prosaltans*, *D. saltans* e *D. lusaltans* estão mais intimamente relacionadas umas às outras do que com o

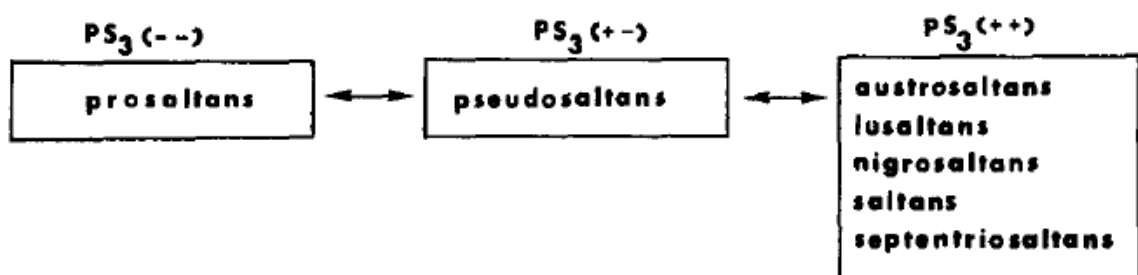
restante das espécies do subgrupo (BICUDO, 1973a). A espécie *D. septentriosaltans* mostra-se mais próxima das três espécies citadas acima. *Drosophila nigrosaltans* e *D. austrosaltans* se aproximam mais entre elas, do que com o restante das espécies e *D. pseudosaltans* está menos relacionada com as demais (BICUDO, 1973a) (Figura 3) (Tabela 2).

Figura 3. Esquema do relacionamento entre as espécies do subgrupo *saltans*, com base no grau de isolamento reprodutivo, proposto por Bicudo (1973a).



Estudos adicionais foram realizados por Bicudo (1973b) com o subgrupo *saltans*, com foco nas inversões cromossômicas (Figura 4) (Tabela 2). O grau de proximidade entre as sete espécies do subgrupo *saltans* foi analisado, com base na presença da inversão PS3 do braço do cromossomo IIL. A *D. prosaltans* não apresentou esta inversão, sugerindo ser a espécie mais distante de todas as outras. Já *D. saltans*, *D. septentriosaltans*, *D. austrosaltans*, *D. nigrosaltans* e *D. lusaltans* foram homozigotas para a inversão PS3, contudo sem definição das relações filogenéticas entre elas. Entre a espécie *D. prosaltans* e as espécies homozigotas para a inversão PS3, encontra-se *D. pseudosaltans*, heterozigota para a mesma.

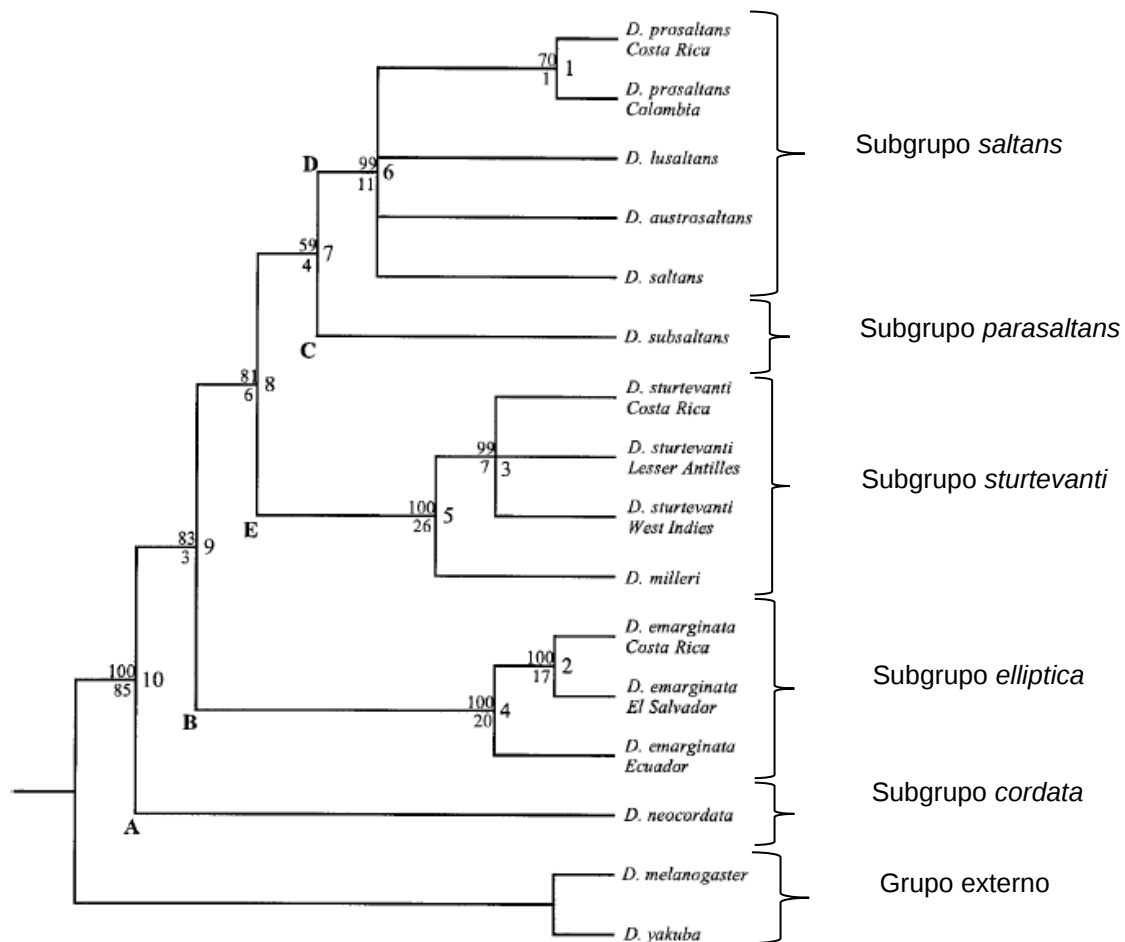
Figura 4. Esquema do grau de proximidade entre as espécies do subgrupo *saltans*, com base na presença da inversão PS3 do braço do cromossomo IIL, por Bicudo (1973b).



Bicudo (1979) estudou o isolamento reprodutivo do subgrupo *sturtevantii* com as espécies *D. sturtevantii*, *D. milleri* e *D. magalhaesi* e utilizou também em sua análise, dados obtidos por Mourão e Bicudo (1967) para estas mesmas espécies, mais a espécie *D. dacunhai*. Com base na hipótese de Kaneshiro (1976), de que fêmeas das espécies mais basais tendem a apresentar forte discriminação sexual quando cruzadas com machos das espécies mais derivadas, a autora sugeriu uma relação filogenética, colocando *D. magalhaesi* como a que se divergiu primeiro, seguida de *D. milleri*, *D. sturtevantii* e a mais derivada *D. dacunhai* (Tabela 2).

O primeiro estudo baseado em dados moleculares com a finalidade de discutir a filogenia do grupo *saltans* foi realizado por O'Grady et al. (1998). Estes autores utilizaram nove espécies e os genes nucleares - *Adh* e *ITS I* e os genes mitocondriais - *COI* e *COII* além de dados morfológicos (oito caracteres da morfologia externa) obtidos da literatura (MAGALHÃES, 1962). Os resultados das análises individuais de cada partição não foram completamente concordantes, porém por meio da realização de uma análise de evidência total, contendo todas partições em uma só análise, a maioria dos relacionamentos foram recuperadas. O resultado da análise de evidência total corroborou o trabalho de Throckmorton e Magalhães (1962), em relação às posições dos subgrupos. Os subgrupos *cordata* e *elliptica* se posicionaram como clados irmãos, já o subgrupo *sturtevantii* (*D. milleri* e *D. sturtevantii*) ocupou a posição intermediária, como táxon irmão do clado *parasaltans* – *saltans* (Figura 5) (Tabela 2).

Figura 5. Relações filogenéticas entre as espécies do grupo *saltans*, com base na análise de evidência total (genes *Adh*, *ITS1*, *COI*, *COII* e dados morfológicos), por O'Grady et al. (1998).

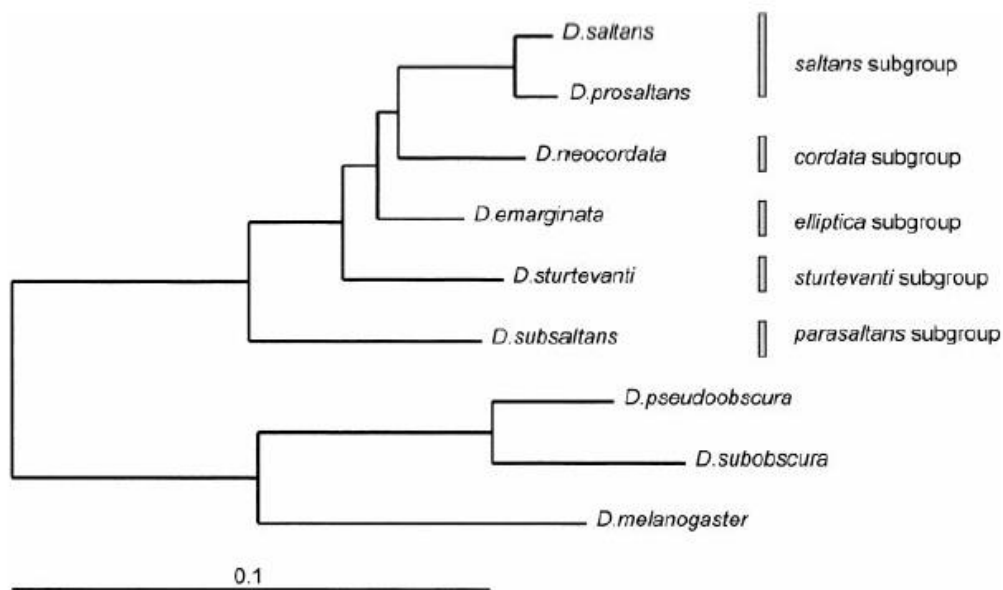


O' Grady et al. (1998), sugeriram que as espécies do subgrupo *saltans* possuem recente divergência, pois o relacionamento entre as espécies não foi satisfatoriamente resolvido nas análises morfológicas e moleculares, resultando em incongruências.

O gene Xantina desidrogenase (*Xdh*) também foi utilizado para discutir a filogenia do grupo *saltans*, para esta análise seis espécies do grupo foram utilizadas, com pelo menos uma espécie representante de cada subgrupo (RODRIGUEZ-TRELLEZ et al., 1999). A árvore obtida a partir desta análise mostrou o subgrupo *parasaltans* (*D. subsaltans*) como irmão de todos os outros, seguido dos subgrupos *sturtevantii* (*D. sturtevantii*), *elliptica* (*D. emarginata*), *cordata* (*D. neocordata*) e subgrupo *saltans* (*D. saltans* e *D. prosaltans*) (Figura 6) (Tabela 2). Esses resultados corroboraram os de Throckmorton e Magalhães (1962) em relação à posição do subgrupo *saltans*, como o mais derivado e a proximidade dos subgrupos *elliptica* e

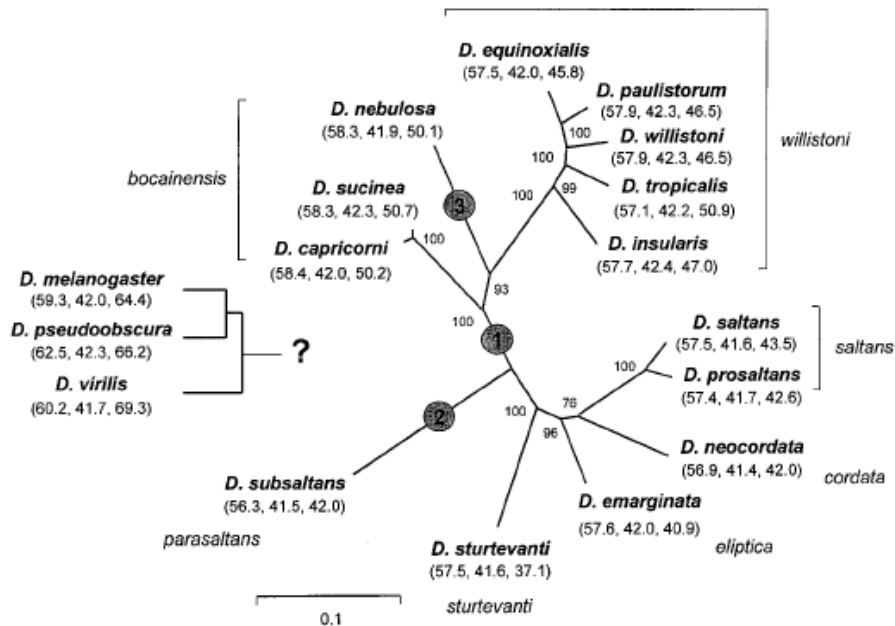
cordata. Rodriguez-Trellez et al. (1999) sugeriram que o grupo *saltans* poderia ter se originado na América do Sul, devido à ocorrência no Brasil das espécies do subgrupo *parasaltans*, considerado o mais basal pelas análises efetuadas, assim como a origem do seu grupo irmão: *willistoni*.

Figura 6. Relações filogenéticas entre as espécies do grupo *saltans*, com base no gene *Xdh*, por Rodriguez-Trellez et al. (1999).



Outro estudo filogenético envolvendo seis espécies do grupo *saltans* e oito do grupo *willistoni* utilizando o gene *Xdh* foi realizado por Tarrio et al. (2000) (Figura 7) (Tabela 2). O resultado obtido em relação ao grupo *saltans* concordou com Rodriguez-Trellez et al. (1999), sendo o subgrupo *parasaltans* representado pela espécie *D. subsaltans*, o subgrupo irmão de todos os outros do grupo, seguido dos subgrupos *sturteventi* (*D. sturteventi*), *elliptica* (*D. emarginata*), *cordata* (*D. neocordata*) e *saltans* (*D. prosaltans* e *D. saltans*).

Figura 7. Relações filogenéticas entre as espécies do grupo *saltans*, com base no gene *Xdh*, por Tarrio et al. (2000).



Em 2002, O'Grady e Kidwell realizaram um estudo com dois genes nucleares (*Adh* e 28S) e um gene mitocondrial (*COII*) para inferir a filogenia do subgênero *Sophophora*. Os resultados relacionados ao grupo *saltans*, sugeriram o mesmo como monofilético, de acordo com todas as análises e com alto suporte de ramos. Porém, as árvores obtidas mostraram-se variáveis, não havendo um bom suporte, desta forma não foi possível obter o relacionamento entre os subgrupos e espécies do grupo *saltans*.

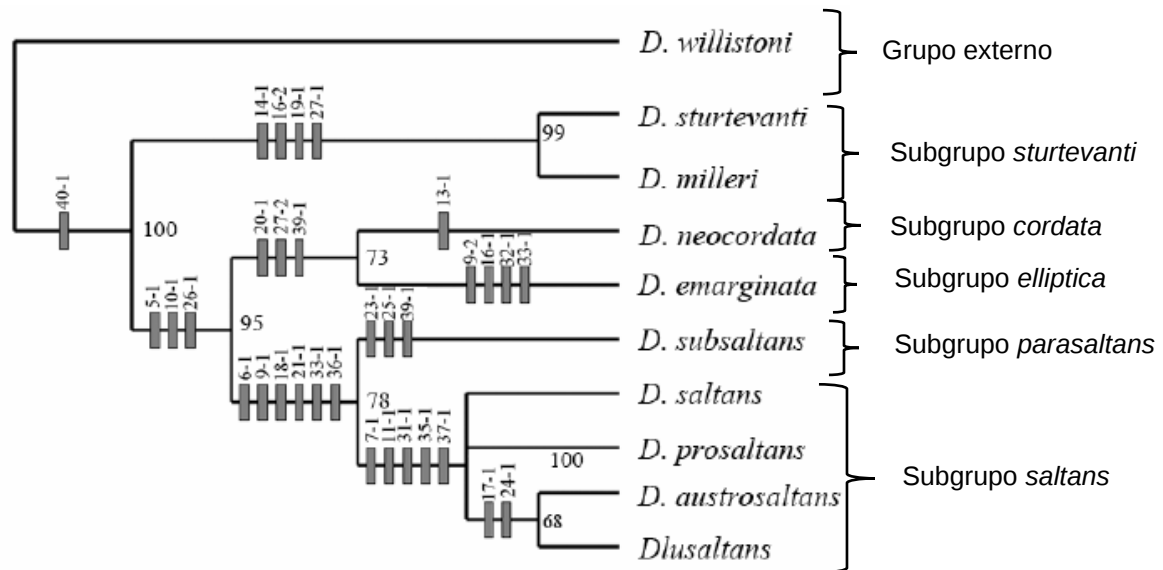
Os padrões de esterases também foram usados como marcadores em estudos da filogenia do subgrupo *saltans* (NASCIMENTO; BICUDO, 2002) (Tabela 2). Neste estudo, foram analisadas 16 linhagens de quatro espécies do subgrupo: *D. prosaltans* (oito linhagens), *D. saltans* (seis linhagens), *D. austrosaltans* (uma linhagem) e *D. septentriosaltans* (uma linhagem). Nesta análise foi obtida o total de 34 bandas que mostraram como resultado uma proximidade maior entre as espécies *D. saltans* e *D. septentriosaltans*, seguida de *D. austrosaltans* e *D. prosaltans* mais distantes. Estes resultados apesar de não terem apresentados um alto suporte de ramos, corroboraram com estudos anteriores realizados com o polimorfismo de inversões por Bicudo (1973b).

Castro e Carareto (2004) utilizando elementos de transposição *P* avaliaram o número total de inserções no genoma de 10 espécies dos cinco subgrupos do grupo

saltans com enfoque filogenético. Os resultados mostraram a ocorrência de apenas um elemento *P* muito divergente nas espécies dos subgrupos *cordata* (*D. neocordata*) e *elliptica* (*D. emarginata*), contrariando estudos anteriores, as quais este elemento não foi observado em nenhum destes subgrupos (CLARK et al., 1995; DANIELS et al., 1990; SILVA; KIDWELL, 2000). As autoras observaram poucos elementos *P* nas espécies do subgrupo *parasaltans* (*D. subsaltans* e *D. parasaltans*) e muitos nas espécies dos dois subgrupos restantes. De acordo com as premissas de Pinsker et al. (2001), um genoma que foi invadido por um elemento transponível há pouco tempo carrega consigo um grande número de cópias deste elemento, ao contrário um genoma que foi invadido há muito tempo por esse elemento, com o passar do tempo evolutivo pode perder várias cópias deste mesmo. Assim, as autoras (CASTRO; CARARETO, 2004) baseando-se nessas premissas e na de que os elementos de transposição podem ser transmitidos verticalmente dentro de uma espécie sendo utilizados como qualquer outro marcador molecular neutro, sugeriram que os subgrupos mais basais seriam *cordata* e *elliptica* isolados do ancestral antes mesmo dos demais subgrupos e seguidos por *parasaltans*, *sturtevantii* e *saltans* (Tabela 2).

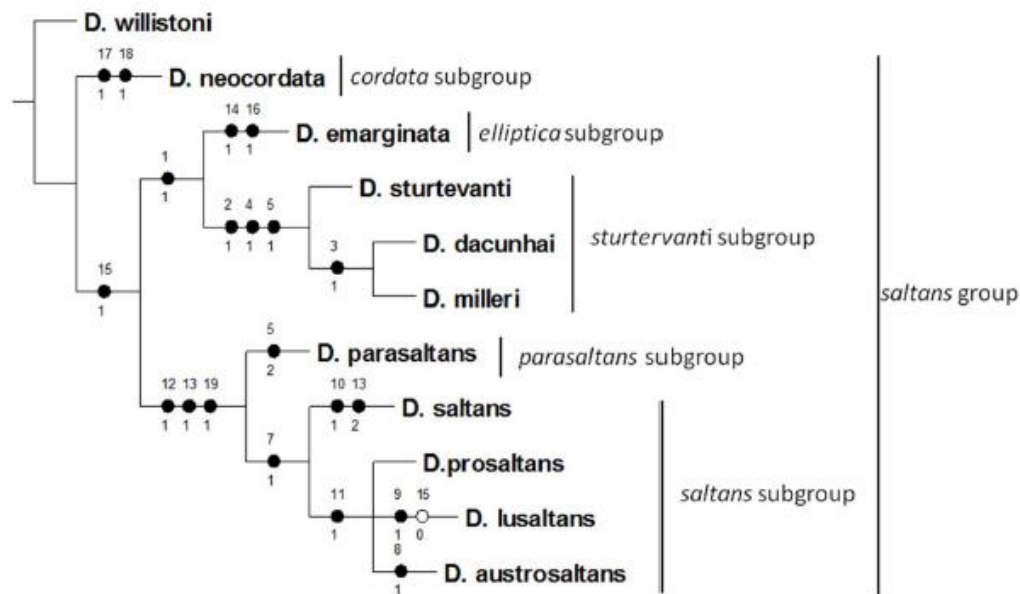
Um estudo com enfoque na filogenia do grupo *saltans*, utilizando 40 caracteres morfológicos obtidos em trabalhos da literatura (MAGALHÃES; BJORNBERG, 1957; THROCKMORTON, 1962) foi realizado por Yassin (2009). Os resultados obtidos mostraram o subgrupo *sturtevantii* (*D. sturtevantii* e *D. milleri*) como irmão de todos outros do grupo, e os demais subgrupos formaram dois clados, um constituído pelas espécies dos subgrupos *cordata* (*D. neocordata*) e *elliptica* (*D. emarginata*) e, no outro clado, os subgrupos *parasaltans* (*D. subsaltans*) e *saltans* (*D. saltans*, *prosaltans*, *D. austrosaltans* e *D. lusaltans*). Os suportes dos ramos internos foram altos, contudo a posição das espécies dentro do subgrupo *saltans* não foi bem resolvida, somente as espécies *D. lusaltans* e *D. austrosaltans* formaram um clado com baixo suporte (Figura 8) (Tabela 2).

Figura 8. Relações filogenéticas entre nove espécies do grupo saltans, com base em dados morfológicos, por Yassin (2009).



Souza et al. (2014) analisaram detalhadamente por microscopia eletrônica de varredura 19 caracteres morfológicos da terminália masculina de 10 espécies do grupo *saltans*. De acordo com os resultados obtidos, o subgrupo *cordata* (*D. neocordata*) se posicionou como clado irmão de todos os outros do grupo *saltans*. Dois grandes clados foram formados, um constituído pelas espécies dos subgrupos *elliptica* (*D. emarginata*) e *sturtevantii* (*D. sturtevantii*, *D. dacunhai* e *D. milleri*), e outro pelos subgrupos *parasaltans* (*D. parasaltans*) e *saltans* (*D. saltans*, *D. prosaltans*, *D. lusaltans* e *D. austrosaltans*). Dentro do subgrupo *saltans*, a espécie *D. saltans* se diferenciou das demais espécies. Já no subgrupo *sturtevantii*, *D. milleri* e *D. dacunhai* se agruparam formando um clado (Figura 9) (Tabela 2).

Figura 9. Relações filogenéticas entre nove espécies do grupo *saltans*, com base em dados morfológicos, por Souza et al. (2014).



A tabela 2 apresenta um resumo dos estudos realizados com diferentes marcadores e o relacionamento entre as espécies do grupo *saltans* e dentro dos subgrupos *saltans* e *sturtevantii*.

Tabela 2. Principais relacionamentos propostos para o grupo *saltans*, subgrupos *saltans* e *sturtevantii* obtidas de dados da literatura.

Trabalhos	Filogenia	Marcadores utilizados
Throckmorton e Magalhães (1962)	(CO(EL(ST(PA, SA))))	Morfologia
O' Grady et al (1998)	(CO(EL(ST(PA, SA))))	Análise Combinada (COI, COII, ITS1, Adh e morfologia)
Rodriguez-Trelles et al (1999)	(PA(ST(EL(CO, SA))))	<i>Xdh</i>
Tarrio et al (2000)	(PA(ST(EL(CO, SA))))	<i>Xdh</i>
Castro e Carareto (2004)	(CO, EL(PA(ST, SA)))	Elemento P
Yassin (2009)	(ST(CO EL)(PA, SA))	Morfologia
Souza et al (2014)	(CO(EL, ST)(PA, AS)))	Morfologia
Bicudo (1973a)	(Ps(Au, Ni(Se(Pr, Sa, Lu)))	Isolamento reprodutivo
Bicudo (1973b)	(Pr(Ps(Se, Sa, Au, Ni, Lu)))	Inversão cromossômica
Bicudo (1979)	(Ma(Mi(St(Da)	Isolamento reprodutivo
Nascimento e Bicudo (2002)	(Pr(Au(Sa, Se)))	Padrão de esterases
Yassin (2009)	(Lu, Au)	Padrão de esterases

CO = subgrupo *cordata*; EL = subgrupo *elliptica*; ST= subgrupo *sturtevantii*; PA = subgrupo *parasaltans*; SA = subgrupo *saltans*; X = não resolvido. Au = *D. austrosaltans*; Lu = *D. lusaltans*; Ni = *D. nigrosaltans*; Pr = *D. prosaltans*; Ps = *D. pseudosaltans*; Sa = *D. saltans*; Se = *D. septentriosaltans*. Ma = *D. magalhaesi*; Mi = *D. milleri*; St = *D. sturtevantii*; Da = *D. dacunhai*.

1.3. Marcadores moleculares

Análises com múltiplos marcadores são cada vez mais utilizadas em estudos filogenéticos, por refletirem diferentes aspectos da história evolutiva de uma espécie, visto que estão sujeitos a diferentes pressões seletivas e eventos demográficos distintos, evoluindo em taxas diferentes (HUELSENBECK et al., 1996). Essa abordagem torna-se, então, essencial para o entendimento das relações filogenéticas, especialmente de espécies com divergência recente, possibilitando a análise dos processos evolutivos envolvidos nos eventos de especiação (MACHADO; HEY, 2003).

Os animais apresentam dois tipos de genomas independentes, com diferentes aspectos biológicos, e são a partir desses dois genomas, que são realizados muitos estudos evolutivos, são eles: o genoma nuclear e mitocondrial. Estes dois genomas são encontrados em compartimentos celulares diferentes, apresentando forças mutacionais distintas. Ambos os genes são bons para reconstruções filogenéticas (CARAVAS, 2012).

Os genes nucleares são mais conservados, pois são empacotados e protegidos por histonas e possuem também mecanismos de reparo que reduzem as chances de ocorrer por exemplo, substituições, o mesmo não ocorre com o genoma mitocondrial (AVISE, 2009; CARAVAS, 2012). Os genes mitocondriais são muito utilizados em estudos filogenéticos e populacionais por apresentarem características favoráveis aos estudos evolutivos (AVISE, 2009). São amplamente distribuídos e apresentam grande número de cópias por célula, apresentam também taxas de evolução diferentes em relação aos genes nucleares (SIMON et al., 1994), herança uniparental e aparentemente não sofrem recombinação (SACCONE et al., 1999).

O Citocromo Oxidase I (*COI*) e Citocromo Oxidase II (*COII*), são genes mitocondriais que codificam as subunidades I e II do citocromo C, respectivamente, este último é um elemento importante na cadeia respiratória. O gene *COI* é o mais utilizado em estudos filogenéticos e populacionais, é conservado em termos de evolução em nível de aminoácidos (SIMON et al., 1994), além de ser considerado um dos genes relevantes para identificação de alguns grupos de organismos, chamado de códigos de barras genético (HEBERT et al., 2003). Já o gene *COII*, é menos conservado do que o *COI*, mas ainda muito utilizado em estudos filogenéticos (SIMON et al., 1994).

1.4. Importância do uso de marcadores morfológicos em análises filogenéticas

O uso de marcadores morfológicos desempenha papel fundamental na inferência da filogenia, e foi nas últimas décadas, em muitos casos, substituído pela biologia molecular. Alguns autores até argumentaram que as características morfológicas não possuíam mais um papel importante nas análises filogenéticas, mesmo se associadas com estudos moleculares (HILLIS, 1987; BAKER; GATESY, 2002; SCOTLAND et al, 2003; WORTHLEY; SCOTLAND, 2006). Entretanto, o uso de marcadores morfológicos foi retomado em muitos estudos juntamente com os moleculares, complementando e aumentando a robustez das análises.

Para *Drosophila*, a combinação de marcadores moleculares e morfológicos tem sido realizada no estudo de populações neotropicais de áreas abertas e de mata com o objetivo de relacionar a estruturação genética com causas ecológicas e históricas, permitindo uma maior compreensão da distribuição da diversidade nestes ambientes (MATEUS; SENE, 2003, 2007; MORAES; SENE, 2007; MORAES et al., 2009; CAVASINI, 2009; MACHADO et al., 2010, 2012; MATEUS et al., 2010; HEINZ, 2012).

Portanto, a utilização de marcadores moleculares com herança e tempos de coalescência diferentes, aliado à análise de caracteres morfológicos torna-se imprescindível, pois pode fornecer informações distintas, mas muitas vezes complementares, aumentando a acurácia das inferências filogenéticas sobre os processos envolvidos (TEMPLETON, 2004; AVISE, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Reconstruir a filogenia do grupo *saltans* de *Drosophila*, utilizando marcadores morfológicos e moleculares.

2.2. Objetivos específicos

- Inferir as relações filogenéticas entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, com base nas sequências mitocondriais (*COI* e *COII*) e em caracteres morfológicos da terminalia masculina;
- Comparar as árvores geradas a partir dos métodos de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana;
- Realizar uma análise particionada das sequências obtidas e dos caracteres morfológicos analisados;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécies utilizadas

Para o presente trabalho, 15 das 21 espécies descritas do grupo *saltans*, mais uma nova espécie que está sendo descrita por nosso grupo de pesquisa (*D. sturt-like*) foram avaliadas com base nos dados morfológicos e moleculares. As espécies, linhagens, procedência geográfica e número de indivíduos utilizados para as análises morfológicas e moleculares estão relacionadas na tabela 3.

3.2. Preparação das amostras para as análises moleculares e sequenciamento

O DNA genômico de machos das espécies estudadas foi extraído macerando, individualmente, as amostras em soluções de Lise de Núcleo (Promega) e EDTA (0,5 M, pH = 8,0). Após incubação da reação com Proteínase K (20 mg/mL) em banho-maria a 65° C, foi acrescentada Solução de Precipitação de Proteína (Promega) e as amostras permaneceram a 0°C por 10 minutos. Posteriormente a centrifugação e precipitação das proteínas, o sobrenadante foi transferido para microtubo contendo isopropanol. Após outra centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o DNA purificado em mais um ciclo de centrifugação com etanol 70%. O etanol foi descartado e após secagem dos microtubos a 40° C, o DNA foi ressuscitado em 60 µl de água ultrapura autoclavada, permanecendo a 4° C por 12 horas e armazenado a - 20°C.

O genes mitocondriais foram amplificados, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores *forward* TY-J-1460 (SIMON et al., 1994) e *reverse* C-1-N-2191 (SPERLING; HICKEY, 1994), para a subunidade I do gene Citocromo Oxidase (COI) e os iniciadores *forward* TL2-J-3037 e *reverse* TK-N-3785 para a subunidade II do gene Citocromo Oxidase (COII) (LIU; BECKENBACH, 1992). O produto da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2% e o gene foi purificado por meio do *kit GFX Purification* (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), localizado na UNESP, campus

Jaboticabal. Neste mesmo local, elas foram sequenciadas pelo conjunto de reagentes *Big Dye* (Perkin-Elmer), em sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia (CA)), utilizando-se os mesmos iniciadores e condições da amplificação.

3.3. Edição das sequências

A edição das sequências dos genes *COI* e *COII* assim como a comparação e criação das sequências consensos das sequências *forward* e *reverse* de cada táxon foram realizadas manualmente no programa *BioEdit* 7.2.5 (HALL, 1999), onde também foi feito o alinhamento múltiplo destas usando o *Clustal W* (THOMPSON et al, 1994). A busca por identidade das sequências semelhantes às obtidas neste trabalho foi realizada no banco de dados do NCBI *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

3.4. Preparação das amostras para as análises morfológicas

Para a montagem da terminália foi utilizada a técnica de Kaneshiro (1969), com modificações. Com o auxílio de um estereomicroscópio e de estiletes, os dois terços distais do abdome das moscas foram extraídos e colocados em um tubo de microcentrífuga contendo solução de KOH 10%. Estes tubos com KOH foram fervidos durante 15 minutos (em banho-maria) e depois o material foi lavado com água. Em seguida, o material foi transferido para um *eppendorf* contendo uma gota de eugenol, permanecendo durante 24h. Após este período, com o auxílio de um estereomicroscópio e estiletes, a terminália foi limpa. As estruturas assim preparadas foram desidratadas com acetona pura, secas em papel de filtro e montadas nos *stubs* (porta-espécimes) contendo fita de cobre dupla face para a adesão e condutividade dos elétrons. As amostras foram metalizadas em aparelho específico (cobertura com ouro) e submetidas a análise no MEV-Leo 435 VPi Zeiss (Processo FAPESP número 95/06165-1).

Tabela 3. Espécies, linhagens, procedência geográfica e número de indivíduos utilizados para as análises filogenéticas.

Subgrupos	Espécies	Linhagens		Procedência geográfica		Nº de indivíduos utilizados	
		Moleculares	Morfológicas	Molecular	Morfológico	Moleculares	Morfológicos
<i>saltans</i>	<i>D. saltans</i>	S4	S4	San José, Costa Rica	San José/Costa Rica	1	60
	<i>D. prosaltans</i>	PIC	PIC	Picinguaba, SP, Brasil	Picinguaba, SP, Brasil	1	15
	-	-	MAT	-	Matão, SP, Brasil	-	20
	-	-	CANT	-	Cantareira, SP, Brasil	-	20
	<i>D. austrosaltans</i>	NG	NG	Nova Granada, SP, Brasil	Nova Granada, SP, Brasil	1	30
	-	-	MAT	-	Matão, SP, Brasil	-	32
	<i>D. pseudosaltans</i>	CANT	CANT	Cantareira, SP, Brasil	Cantareira, SP, Brasil	1	61
	<i>D. nigrosaltans</i>	FG 310	FG 310	Guiana Francesa	Guiana Francesa	1	15
	-	-	FG 388	-	Guiana Francesa	-	24
	-	-	FG JRE	-	Guiana Francesa	-	15
	<i>D. septentriosaltans</i>	PLR	PLR	Guiana Francesa	Guiana Francesa	1	15
	-	-	A	-	Guiana Francesa	-	20
	-	-	SEP	-	Guiana Francesa	-	40
	<i>D. lusaltans</i>	B44(14045-0891.00)* AF045081***	B44(14045-0891.00)* -	Petionville, Haiti Petionville, Haiti	Petionville, Haiti -	1 -	20 -
<i>sturtevantii</i>	<i>D. sturtevantii</i>	MAT	MAT	Matão, SP, Brasil	Matão, SP, Brasil	1	47
	-	-	AG	-	Aguaí, SC, Brasil	-	14
	-	-	RI	-	Ribeirão da Ilha, SC, Brasil	-	10
	<i>D. milleri</i>	EY (14043-0861.00)* -	EY (14043-0861.00)* FG	El Yunque, Puerto Rico -	El Yunque, Puerto Rico Guiana Francesa	1 -	24 12
	<i>D. dacunhai</i>	DAC	DAC	Petionville, Haiti	Petionville, Haiti	1	80
	<i>D. sturt-like</i>	STV-like**	STV-like**	Guiana Francesa	Guiana Francesa	1	80
	<i>D. parasaltans</i>	B 17-5	B 17-5	Belém, PA, Brasil	Belém, PA, Brasil	1	30
<i>parasaltans elliptica</i>	<i>D. emarginata</i>	JD	-	Vera Cruz, México	-	1	-
	-	-	FG	-	Guiana Francesa	-	10
	<i>D. neoelliptica</i>	CANT	CANT	Cantareira, SP, Brasil	Cantareira, SP, Brasil	1	15
	-	-	AG	-	Aguaí, SC, Brasil	-	20
	<i>D. neosaltans</i>	H1	H1	Rio de Janeiro, Brasil	Rio de Janeiro, Brasil	1	21
<i>cordata</i>	<i>D. neocordata</i>	CG	CG	Campo Grande, MS, Brasil	Campo Grande, MS, Brasil	1	12
	<i>D. neocordata</i>	AF045088**	-	Minas Gerais, Brasil	-	-	-
	<i>D. willistoni</i>	JQ679116*** HQ110560***	- -	- -	- -	- -	- -

*Espécies obtidas do UC San Diego Stock Center; ** espécie nova (Madi-Ravazzi et al., 2018, trabalho em preparação); *** sequência obtida do GenBank

3.5. Análises morfológicas

As análises morfológicas da terminália masculina foram realizadas a partir das eletromicrografias produzidas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) e também a partir de dados morfológicos existentes na literatura (MAGALHÃES, 1962; YASSIN, 2009, 2013; SOUZA et al., 2014). Uma matriz de ausência (0), presença (1) e presença com modificações (2) foi codificada, a partir das análises citadas acima.

3.6. Reconstrução filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas por meio dos critérios de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. O método de Máxima Parcimônia é um teste não paramétrico, não probabilístico e é explicado de maneira mais simples, pois minimiza o número de passos mutacionais ao longo dos ramos. A Inferência Bayesiana é baseada na probabilidade posterior, a partir de parâmetros *a priori*, ou seja, essa probabilidade é calculada por meio de parâmetros, que são inseridos anterior as análises.

Uma análise particionada também foi realizada por meio do critério de Inferência Bayesiana, desta forma, apenas uma árvore foi gerada com as partições morfológicas e moleculares. Para ambos os métodos a espécie *D. willistoni* foi utilizada como grupo externo, tendo em vista que esta espécie pertence a um grupo irmão do grupo em estudo e tem suas sequências disponibilizadas no *GeneBank*.

As análises com base no critério de Máxima Parcimônia foram realizadas de forma individual, para dados morfológicos e moleculares, através do *software* TNT (GOLOBOFF et al., 2008) e para visualização e edição das árvores o *software* Winclada (NIXON, 2002). Ambas análises foram realizadas utilizando buscas heurísticas, através do método *tradicional search*, iniciando com a construção de árvores de Wagner e refinando por *branch swapping*, utilizando o algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR), com 1000 réplicas e retendo 10 árvores por réplica. Os caracteres foram analisados com pesos iguais. Para as árvores mais parcimoniosas resultantes, foi realizado um consenso estrito. O suporte dos ramos foi estimado utilizando a análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), calculada em 1000 réplicas, por meio da busca heurística, utilizando o método *tradicional search*.

A análise de Inferência Bayesiana foi realizada no *software MrBayes v.3.2* (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), utilizando o modelo de substituição GTR+G, para partição das sequências de *COI* e GTR+I+G para partição das sequências de *COII*, calculado por meio do critério de informação *Akaike* (AIC), no programa *JModeltest* (DARRIBA et al., 2012). A distribuição gama foi utilizada como modelo de evolução de caracteres, empregada como padrão pelo *MrBayes* para partição de dados morfológicos e também conforme descrito por Lewis (2001). Os mesmos critérios foram utilizados para todas as análises, inclusive particionada, desta forma, as cadeias de Markov foram iniciadas com uma árvore aleatória, o número de gerações foi de 20.000.000, amostradas a cada 2.000 gerações. Os primeiros 25% das árvores foram descartadas. O *software Tracer v.1.5* (RAMBAUT e DRUMMOND, 2009) foi utilizado para verificar o momento da estabilização (valores de ESS a cima de 200) das amostragens das árvores. A visualização da árvore gerada foi realizada utilizando o *software FigTree v. 1.4.2* (RAMBAUT, 2012).

4. RESULTADOS

4.1. Análises morfológicas

A partir das análises das eletromicrografias das terminalias masculinas, 48 caracteres morfológicos foram codificados e descritos nas tabelas 6 e 7. Na sequência tem-se a descrição das principais características da terminália masculina e as eletromicrografias de cada espécie do grupo *saltans*.

Subgrupo *saltans* (Figuras 10-16): Em geral as espécies do subgrupo *saltans* apresentam estruturas como o epândrio (Ep), surstilos (S) e hipândrio (H) muito semelhantes. A região anteroinferiora do epândrio é angulosa. O bordo inferior do epândrio apresenta dois processos (PrEp), em forma de dedo de luva, localizados logo abaixo dos surstilos. A placa anal (PA) exhibe um contorno em forma de U. Os surstilos possuem formato semielíptico, com morfologia semelhante a uma semente de feijão. A região interna de cada surstilo apresenta estruturas semelhantes a dentes (DS), variando em número, em sua maioria, de 20 - 25 dentes e são dispostos irregularmente por toda estrutura interna do surstilo, apresenta também 5 - 6 dentes primários que são dispostos em fileira no bordo inferior e um tufo de longas cerdas. O hipândrio é alongado. As espécies desse subgrupo apresentam capa do edeago (CE), sendo uma estrutura extremamente esclerotizada que se estendem do ápice até a região médio-dorsal do edeago. Os edeagos (E) das espécies do subgrupo *saltans* apresentam parâmeros ventrais (PV) não fundidos, possuem estruturas denominadas de processos ventrais (PrV), que estão em continuidade com os parâmeros ventrais e também prolongamentos ventrais (PIV), que se estendem da inserção com o apódema (A). Apresentam longos apódemas. *D. prosaltans* (Figura 10): A região do ápice do edeago (AE) é achatada, fortemente esclerotizada e recoberta com estruturas parecidas com escamas (Es) pontiagudas (Figuras 10A, C). A capa do edeago (Figuras 10A, C, D) é lisa, porém possui “pregas” ligadas a uma borda serrilhada, apresenta também estruturas semelhantes a espículas na região dorsal. Os processos ventrais são em forma de dedo de luva recurvado para fora (Figuras 10B, D). Os prolongamentos ventrais se estendem através da região ventral do edeago até o ápice do edeago (Figura 10B). *D. saltans* (Figuras 11A-E): O ápice do edeago (Figuras 11A, B, C, E) é mais achatada do que na espécie *D. prosaltans*, porém dispõe de estruturas mais longas, parecidas com cerdas (Ce) (Figura 11E), ao invés de escamas,

projetando uma região puntiforme devido ao número de longas cerdas. A capa do edeago é lisa, com borda fortemente serrilhada (Figuras 11C, D, E). Os processos ventrais (Figuras 11B, E) são recurvados para fora também, porém menores do que na espécie *D. prosaltans*. Os prolongamentos ventrais são longos e se estendem paralelamente por toda região ventral do edeago (Figuras 11B, C). Os parâmeros ventrais do edeago são mais alongados e encurvados para dentro, eles se estendem da inserção do apódema até a região ventral média do edeago (Figura 11C). *D. lusaltans* (Figuras 12A-C): O edeago é caracterizado pela presença de ápice do edeago (Figuras 12A-C) muito semelhante ao de *D. saltans*, apresentando também cerdas, porém *D. lusaltans* apresenta um sulco apical que isola duas protuberâncias laterais (Figura 12B). A capa do edeago é lisa, com borda serrilhada e possui um tufo de cerdas na região dorsal (Figura 12B). Os prolongamentos ventrais, parâmeros ventrais e processos ventrais do edeago (Figura 12B) são semelhantes aos de *D. saltans*. O hipândrio de *D. lusaltans* se diferencia de *D. saltans*, por apresentar as extensões paramedianas (ExP) voltadas para dentro (Figura 12A). *D. austrosaltans* (Figuras 13A-D): O hipândrio nessa espécie se diferencia das demais do subgrupo, pois possui bordas quadradas ao invés de arredondadas (Figuras 13A, C). O ápice do edeago é caracterizado por uma protuberância dorsal puntiforme, denominada como crista apical (CA) (Figuras 13B, C, D), essa estrutura assim como o ápice são recobertas por escamas (Figura 13B). A capa do edeago também se diferencia das espécies citadas a cima, pois ela apresenta 4 pares de cristas serrilhadas e fortemente quitinizadas, dispostas no sentido longitudinal, dorsal e lateralmente (Figura 13D). Os prolongamentos ventrais se estendem por todo o comprimento ventral do edeago, sendo paralelo na porção inicial e divergente no final, assemelhando-se com chifres (Figura 13D). Os processos ventrais do edeago, são finos e estão dispostos paralelamente um do outro (Figura 13D). *D. septentriosaltans* (Figuras 14A-D): Os surstilos (Figura 14A) apresentam menos dentes do que nas demais espécies do subgrupo, sendo 15 – 16 dentes dispostos irregularmente por toda região interna. O ápice do edeago é recoberta por escamas, porém a região frontal do ápice do edeago, onde se encontra o falotrema (Fa), é lisa (Figura 14B). A capa do edeago assim como na espécie *D. austrosaltans* também possui cristas serrilhadas e fortemente quitinizadas, porém apenas 2 pares destas, as cristas laterais são mais protuberantes formando um sulco no dorso da capa do edeago (Figura 14D). Os prolongamentos ventrais (Figura 14D) são semelhantes a espécie *D. austrosaltans*. Nessa espécie, os

processos ventrais são ainda menores do que nas demais, aparece como uma protuberância que está em continuidade com os parâmeros ventrais e, estão localizados logo a baixo dos prolongamentos ventrais, como se estivesse os servindo de apoio (Figura 14D). *D. nigrosaltans* (Figuras 15A-E): O ápice do edeago é alongado para trás (Figuras 15B, C, D, E), apresentando escamas na porção ventral e também estruturas parecidas com longas cerdas ao longo do ápice do edeago (Figura 15E). A região dorsal do edeago apresenta uma protuberância (Figura 15E). A capa do edeago é alongada, lisa e sem borda serrilhada (Figura 15D). Os prolongamentos ventrais se afinam ao final, a porção média dessa estrutura apresenta-se um pouco serrilhada (Figuras 15B, C, D). Os processos ventrais são finos e possuem as extremidades voltados para fora (Figuras 15B, C). *D. pseudosaltans* (Figuras 16A-E): Todas estruturas desta espécie se assemelham com as de *D. nigrosaltans*. A protuberância no dorso do edeago é um pouco menor em *D. pseudosaltans* e a diferença mais notável dessas duas espécies se encontra nos prolongamentos ventrais (Figura 16B, C, D), a qual *D. pseudosaltans* possui prolongamentos ventrais alargados, mais escuros e com terminação levemente bifurcada. Os processos ventrais e parâmeros ventrais do edeago se assemelham ao de *D. nigrosaltans* (Figura 16B).

Subgrupo *sturtevantii* (Figuras 17-20): Nas espécies incluídas neste subgrupo o epândrio exibe parâmeros ventrais (PVEp) e uma placa anal em forma de U, os surstilos são grandes e côncavos e unidos por um pequeno decasterno (D), apresenta ainda uma fileira de 10 a 12 dentes primários quitinosos no bordo lateral interno, com um pequeno tufo de cerdas na extremidade anterior e uma outra fileira de 3 a 6 dentes em direção quase perpendicular à primeira fileira, apresentando também um pequeno tufo de cerdas logo a cima desta. O hipândrio é pequeno e ligeiramente abaulado. Os edeagos das espécies deste subgrupo apresentam parâmeros ventrais não fundidos, exibe um único processo ventral (PrV) e ápice do edeago com projeção puntiforme. Cada espécie apresenta uma particularidade no edeago que a difere das demais espécies, como modelo o edeago da espécie *D. sturtevantii* (Figuras 17A-C) que apresenta os parâmeros ventrais (Figura 17B) formando junto com o processo ventral do edeago (Figura 17B) o que se assemelha a um bico de pato. O apódema é curto e sinuoso. Há presença de escamas na região ventral superior (Figura 17B). Em *D. sturt-like* (Figuras 18A-C) a característica marcante que a difere de *D. sturtevantii* é o ápice do edeago relativamente mais curto (Figuras 18B-C). O edeago de *D. dacunhai*

(Figura 19A-C) é caracterizado por ser um pouco mais diferente das duas espécies citadas à cima, pois há presença de escamas pontiagudas no processo ventral do edeago e também o mesmo apresenta um sulco na porção superior (Figura 19C), é mais longo e ligeiramente curvado, a qual forma juntamente com o ápice do edeago um angulo em forma de C. O edeago de *D. milleri* (Figuras 20A-C) se assemelha mais com o de *D. dacunhai* pelo fato da existência de escamas pontiagudas no processo ventral do edeago, além de um sulco na parte superior do mesmo (Figuras 20B-C), mas a característica marcante está no processo ventral do edeago, pois é mais largo do que as demais espécies do subgrupo (Figura 20B).

Subgrupo *parasaltans*: *D. parasaltans* (Figuras 21A-E): O epândrio exibe placa anal em formato de U, apresenta também parameros ventrais do epândrio (PVEp) (Figura 21C) semelhantes aos do subgrupo *sturtevantii* e processos do epândrio (PREp) (Figura 21C) semelhantes aos do subgrupo *saltans*, porém não estão localizados logo abaixo dos surstilos e sim próximos a eles, ainda estão conectados aos parameros ventrais do epândrio (Figura 21C). A morfologia dos surstilos é a que difere mais, eles são concavos em formato de “mão”, apresentam de 5 – 6 fileiras de dentes tanto em uma borda quanto na outra, dispostos na região interna e exibe também um tufo de pequenas cerdas na região inferior (Figuras 21 A, C). O hipândrio é alongado (Figura 21C). O edeago apresenta um par de processos ventrais bifurcados (Figura 21D). A porção dorsal do edeago apresenta uma estrutura única e membranosa, que recobre o par de processos ventrais. A capa do edeago é lisa e serrilhada, não possui nenhum tipo de escamas ou cerdas, o ápice é membranoso (Figuras 21B, D, E). Os paramêros ventrais são curtos e finos (Figura 21D). O apódema é longo (Figura 21D).

Subgrupo *elliptica*: *D. emarginata* (Figuras 22A-D): O epândrio apresenta ganchos quitinosos na região angular inferior, nomeados como parameros ventrais (Figura 22D), similares aos do subgrupo *sturtevantii*. Possuem também dois processos logo abaixo dos surstilos (Figura 22D), semelhantes aos das espécies do subgrupo *saltans*, porém não em formas de dedos de luvas, mas sim achatados em sua extremidade. Os surstilos são alongados (Figura 22D), apresentam de 30 – 35 dentes quitinosos, dispostos irregularmente por toda região interna, mais 6 dentes primários mais finos dispostos em fileira e um tufo de longas cerdas. O hipândrio é mais alongado e fino do que nas demais espécies (Figura 22A). O edeago é maior em relação a todas outras espécies do grupo *saltans* e em formato de foice. O eixo central

do edeago apresenta uma fenda na região dorsal recoberta com escamas (Figura 22B), possui o ápice em forma de gancho, com terminação bipartida pontiaguda (Figuras 22B-C). O edeago ainda apresenta dois processos laterais (PrL) (Figuras 22B-C) grandes e longos, que estão em continuidade com os parâmeros ventrais e se estendem por todo comprimento do eixo central. Os parâmeros ventrais são fundidos na extremidade (Figura 22C). O apódema é largo e curto. *D. neoelliptica* (Figuras 23A-E): esta espécie possui as estruturas muito semelhantes às de *D. emarginata*. Os surstilos (Figuras 23A, C) apresentam um número menor de dentes, sendo em média 20 dentes quitinosos, dispostos irregularmente por toda região interna, mais 6 dentes primários mais finos dispostos em fileira e um tufo de longas cerdas. A diferença mais notável em relação a *D. emarginata* se encontra no edeago, pela presença de uma protuberância ventral, chamada de crista ventral (CV) (Figuras 23B, E). O eixo central do edeago também se diferencia de *D. emarginata* por apresentar uma longa protuberância ventral. Outra característica que se diferencia da espécie descrita acima, é o apódema um pouco mais longo (Figura 23E). *D. neosaltans* (Figuras 24A-E): Apesar desta espécie pertencer ao subgrupo *elliptica*, ela é a que mais se diferencia das demais do seu subgrupo. O epândrio não apresenta os parâmeros ventrais na região angular inferior e sim duas pequenas saliências (Figura 24C). Os surstilos possuem um maior número de dentes, cerca de 34 dentes quitinosos, dispostos irregularmente por toda região interna, mais 7 dentes primários mais finos dispostos em fileira e um tufo de longas cerdas (Figuras 24B-C). O hipândrio é semelhante, alongado e fino (Figura 24C). O edeago é o que mais se difere das demais espécies do subgrupo, pois ele é menor e o ápice não termina em formato de gancho, mas sim em formato cilíndrico, formando um sulco em sua extremidade (Figuras 24A-E). A porção dorsal do edeago é recoberta por longas estruturas semelhantes a escamas. Assim como em *D. neoelliptica*, esta espécie apresenta estrutura denominada de crista ventral, porém sendo duas isoladas protuberâncias no eixo central e ventral do edeago, recobertas por escamas (Figura 24A, E). Os processos laterais do edeago são menores e se afunilam na extremidade (Figuras 24A, D, E). Os parâmeros ventrais não são fundidos (Figura 24E). O apódema também é mais longo (Figura 24E).

Subgrupo *cordata*: *D. neocordata* (Figuras 25A-E): O epândrio exibe placa anal em formato de U. O surstilo é formado por placas cuticulares, apresenta uma fileira de 5 a 6 dentes e na porção inferior um tufo de longas cerdas; ainda há uma

estrutura denominada de processo do surstilo (PrS) (Figura 25E) que estão em conexão com os surstilos. O edeago apresenta um par de ganchos quitinosos (GQ) (Figuras 25A, B, C) na região frontal do ápice, que se estendem à região ventral do corpo do edeago. Há um par de longas protuberâncias, serrilhadas na borda, dispostos lateralmente ao edeago, sugerindo a possibilidade de ser os processos laterais fundidos ao corpo do edeago (Figura 25B). Os paramêros ventrais (Figuras 25B, C, D) são unidos na base e ao apódema, eles são longos, finos e bifurcados na região média, são também dobrados para dentro em suas extremidades, as quais alcançam e encaixam-se nos ganchos quitinosos. Ainda na base dos parâmetros ventrais, na região central, há a presença de uma lâmina quitinosa abaulada (LQ), dispondo de um par de cerdas (Figura 25C). O apódema é curto e fino (Figuras 25B, D).

Grupo externo: *D. willistoni* (Figuras 26A-F): Os surstilos (Figuras 26B-D) são côncavos e formados por duas partes, uma apical maior que apresenta dentes primários e uma menor apresentando dentes secundários que é fundida a parte maior. Os dentes dos surstilos são dispostos apenas no bordo da região interna. O hipândrio é curto e largo, com uma morfologia quadrangular (Figuras 26A, B, F). A região dorsal do edeago é formada por uma placa que se estende até as laterais. A região dorsal desta placa apresenta uma projeção tubular que se estende pelo corpo do edeago e termina no ápice do edeago. Os parâmeros ventrais do edeago são curtos e grossos e o apódema é curto e fino (Figura 26E).

Tabela 6. Relação dos 48 caracteres morfológicos codificados e valores de índices de consistência (CI) e retenção (RI), para cada caractere. 0 = ausência, 1 = presença e 2 = presença com modificações.

0. Parâmeros ventrais do epândrio (CI = 33, RI = 66).	24. Capa do edeago (CI = 100, RI = 100).
1. Surstilo em formato semi elíptica (CI = 100, RI = 100).	25. Capa do edeago lisa com borda serrilhada (CI = 33, RI = 0).
2. Surstilo em formato de "mão" (não informativo).	26. Espículas na região dorsal da capa do edeago (não informativo).
3. Surstilo alongado ((CI = 100, RI = 100).	27. Cristas serrilhadas na capa do edeago (CI = 100, RI = 100).
4. Dentes dispostos por toda porção interna do surstilo (CI = 50, RI = 83).	28. Processo ventral do edeago (CI = 50, RI = 75).
5. Processo do surstilo (não informativo).	29. Processo ventral do edeago fundido (CI = 100, RI = 100).
6. Hipândrio longo (CI = 100, RI = 100).	30. Um par de processos ventrais (CI = 100, RI = 100).
7. Hipândrio com expansões paramedianas voltadas para dentro (não informativo).	31. Um par de processos ventrais bifurcados (não informativo).
8. Apodema longo (CI = 33, RI = 66).	32. Escamas na porção ventral superior do edeago (CI = 100, RI = 100).
9. Edeago em forma de foice (CI = 100, RI = 100).	33. Escamas no processo ventral do edeago (CI = 100, RI = 100).
10. Parâmeros ventrais do edeago fundidos na extremidade (CI = 100, RI = 100).	34. Processo ventral do edeago alargado (não informativo).
11. Parâmeros ventrais do edeago fundidos na base (não informativo).	35. Sulco na porção superior do processo ventral do edeago (CI = 100, RI = 100).
12. Parâmeros ventrais longos e bifurcados (não informativo).	36. Processo ventral do edeago fino e sem escamas (CI = 100, RI = 100).
13. Ápice do edeago com projeção puntiforme (CI = 100, RI = 100).	37. Processo ventral do edeago ligeiramente curvado (não informativo).
14. Projeção puntiforme do ápice do edeago curta (não informativo).	38. Processo ventral médio combinado com ápice do edeago resulta no formato de V (CI = 50, RI = 50).
15. Ápice do edeago bipartido (CI = 100, RI = 100).	39. Processo ventral médio combinado com ápice do edeago resulta no formato de C (não informativo).
16. Ápice do edeago cilíndrico (não informativo).	40. Processos laterais (CI = 100, RI = 100).
17. Ápice do edeago membranoso (não informativo).	41. Prolongamento ventral do edeago (CI = 100, RI = 100).
18. Região frontal do ápice do edeago com um par de ganchos (não informativo).	42. Prolongamento ventral do edeago ligeiramente serrilhado na porção média (CI = 100, RI = 100).
19. Cristas recoberta com escamas no ápice do edeago (não informativo).	43. Prolongamento ventral do edeago alargado e escuro (não informativo).
20. Sulco no ápice do edeago (não informativo).	44. Crista ventral do edeago (CI = 50, RI = 0).
21. Cerdas no ápice do edeago (CI = 33, RI = 33).	45. Par de cristas ventrais do edeago (não informativo).
22. Escamas no ápice do edeago (CI = 33, RI = 50).	46. Fenda dorsal do edeago (CI = 100, RI = 100).
23. Ápice do edeago recurvado para trás (CI = 100, RI = 100).	47. Lâmina quitinosa abaulada (não informativo).

Figura 10A-D. Eletromicrografia da terminália de *D. prosaltans*. (A) AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, Ep = epândrio, Es = escamas, PA = placa anal, PrEp = processo do epândrio, S = surstilos (590 x aumento). (B) A = apódema, AE = ápice do edeago, PIV = prolongamentos ventrais do edeago, PrV = processos ventrais do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago (707 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, Es = escamas (1.230 x aumento). (D) A = apódema, CE = capa do edeago, H = hipândrio, PrV = processo ventral do edeago (635 x aumento).

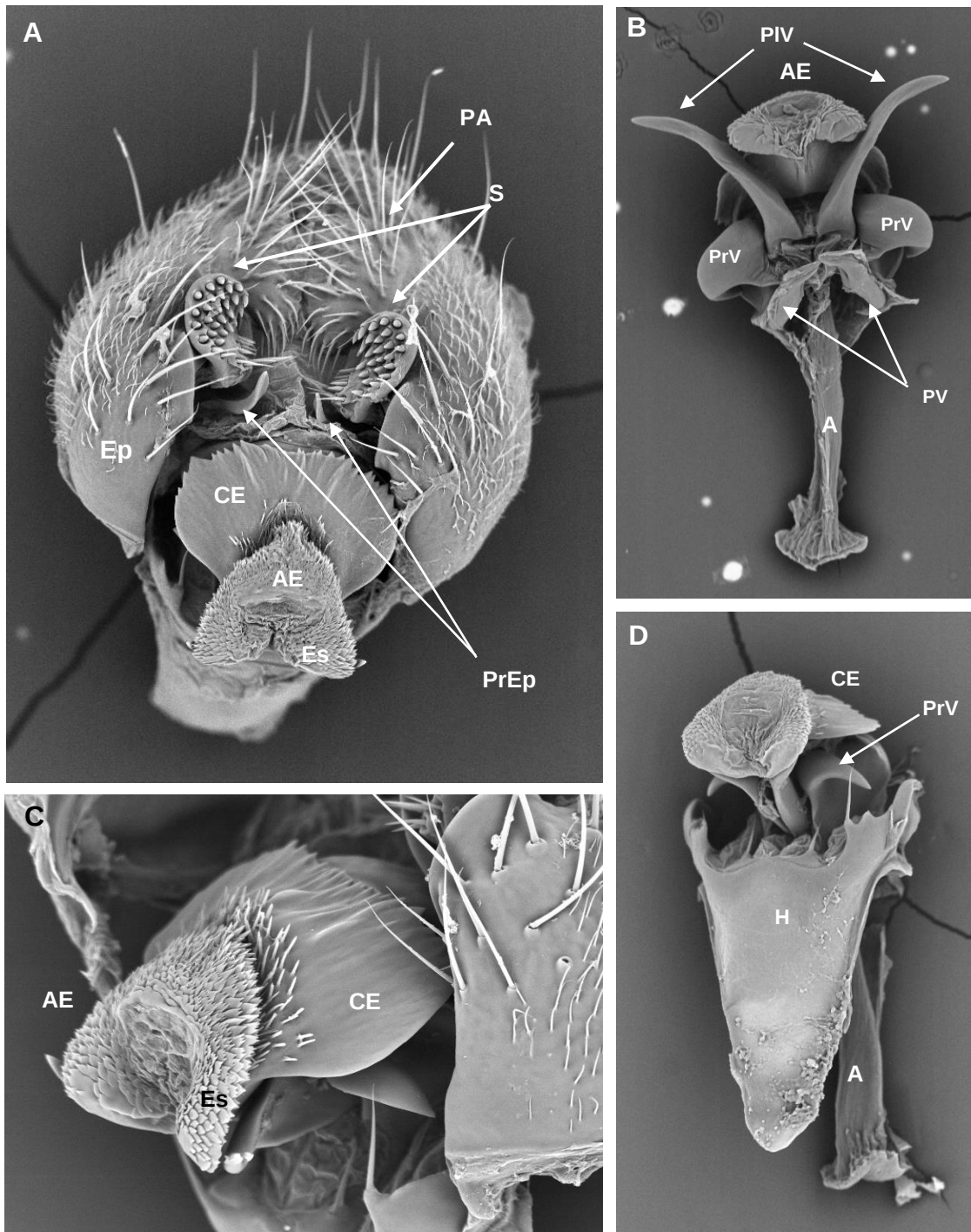


Figura 11A-E. Eletromicrografia da terminália de *D. saltans*. (A) A = apódema, AE = ápice do edeago, Ep = epândrio, H = hipândrio, S = surstilos (505 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, H = hipândrio, PIV = prolongamentos ventrais do edeago, PrV = processos ventrais do edeago (594 x aumento). (C) A = apódema, AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, PIV = prolongamentos ventrais do edeago, PrV = processos ventrais do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago (620 x aumento). (D) CE = capa do edeago, PrEp = processos do epândrio, S = surstilos (501 x aumento). (E) AE = ápice do edeago, CE = Capa do edeago, Ce = cerdas (1.360 x aumento).

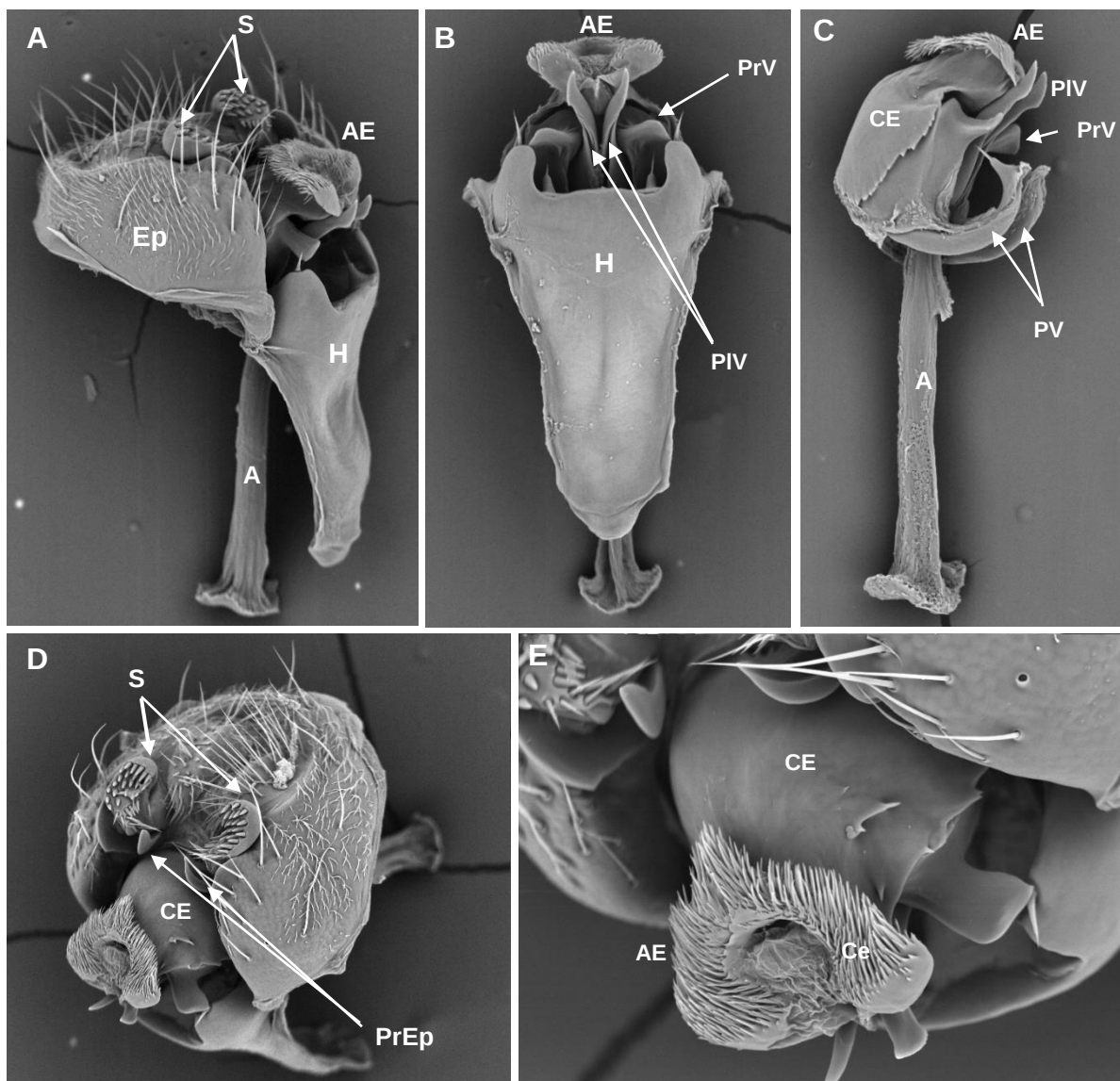


Figura 12A-C. Eletromicrografia da terminália de *D. lusaltans*. (A) AE = ápice do edeago, Ep = epândrio, ExP = extensões paramedianas do hipândrio, H = hipândrio, PrEp = processo do epândrio (683 x aumento). (B) CE = capa do edeago, PIV = prolongamento ventral do edeago, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago. A dupla cabeça de seta indica o ápice do edeago recoberto com cerdas e, a presença de um sulco que isola em duas protuberâncias (1.030 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, H = hipândrio (747 x aumento).

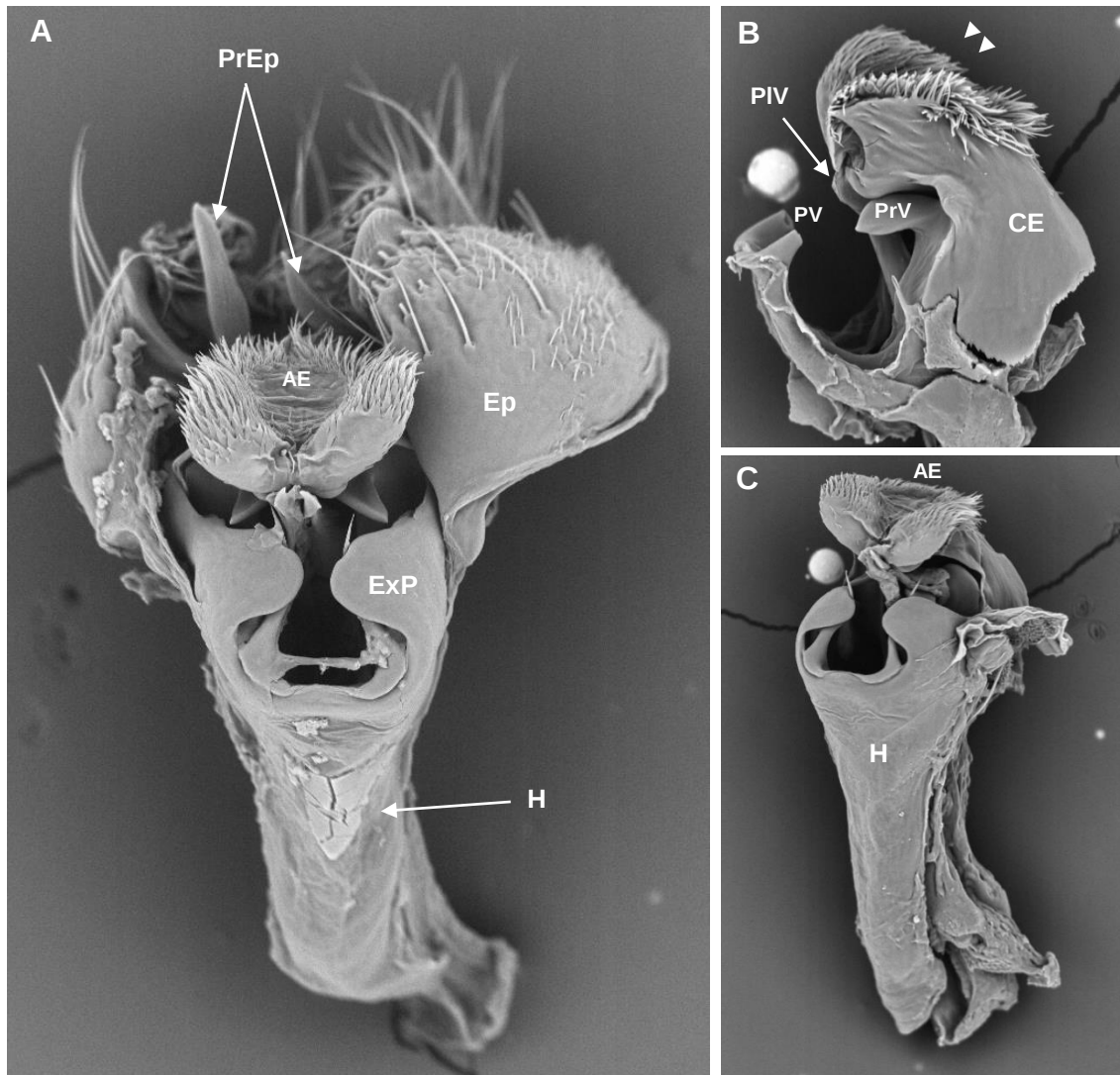


Figura 13A-D. Eletromicrografia de *D. austrosaltans*. (A) AE = ápice do edeago, Ep = epândrio, H = hipândrio, PA = placa anal, PrEp = processo do epândrio, S = surstilos (512 x aumento). (B) CA = crista apical, Es = escamas (1.310 x de aumento). (C) A = apódema, AE = ápice do edeago, CA = crista apical, H = hipândrio, PIV = prolongamentos ventrais do edeago (676 x aumento). (D) A = apódema, CA = crista apical, PIV = prolongamentos ventrais do edeago, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmetro ventral do edeago. A dupla cabeça de seta indica a capa do edeago, composta por cristas serrilhadas. (707 x aumento).

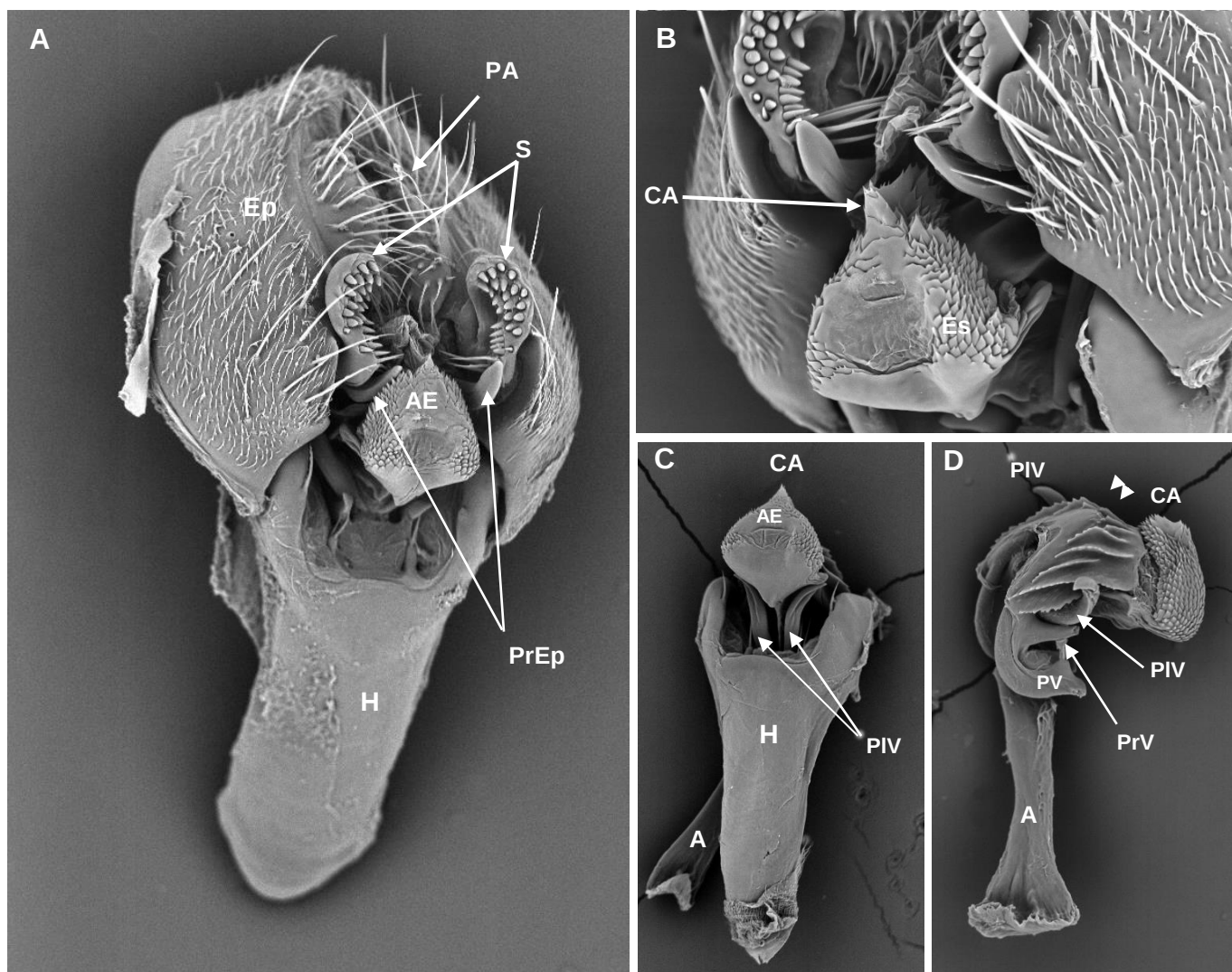


Figura 14A-D. Eletromicrografia da terminália de *D. septentriosaltans*. (A) AE = ápice do edeago, Ep = epândrio, H = hipândrio, PA = placa anal, PrEp = processo do epândrio, S = surstilos (574 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, Es = escamas, Fa = falotrema (1.900 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, Ep = epândrio (1.210 x aumento). (D) A = apódema, AE = ápice do edeago, PIV = prolongamentos ventrais do edeago, PrV = processo ventral do edeago. A dupla cabeça de seta indica a capa do edeago, composta por cristas serrilhadas. (765 x aumento).

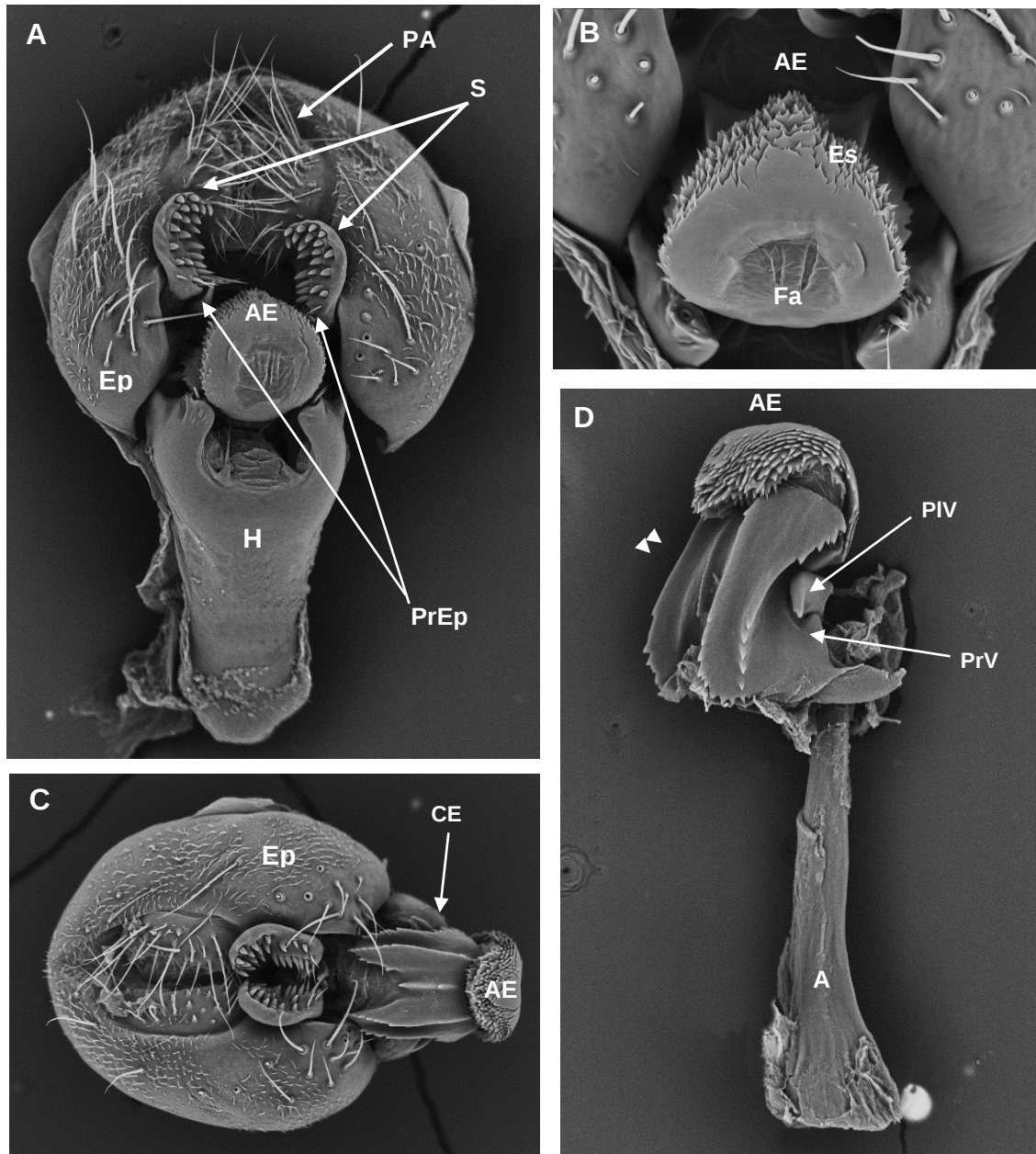


Figura 15A-E. Eletromicrografia da terminália de *D. nigrosaltans*. (A) Ep = epândrio, H = hipândrio, PA = placa anal, PrEp = processos do epândrio, S = surstilos (508 x aumento). (B) A = apódema, AE = ápice do edeago, PIV = prolongamento ventral do edeago, PrV = processos ventrais do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago. (849 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, PIV = prolongamento ventral do edeago, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago (1.060 x aumento). (D) AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, PIV = prolongamento ventral do edeago. A dupla cabeça de seta indica uma protuberância na região dorsal do edeago (910 x aumento). (E) AE = ápice do edeago, Ce = cerdas, Es = escamas, H = hipândrio (1.300 x aumento).

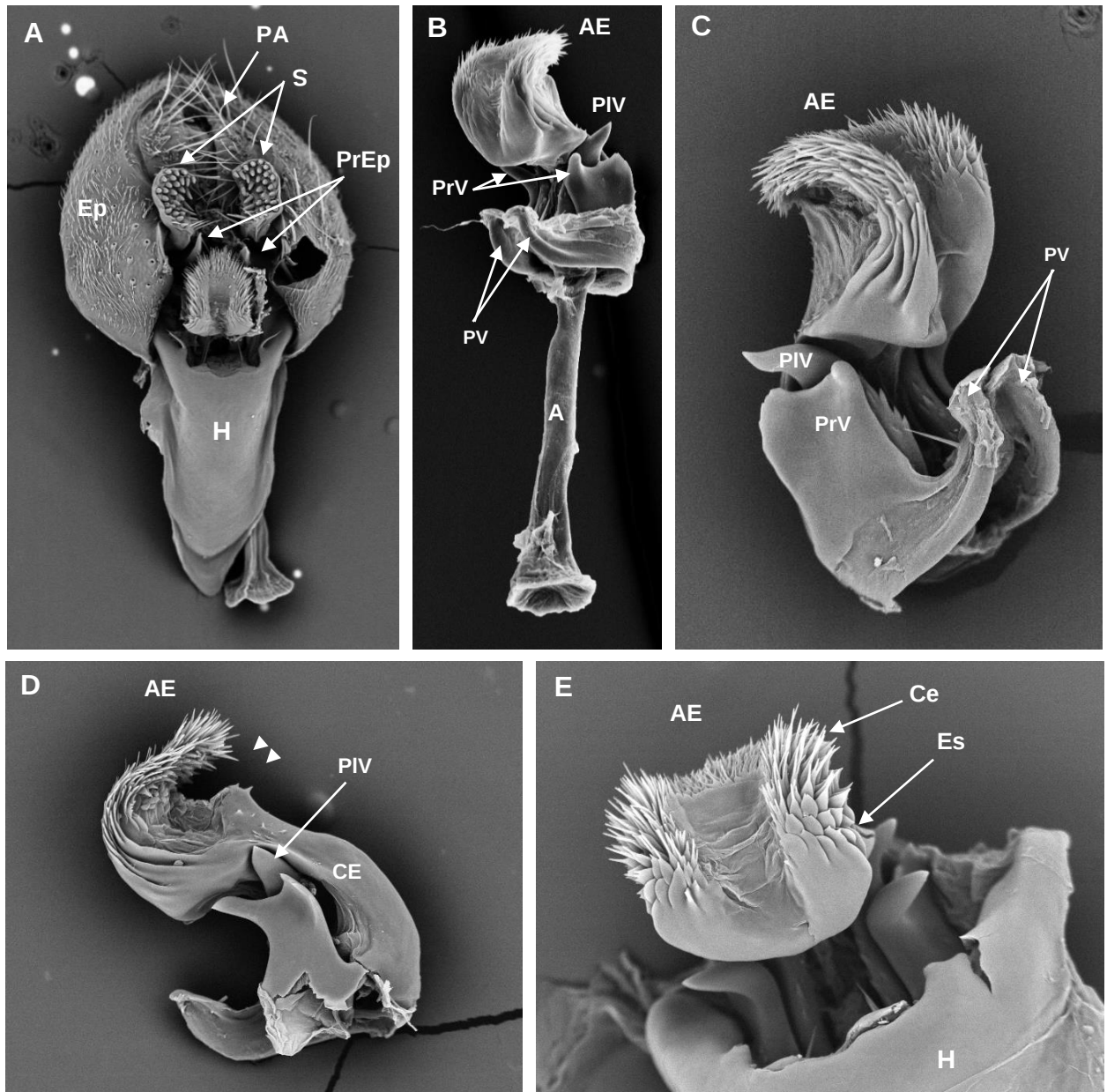


Figura 16A-E. Eletromicrografia da terminália de *D. pseudosaltans*. (A) Ep = epândrio, H = hipândrio, PA = placa anal, PrEp = processos do epândrio, S = surstilos (576 x aumento). (B) A = apódema, AE = ápice do edeago, PIV = prolongamento ventral do edeago, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago. (747 x aumento). (C) Ep = epândrio, H = hipândrio, PIV = prolongamentos ventrais do edeago (532 de aumento). (D) AE = ápice do edeago, PIV = prolongamentos ventrais do edeago (1.210 x aumento). (E) AE = ápice do edeago, Ce = cerdas, Es = escamas (975 x aumento).

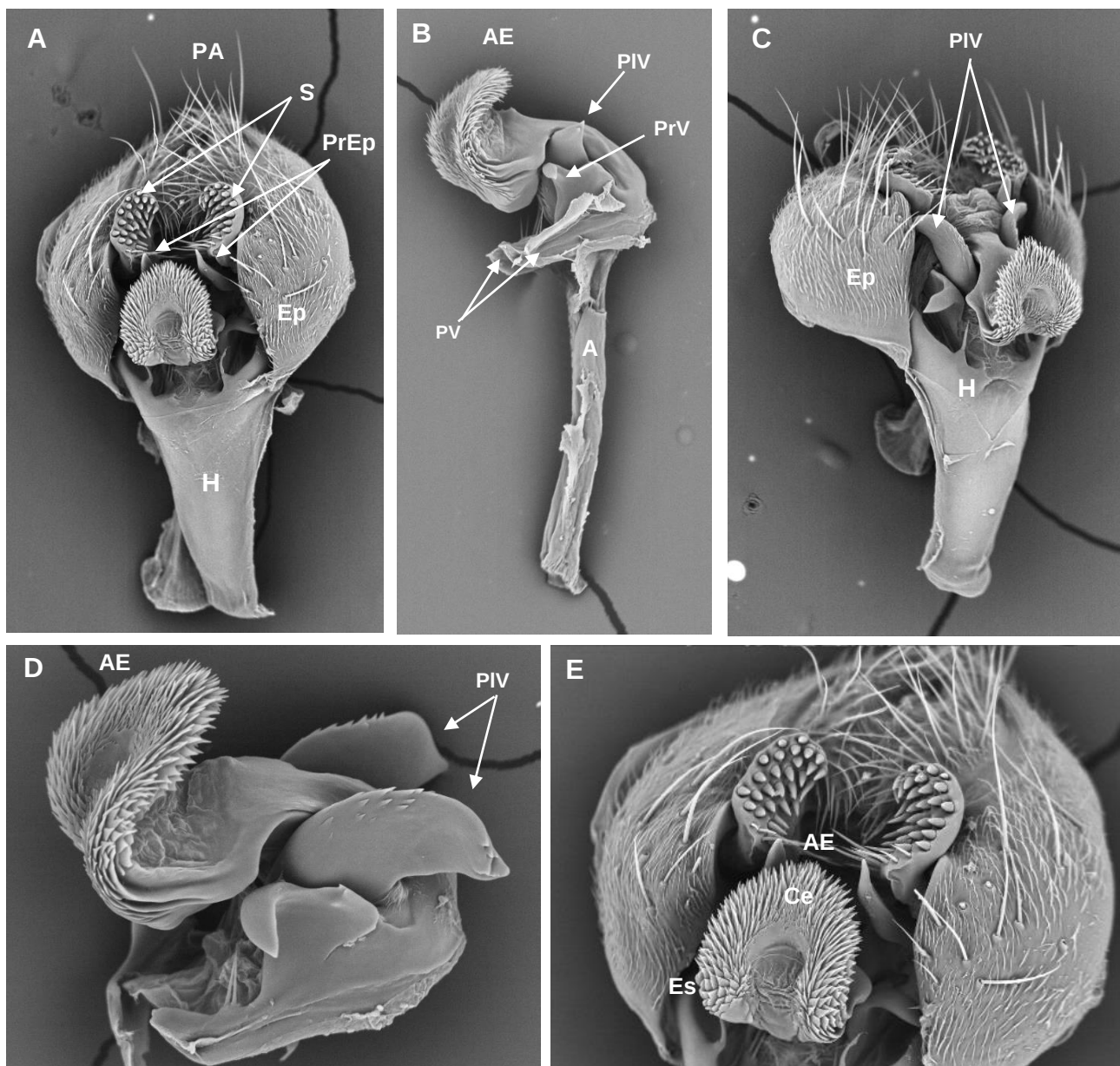


Figura 17A-C. Eletromicrografia da terminália de *D. sturtevantii*. (A) Ep = epândrio, Fa = falotrema, H = hipândrio, PA = Placa anal, PVEp = Parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (630 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, Es = escamas, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmero ventral do edeago (1.490 x aumento). (C) Fa = falotrema, PVEp = Parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (1.470 x aumento).

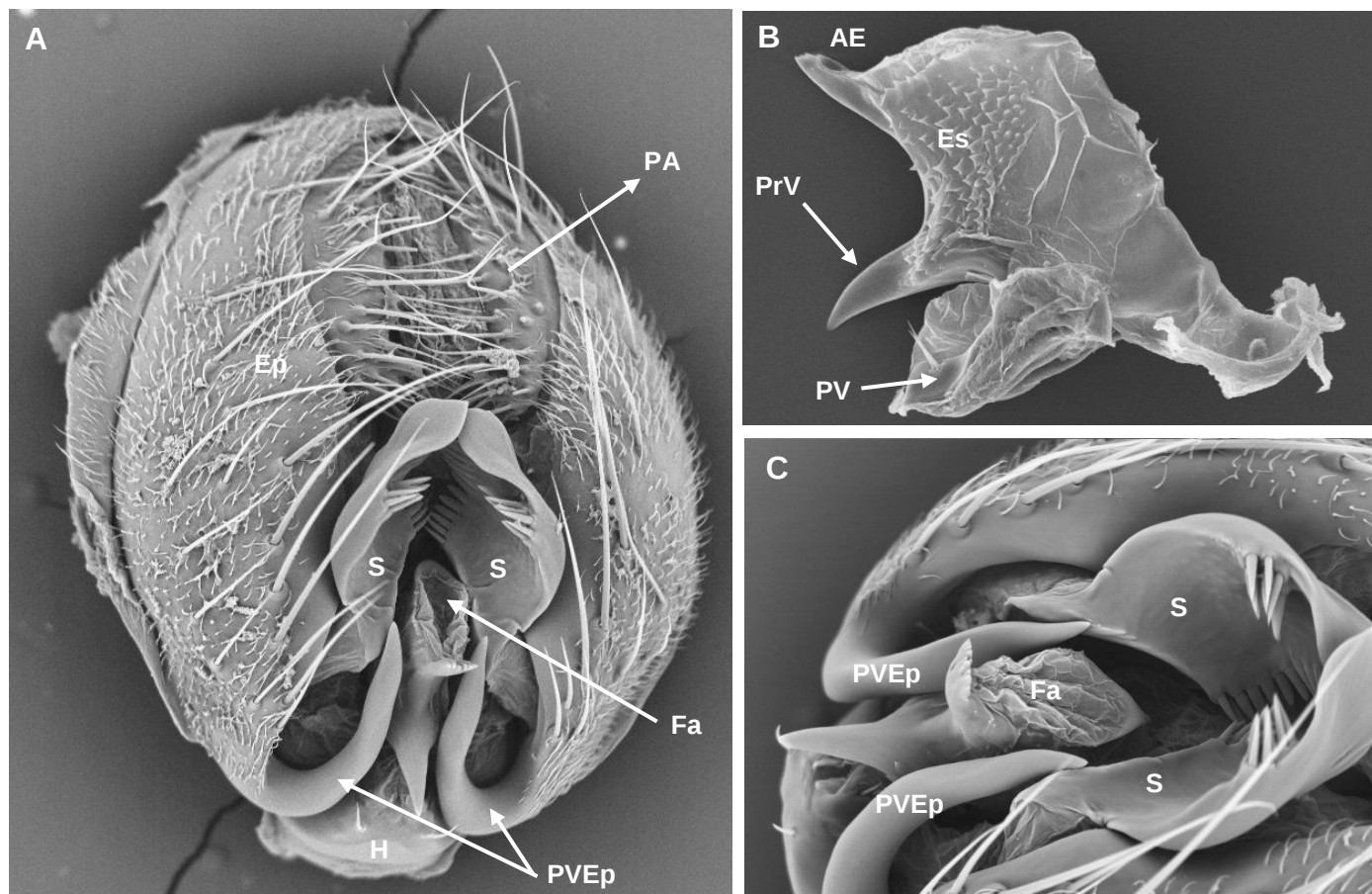


Figura 18A-C. Eletromicrografia da terminália de *D. sturt-like*. (A) Ep = epândrio, Fa = falotrema, PA = placa anal, PVEp = parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (526 x aumento). (B) A = apódema, AE = ápice do edeago, Es = escamas, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmero ventral (1.020 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, Es = escamas, Fa = falotrema (2.260 x aumento).

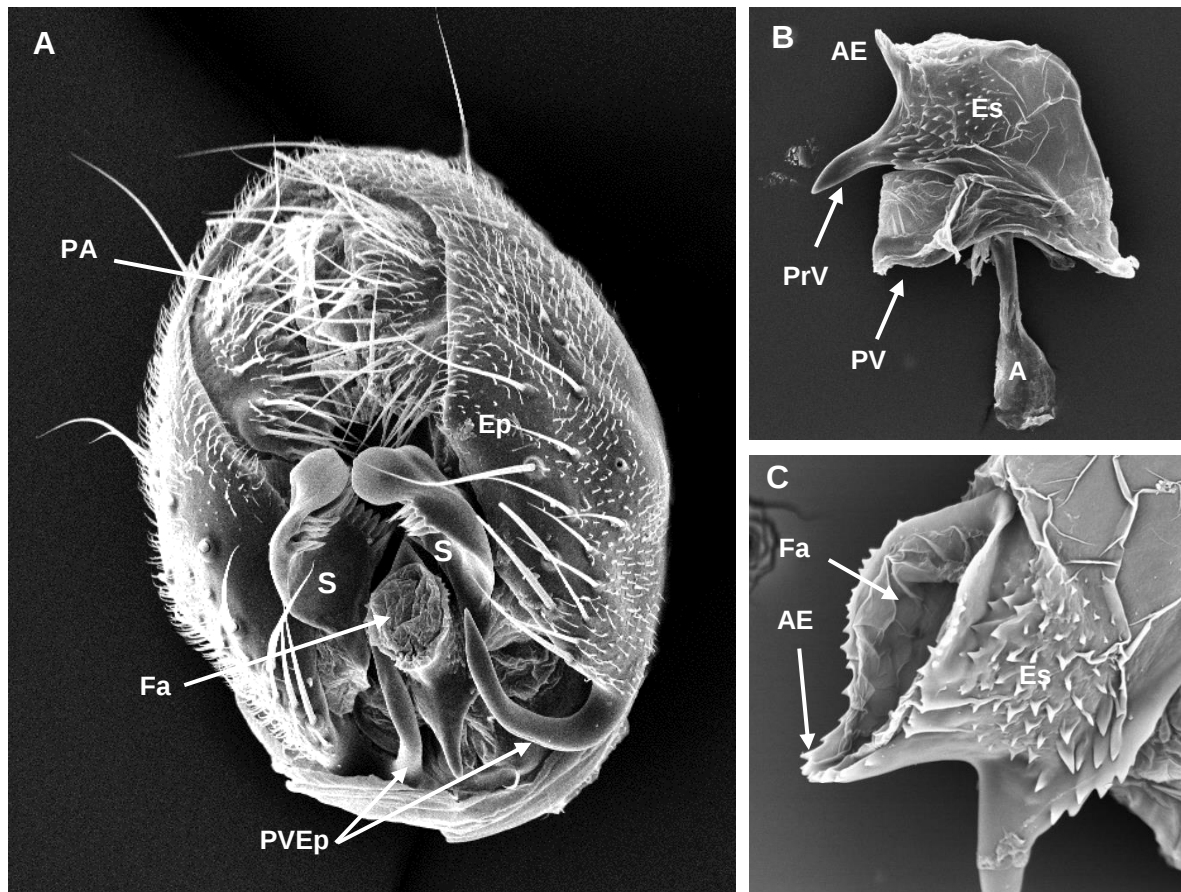


Figura 19A-C. Eletromicrografia da terminália de *D. dacunhai*. (A) Ep = epândrio, Fa = falotrema, PA = placa anal, PVEp = parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (680 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, Fa = falotrema, PVEp = Parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (1.570 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, Es = escamas, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmero ventral do edeago. A dupla cabeça de seta indica um sulco formado pela presença de escamas pontiagudas no processo ventral do edeago (1.680 x aumento).

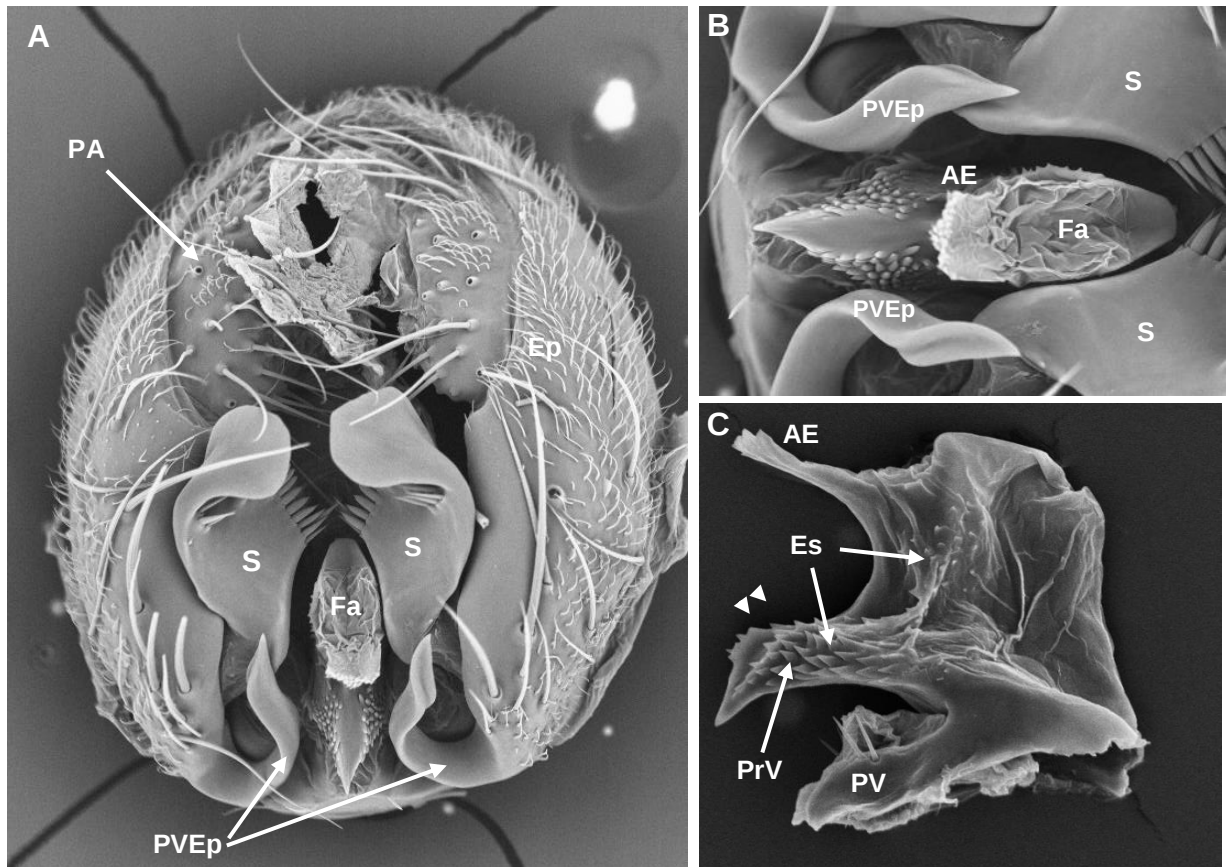


Figura 20A-C. Eletromicrografia da terminália de *D. milleri*. (A) Ep = epândrio, Fa = falotrema, PA = placa anal, PVEp = Parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (673 X aumento). (B) AE = ápice do edeago, Es = escamas, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmero ventral do edeago (1.230 X aumento). (C) Fa = falotrema, S = surstilos. A dupla cabeça de seta indica um sulco formado pela presença de escamas pontiagudas no processo ventral do edeago, assim como foi observado em *D. dacunhai* (1.210 X aumento).

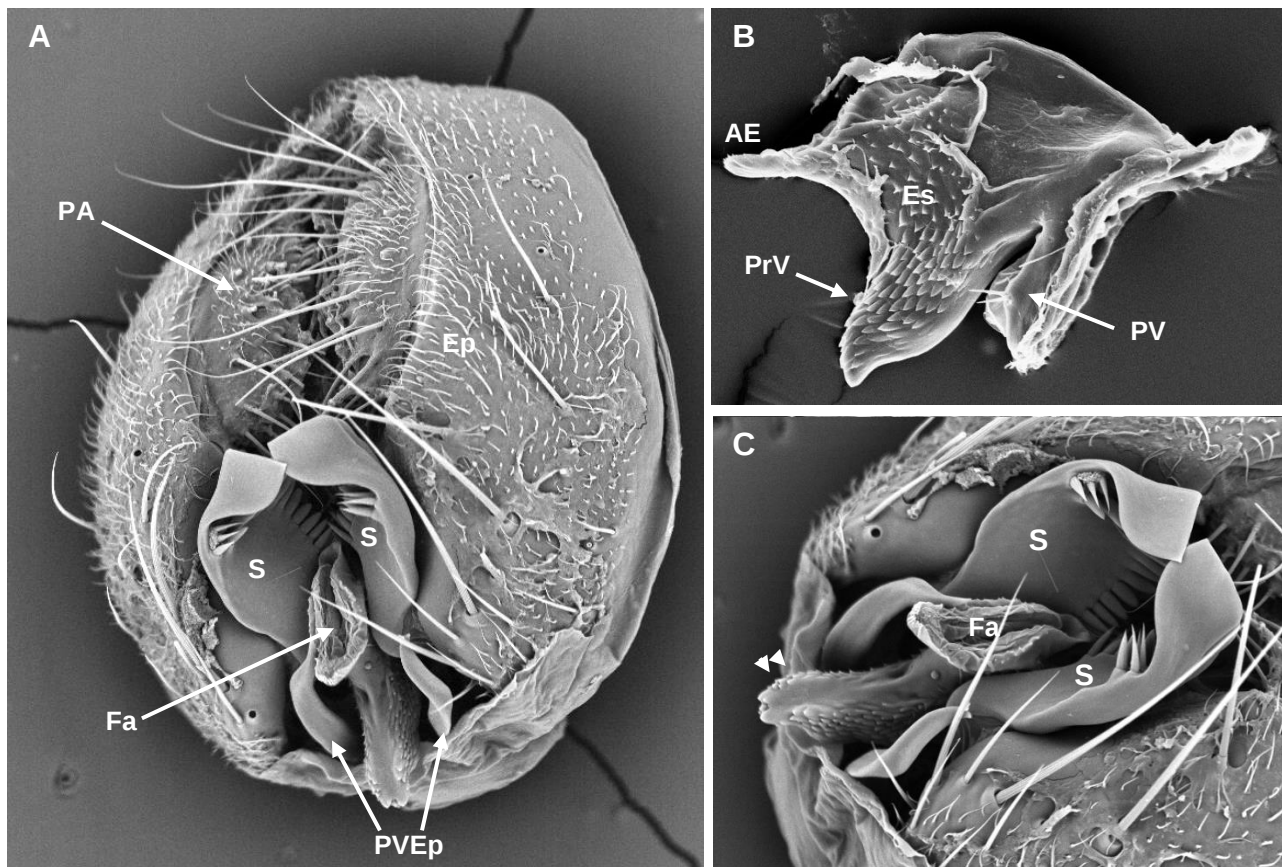


Figura 21A-E. Eletromicrografia de *D. parasaltans*. (A) S = surstilo (3.160 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, Fa = falotrema (1.410 x aumento). (C) H = hipândrio, PrEp = processos do epândrio, PVEp = parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (523 x aumento). (D) A = apódema, AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago, PrV = processo ventral do edeago, PV = parâmeros ventrais do edeago (590 x aumento). (E) AE = ápice do edeago, CE = capa do edeago (1.960 x aumento).

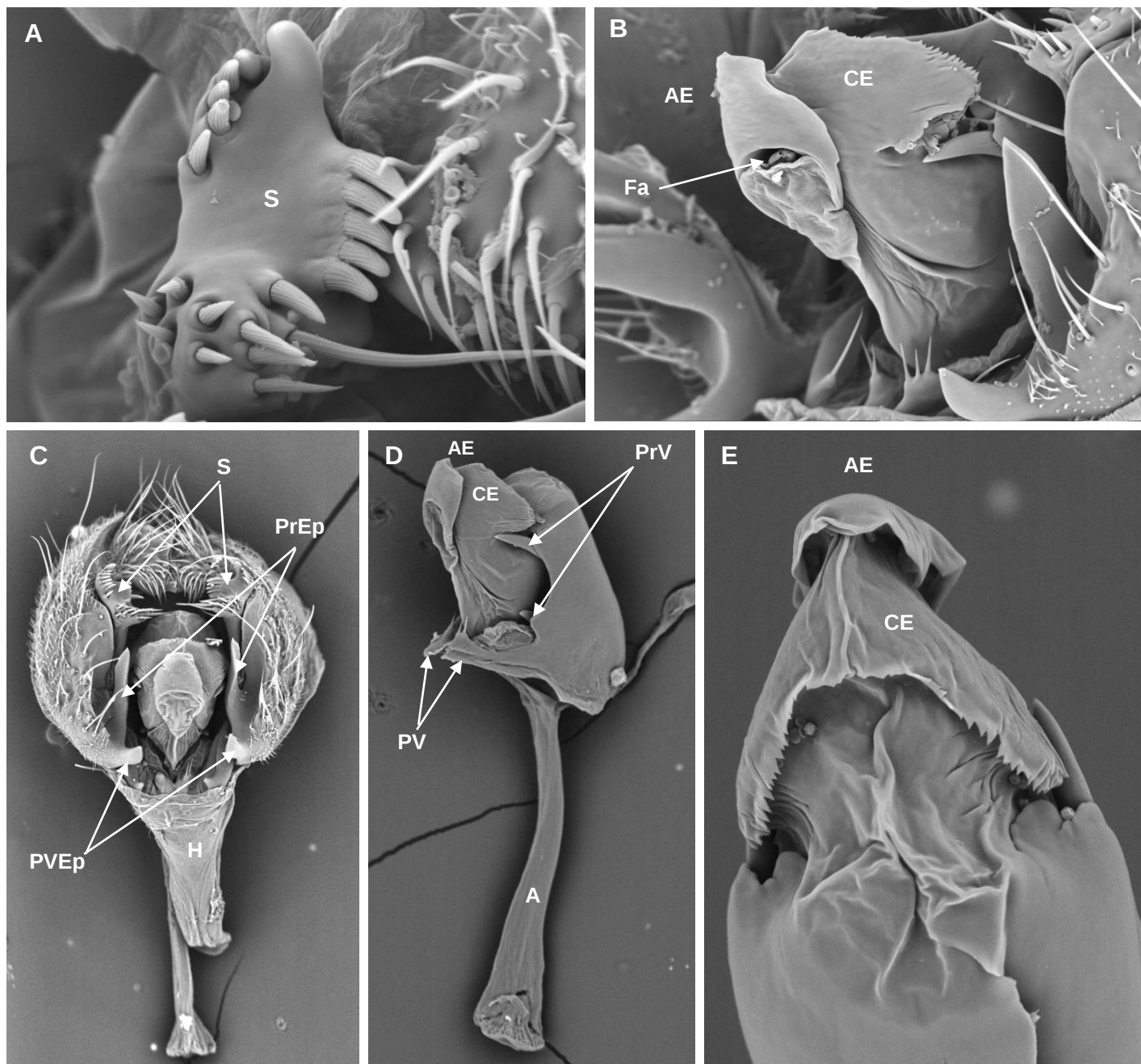


Figura 22A-D. Eletromicrografia da terminália de *D. emarginata*. (A) H = hipândrio, (554 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, PrL = processos laterais do edeago. A dupla cabeça de seta indica uma fenda na região dorsal recoberta com escamas (727 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, PV = parâmero ventral do edeago, PrL = processos laterais do edeago (398 x aumento). (D) Ep = epândrio, PA = placa anal, PrEp= processos do epândrio, PVEp = parâmeros ventrais do epândrio, S = surstilos (491 x aumento).

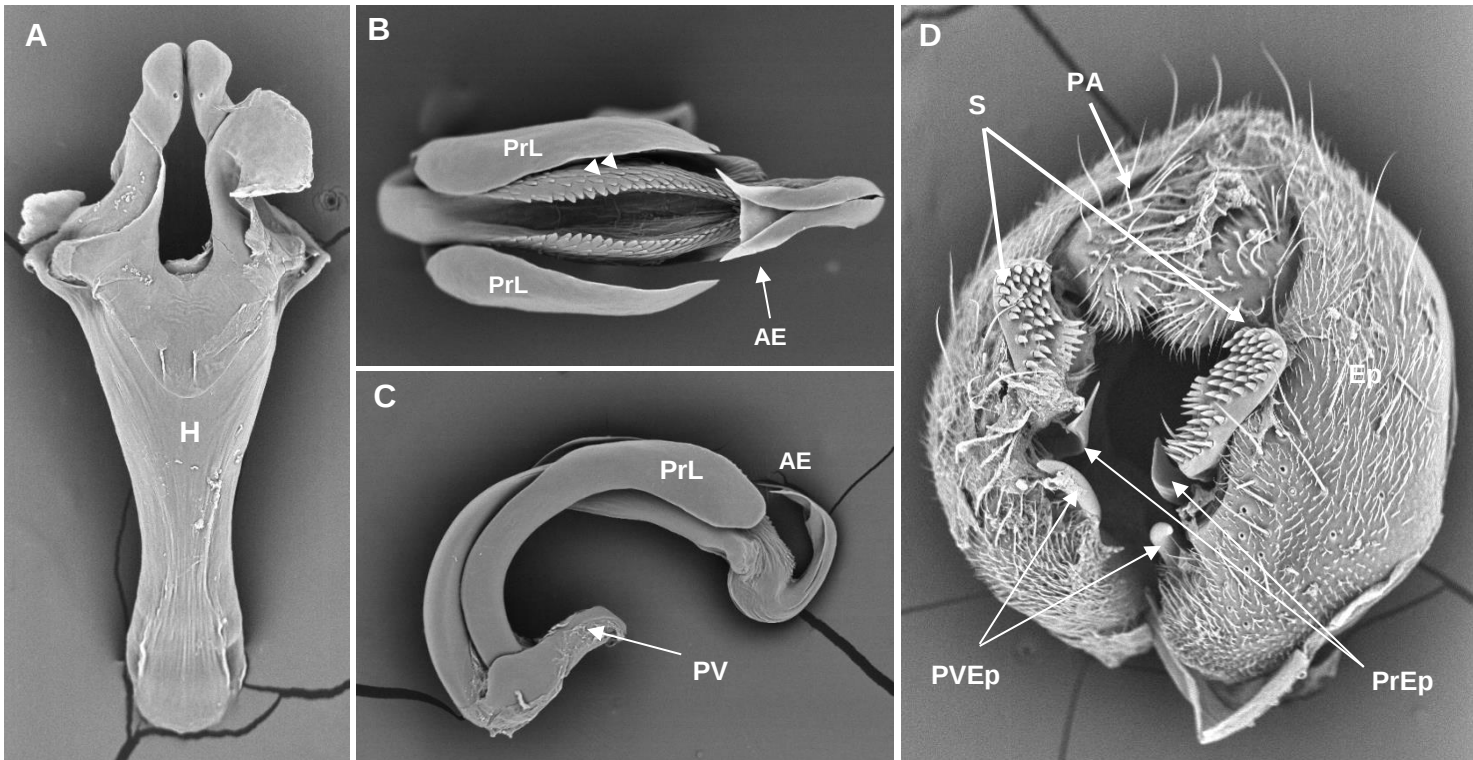


Figura 23A-E. Eletromicrografia da terminália de *D. neoelliptica*. A. S = surstilos (1.360 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, CV = crista ventral do edeago, PV = parâmetro ventral do edeago (707 x aumento). (C) Ep = epândrio, H = hipândrio, S = surstilos, PVEp = parâmetros ventrais do epândrio (384 x aumento). (D) H = hipândrio, PrEp = processos do epândrio, PrL = processos laterais do edeago. A dupla cabeça de seta indica uma fenda na região dorsal recoberta com escamas (389 x aumento). (E) A = apódema, AE = ápice do edeago, CV = crista ventral do edeago, PrL = processo lateral do edeago, PV = parâmetro ventral do edeago (377 x aumento).

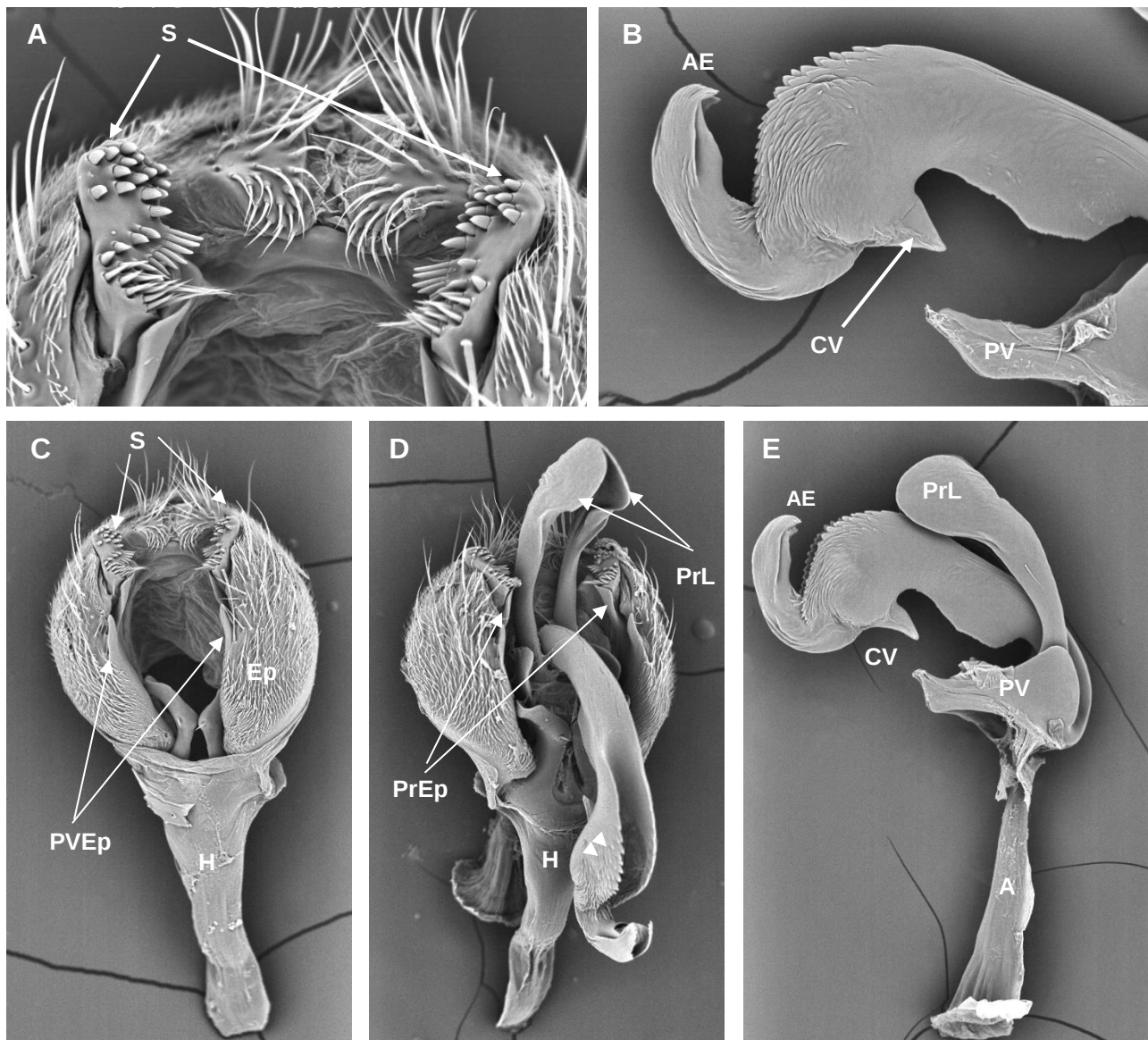


Figura 24A-E. Eletromicrografia da terminália de *D. neosaltans*. (A) AE = ápice do edeago, CV = cristas ventrais do edeago, PrL = processo lateral do edeago (1.220 x aumento). (B) AE = ápice do edeago, S = surstilos (1.230 x aumento). (C) AE = ápice do edeago, Ep = epândrio, H = hipândrio, S = surstilos, PrEp = processos do epândrio. A dupla cabeça de seta indica pequenas saliências no epândrio, no mesmo local onde é encontrado os parâmeros ventrais do epândrio nas demais espécies do subgrupo *elliptica* (432 x aumento). (D) AE = ápice do edeago, PrL = processos laterais do edeago (380 x de aumento). (E) A = apódema, AE = ápice do edeago, CV = crista ventral do edeago, PrL = processo lateral do edeago, PV = parâmero ventral do edeago (457 x aumento).

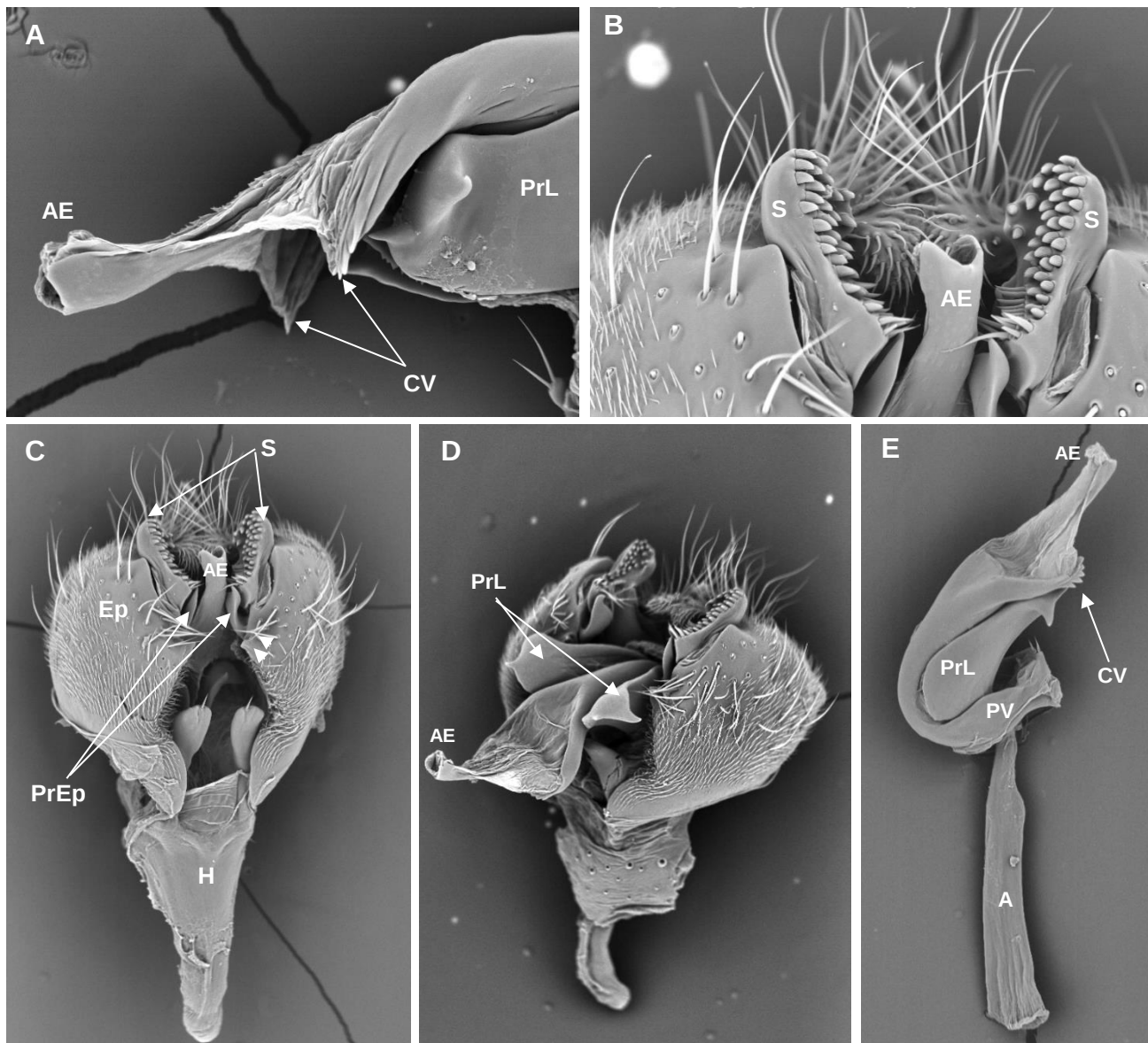


Figura 25A-E. Eletromicrografia da terminália de *D. neocordata*. (A) AE = ápice do edeago, GQ = ganchos quitinosos (1.180 x aumento). (B) A = apódema, AE = ápice do edeago, GQ = ganchos quitinosos, PV = parâmeros ventrais do edeago. A dupla cabeça de seta indica um par de longas protuberâncias, serrilhadas na borda, dispostos lateralmente ao edeago (801 x aumento). (C) LQ = lâmina quitinosa, PV = parâmeros ventrais do edeago (1.110 x aumento). (D) A = apódema, AE = apódema, GQ = ganchos quitinosos, PV = parâmeros ventrais do edeago. (236 x aumento). (E) PrS = processo do surstilo, S = surstilos (1.730 x aumento).

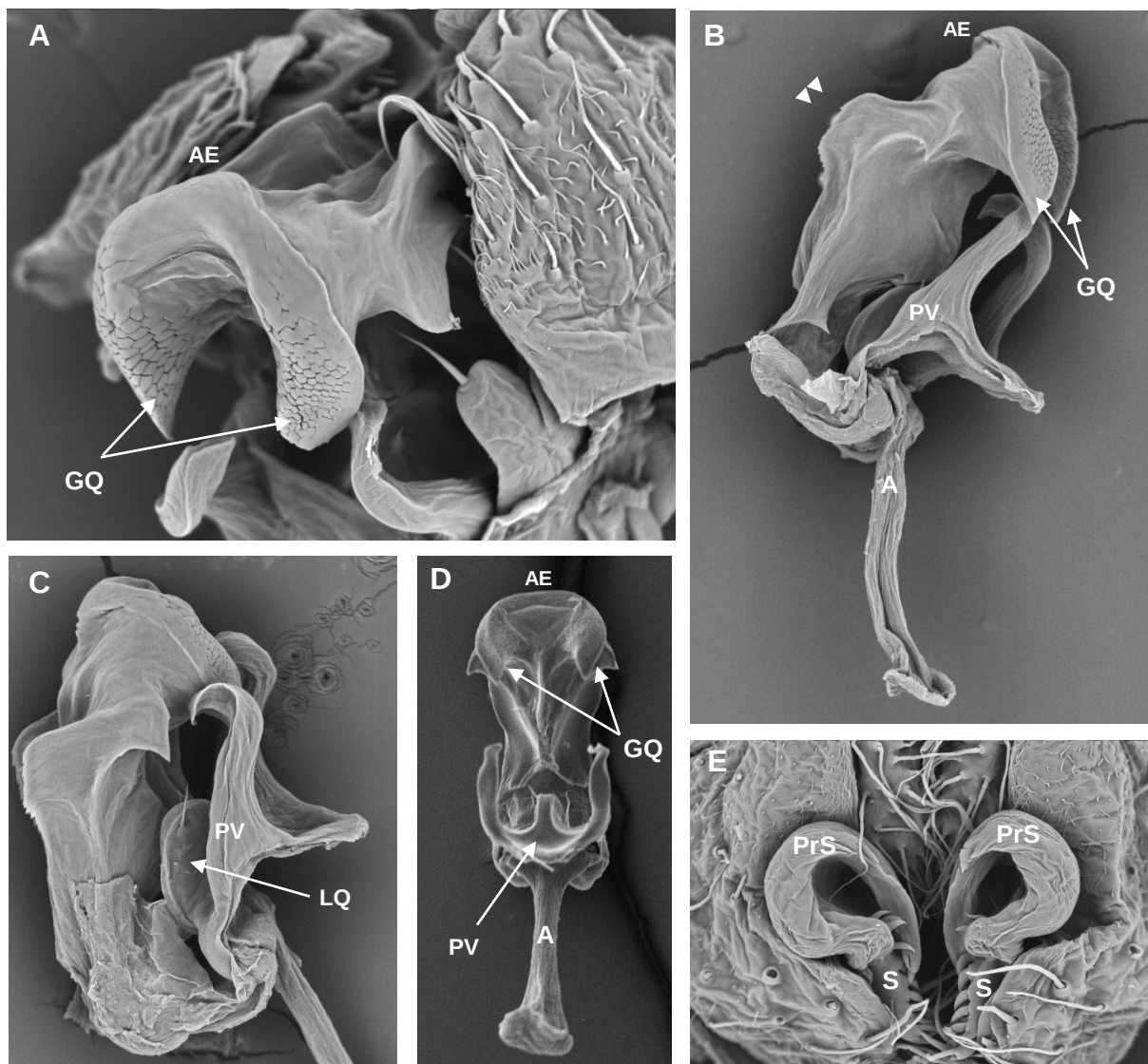
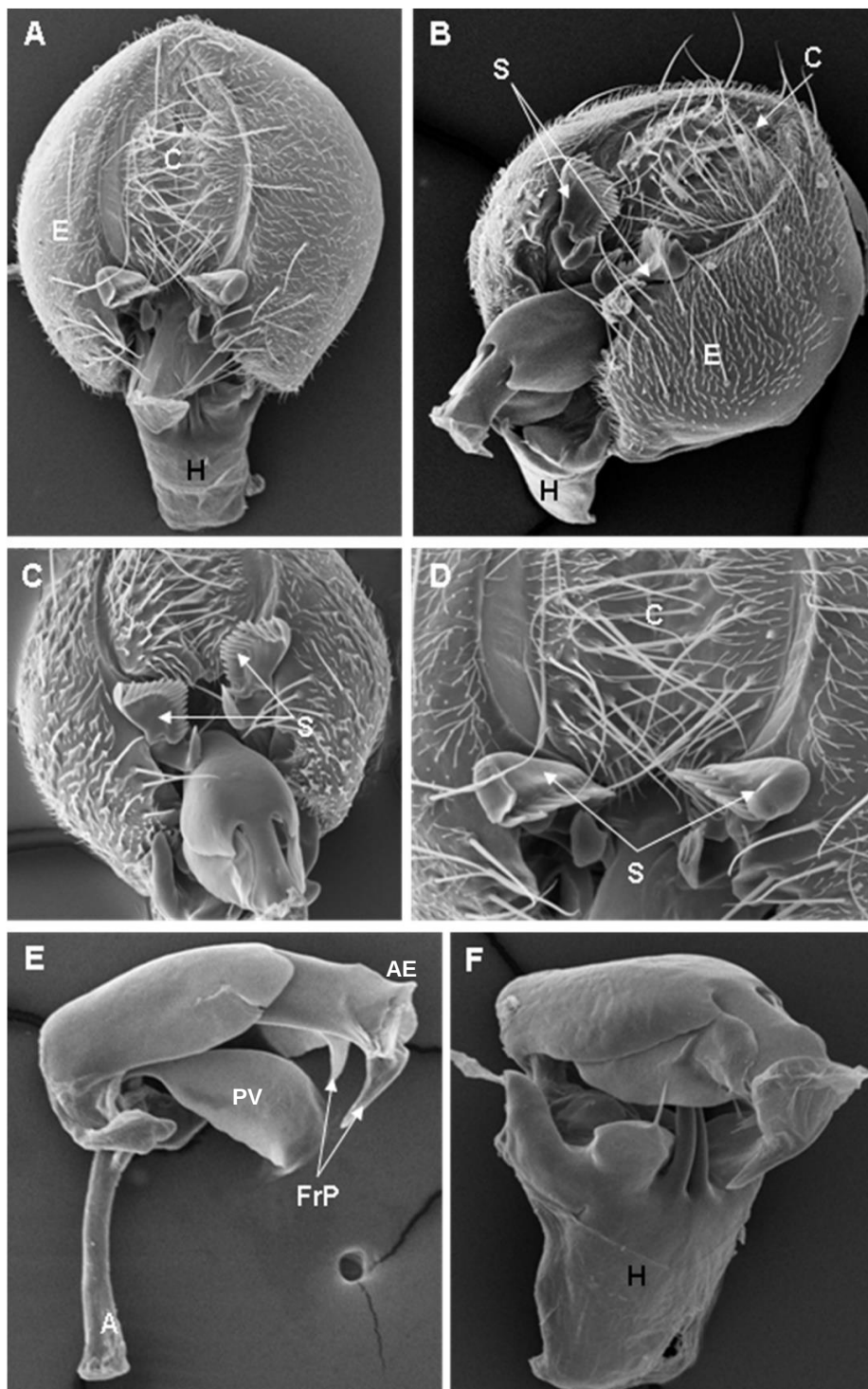


Figura 26A-F. Eletromicrografia da terminália de *D. willistoni*. (A) C = placa anal, E = epândrio, H = hipândrio (171 x aumento); (B) C = placa anal, epândrio, H = hipândrio, S = surstilos (178 x aumento); (C) S = surstilos, (337 x aumento); (D) C = Placa anal, S = surstilos, (510 x aumento); (E) A = apódema, AE = ápice do edeago, FrP = processo frontal, PV = parâmetro ventral (268 x aumento); (F) H= hipândrio, (304 x aumento). Fonte: SOUZA et al., 2014.



4.1.1. Máxima parcimônia

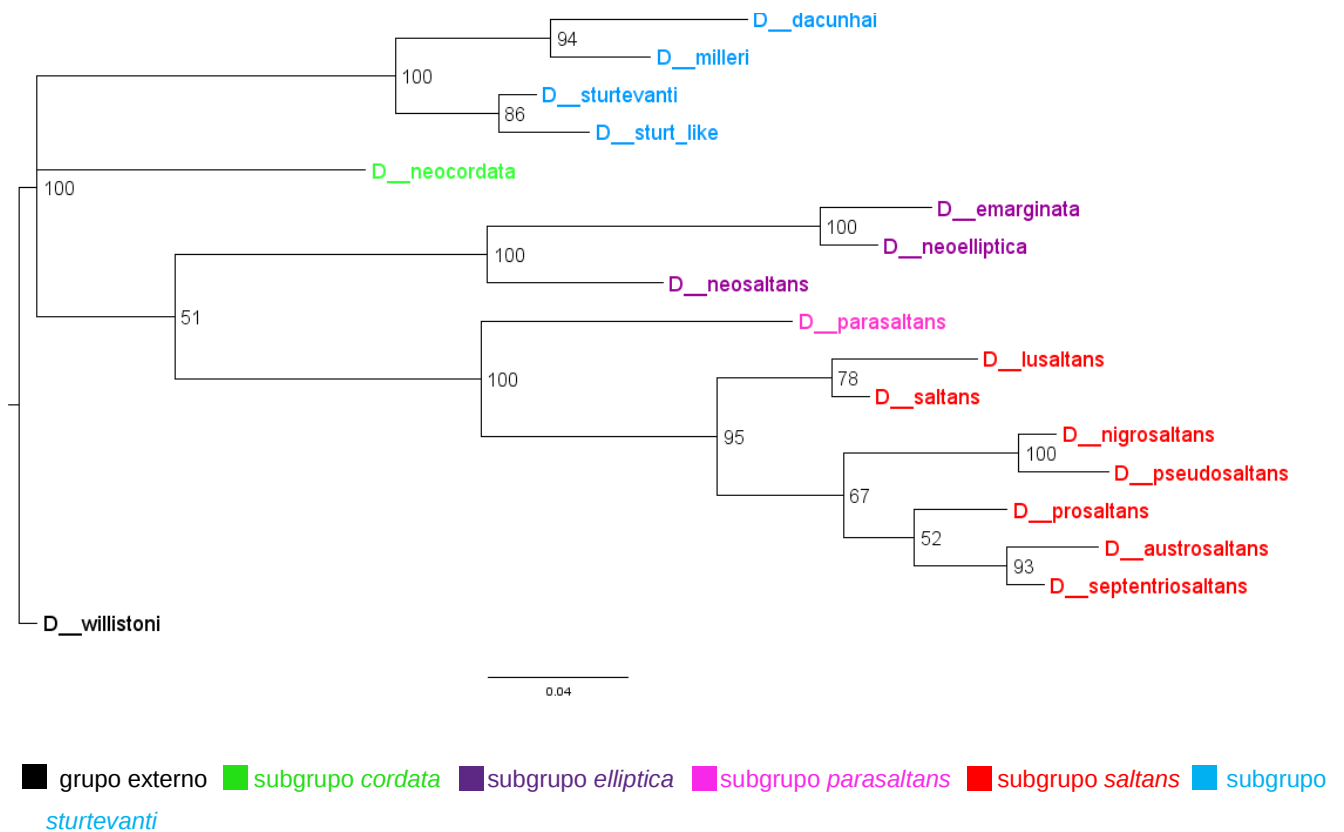
Para a análise de máxima parcimônia foram utilizados 48 caracteres morfológicos, os quais 29 foram informativos. A análise resultou em oito árvores igualmente parcimoniosas e a partir destas foi calculado o consenso estrito, apresentado na figura 27. O índice de consistência (CI) foi de 0,77 e índice de retenção (RI) de 0,84.

O relacionamento entre os subgrupos não foi recuperado, devido a uma politomia e ao baixo valor de suporte. No entanto, as espécies se agruparam em seus subgrupos. As espécies do subgrupo *sturtevanti* foram agrupadas em um clado, com alto suporte (96%) e sustentados pelos caracteres 0, 13, 28, 29 e 32. As espécies do subgrupo *elliptica* foram agrupadas em um clado (80%), formando dois clados internos, um constituído por *D. emarginata* e *D. neoelliptica* (82%) e outro pela espécie *D. neosaltans*. As espécies do subgrupo *saltans*, resultaram em uma politomia, suportando apenas o relacionamento entre as espécies irmãs *D. nigrosaltans* e *D. pseudosaltans* (88%).

4.1.2. Inferência Bayesiana

Os mesmos 48 caracteres morfológicos foram utilizados para a análise de Inferência Bayesiana, resultando em uma árvore com alto suporte para maioria dos nós. Uma politomia foi gerada não recuperando a maioria dos relacionamentos entre os subgrupos. Os subgrupos *parasaltans* e *saltans* posicionaram-se como clados irmãos, com alto suporte. As espécies do subgrupo *sturtevantii* se agruparam e formaram com alto suporte dois clados internos, um composto por *D. dacunhai* e *D. milleri* e outro por *D. sturtevantii* e *D. sturt-like*. O clado composto pelas espécies do subgrupo *elliptica* formaram dois clados internos, um constituído por *D. emarginata* e *D. neoelliptica* e próximo a estes *D. neosaltans*. O clado constituído pelas espécies do subgrupo *saltans* suportou apenas a subdivisão de 3 clados internos, um constituído pelas espécies *D. lusaltans* e *D. saltans*, outro por *D. nigrosaltans* e *pseudosaltans* e por fim *D. austrosaltans* e *D. septentriosaltans* (Figura 28).

Figura 28. Relações filogenéticas inferidas por critério de Inferência Bayesiana, entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, baseada em marcadores morfológicos. Valores de probabilidade posterior localizados nos nós.



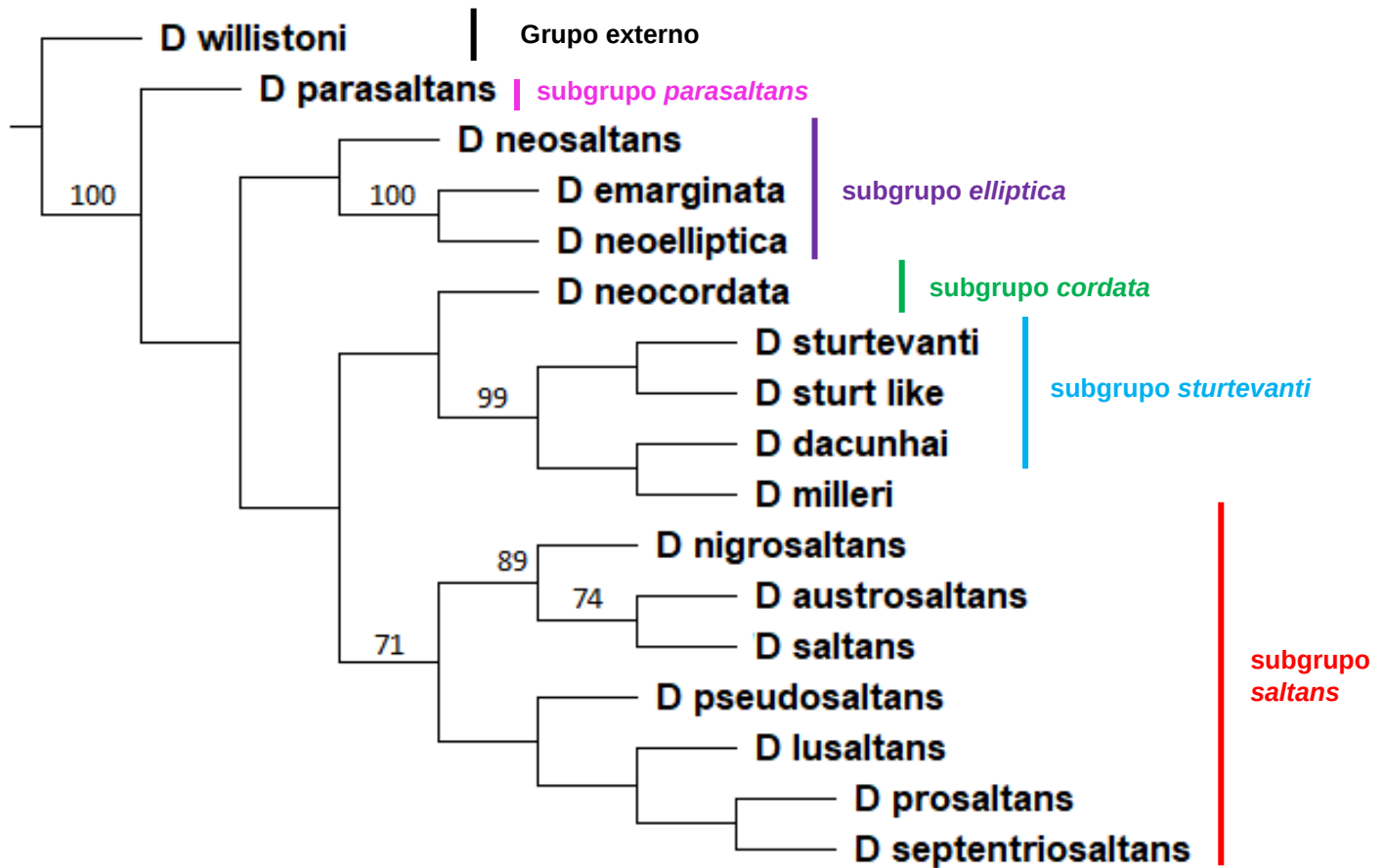
4.2. Citocromo Oxidase I

4.2.1. Máxima Parcimônia

Na análise molecular com base no gene *COI*, as sequências utilizadas foram de 667 pb. A análise resultou em apenas uma única árvore, apresentada na figura 29. O índice de consistência (CI) foi de 0,57 e índice de retenção (RI) de 0,59.

Apesar do baixo suporte dos nós, as espécies se agruparam dentro de seus subgrupos. O subgrupo *parasaltans* representado pela espécie *D. parasaltans* posicionou-se como clado irmão do restante dos subgrupos do grupo, e com alto suporte (100%). *D. emarginada* e *D. neoelliptica* representantes do subgrupo *elliptica*, constituem um clado, com alto suporte (100%) e relacionado a elas se encontra *D. neosaltans* constituindo um outro clado, também representante deste subgrupo, porém com suporte baixo. O subgrupo *sturteventi* representado por *D. sturtaventi*, *D. sturt-like*, *D. dacunhai* e *D. milleri*, constituíram um clado com alto suporte (99%). As espécies do subgrupo *saltans* também constituíram um clado com um bom suporte de ramos (71%). O clado do subgrupo *saltans*, esclareceu apenas dois cladogramas internos, o qual um é composto por *D. austrosaltans* e *D. saltans* (74%) e outro por *D. nigrosaltans*, próxima ao último clado (89%).

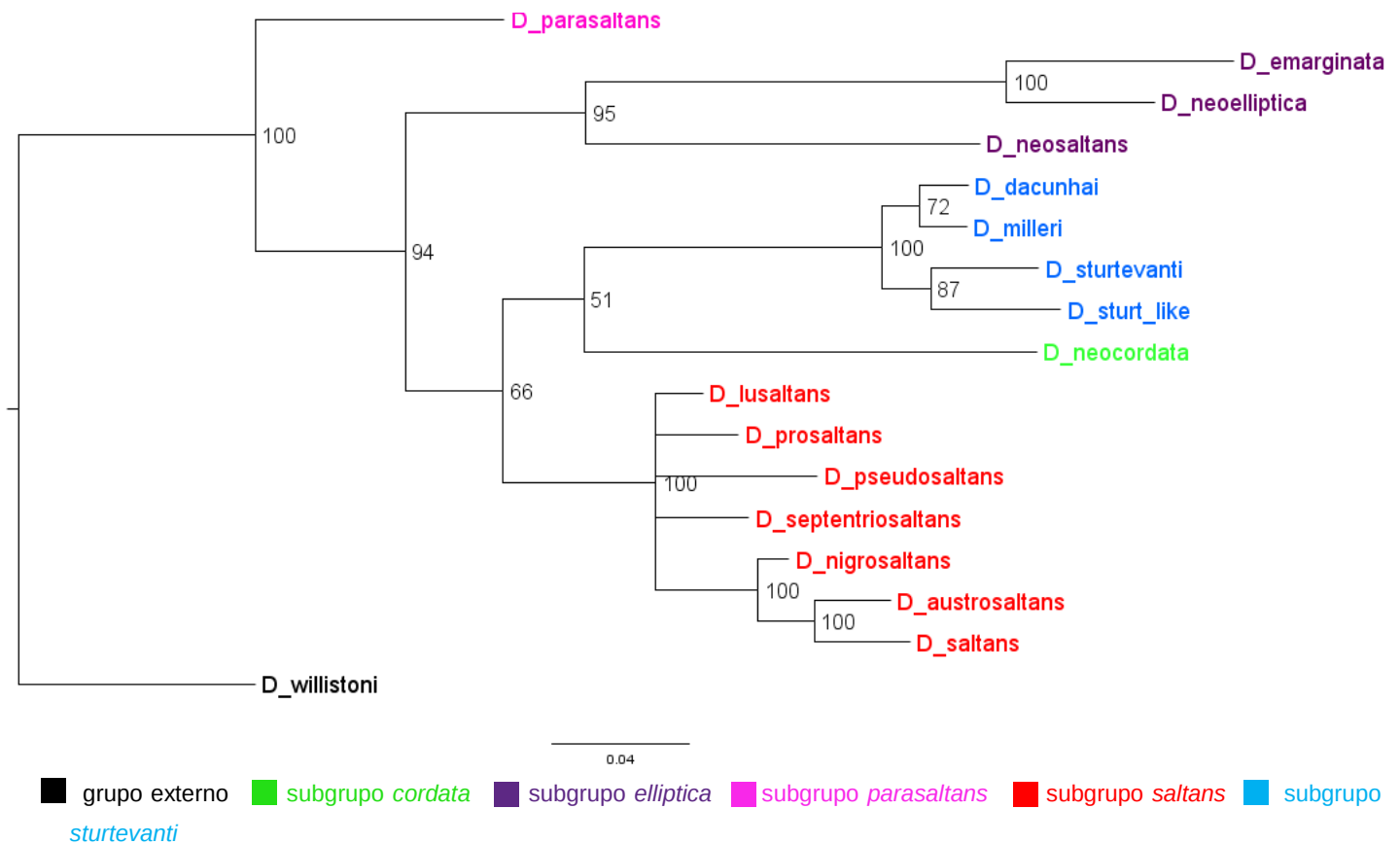
Figura 29. Relações filogenéticas inferidas por critério de Máxima Parcimônia, entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, baseada no marcador molecular *COI*. Os números na parte superior dos ramos representam o valor de suporte em porcentagem. Valores de *bootstrap* com suporte igual ou superior a 70%.



4.2.2. Inferência Bayesiana

Os mesmos 667 pb de sequência do gene *COI* foram utilizados nesta análise. A árvore gerada pela análise de Inferência Bayesiana apresentou em geral um alto suporte. Assim como na análise molecular de máxima parcimônia, a espécie *D. parasaltans* se alocou como táxon irmão de todos os outros do grupo *saltans*. Os resultados suportaram a formação de dois grandes clados, um composto pelas espécies do subgrupo *elliptica* e outro pelos subgrupos restantes. Também há concordância dos dados obtidos nas análises anteriores em relação às espécies do subgrupo *elliptica*. *Drosophila emarginata* e *D. neoelliptica*, estabeleceram um maior relacionamento entre si do que com *D. neosaltans*. No clado composto apenas pelas espécies do subgrupo *sturtevantii*, ocorreu a subdivisão em dois clados internos, com alto suporte, sendo constituído por *D. dacunhai* e *D. milleri* e outro por *D. sturtevantii* e *D. sturt-like*. O clado composto pelas espécies do subgrupo *saltans* resultou em uma politomia, somente as espécies *D. austrosaltans*, *D. saltans* e *D. nigrosaltans* obtiveram alto suporte, sendo as duas primeiras mais próximas entre si do que com *D. nigrosaltans* (Figura 30).

Figura 30. Relações filogenéticas inferidas por critério de Inferência Bayesiana, entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, baseada no marcador molecular *COI*.



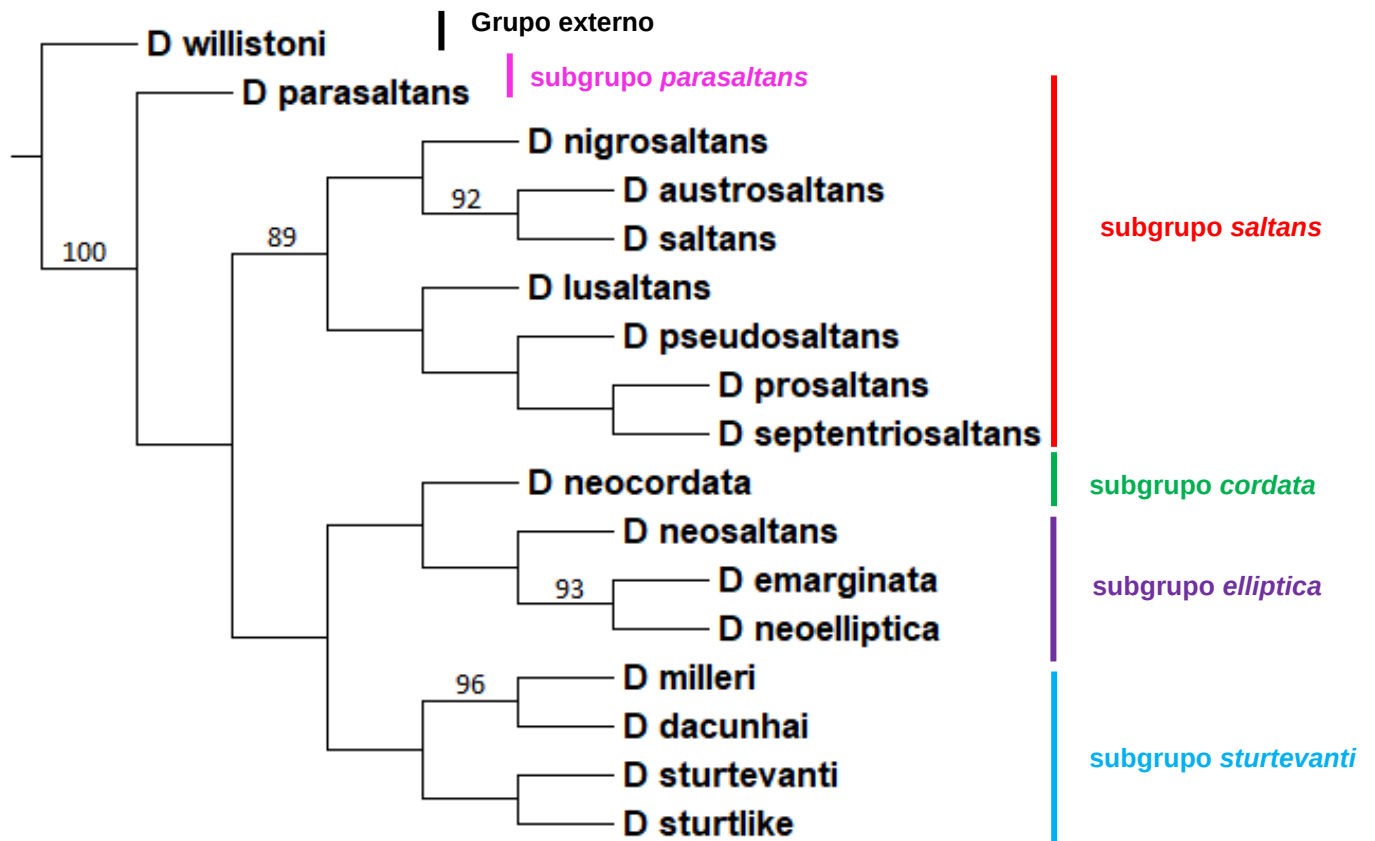
4.3. Citocromo Oxidase II

4.3.1. Máxima parcimônia

A análise resultou em duas árvores igualmente parcimoniosas e a partir destas foi calculado um consenso estrito, apresentado na figura 31. Foram utilizadas 688 pb para esta análise. O índice de consistência (CI) foi de 0,65 e índice de retenção (RI) de 0,64.

A árvore gerada obteve suporte fraco de forma geral. Desta maneira, apenas alguns relacionamentos foram resolvidos, como a espécie *D. parasaltans*, representante do subgrupo *parasaltans*, posicionou-se como táxon irmão de restante do grupo *saltans* (100%). As espécies do subgrupo *saltans* se agruparam, formando um clado (89%) e dentro deste mesmo ocorreu a subdivisão de outros clados internos, mas apenas um foi suportado, sendo ele composto pelas espécies *D. austrosaltans* e *D. saltans* (92%). As espécies representantes do subgrupo *elliptica*, *D. emarginata* e *D. neoelliptica* suportaram uma maior proximidade entre si, formando um clado (93%). Da mesma maneira, as espécies representantes do subgrupo *sturtevantii*, *D. milleri* e *D. dacunhai* também formaram um clado com alto suporte (96%).

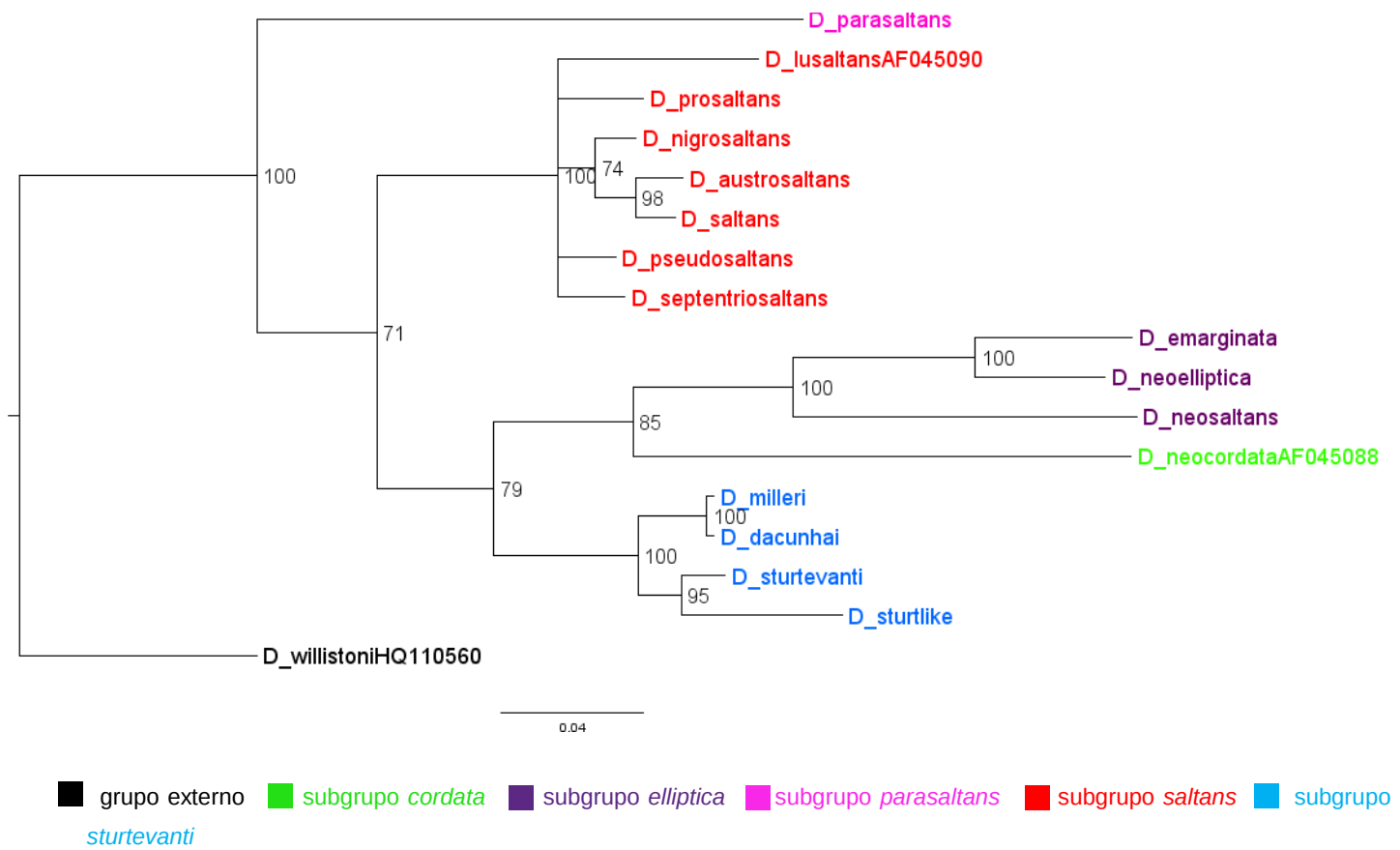
Figura 31. Relações filogenéticas inferidas por critério de Máxima Parcimônia, entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, baseada no marcador molecular *COII*. Os números na parte superior dos ramos representam o valor de suporte em porcentagem. Valores de *bootstrap* com suporte igual ou superior a 70%.



4.3.2. Inferência Bayesiana

As sequências contendo 688 pb também foram utilizadas para esta análise. A árvore gerada obteve alto suporte para todos os nós, a cima de 70%. Assim como nas análises moleculares, o subgrupo *parasaltans*, apresentou-se como clado irmão de todos os demais do grupo *saltans*. Dentro do clado *saltans* ocorreu a formação de uma politomia, não conseguindo resolver o relacionamento da maioria das espécies deste subgrupo, porém ocorreu a divisão de dois cladogramas internos, um constituído pelas espécies *D. saltans* e *D. austrosaltans* e relacionado este encontra-se *D. nigrosaltans*. O clado *saltans* se posicionou como irmão de um grande clado, constituído dos outros três subgrupos. As espécies do subgrupo *elliptica* se agruparam, formando dois cladogramas internos, um constituído pela *D. neoelliptica* e *D. emarginata* e relacionado a estes, a espécie *D. neosaltans*. *Drosophila neocordata*, representante do subgrupo *cordata*, se posicionou como clado irmão do clado *elliptica*. E as espécies do subgrupo *sturtevantii*, também se agruparam, subdividindo em dois cladogramas internos, um constituído pelas espécies *D. sturtevantii* e *D. sturt-like* e outro por *D. dacunhai* e *D. milleri*. O clado *sturtevantii* se alocou como clado irmão do *elliptica-cordata* (Figura 32).

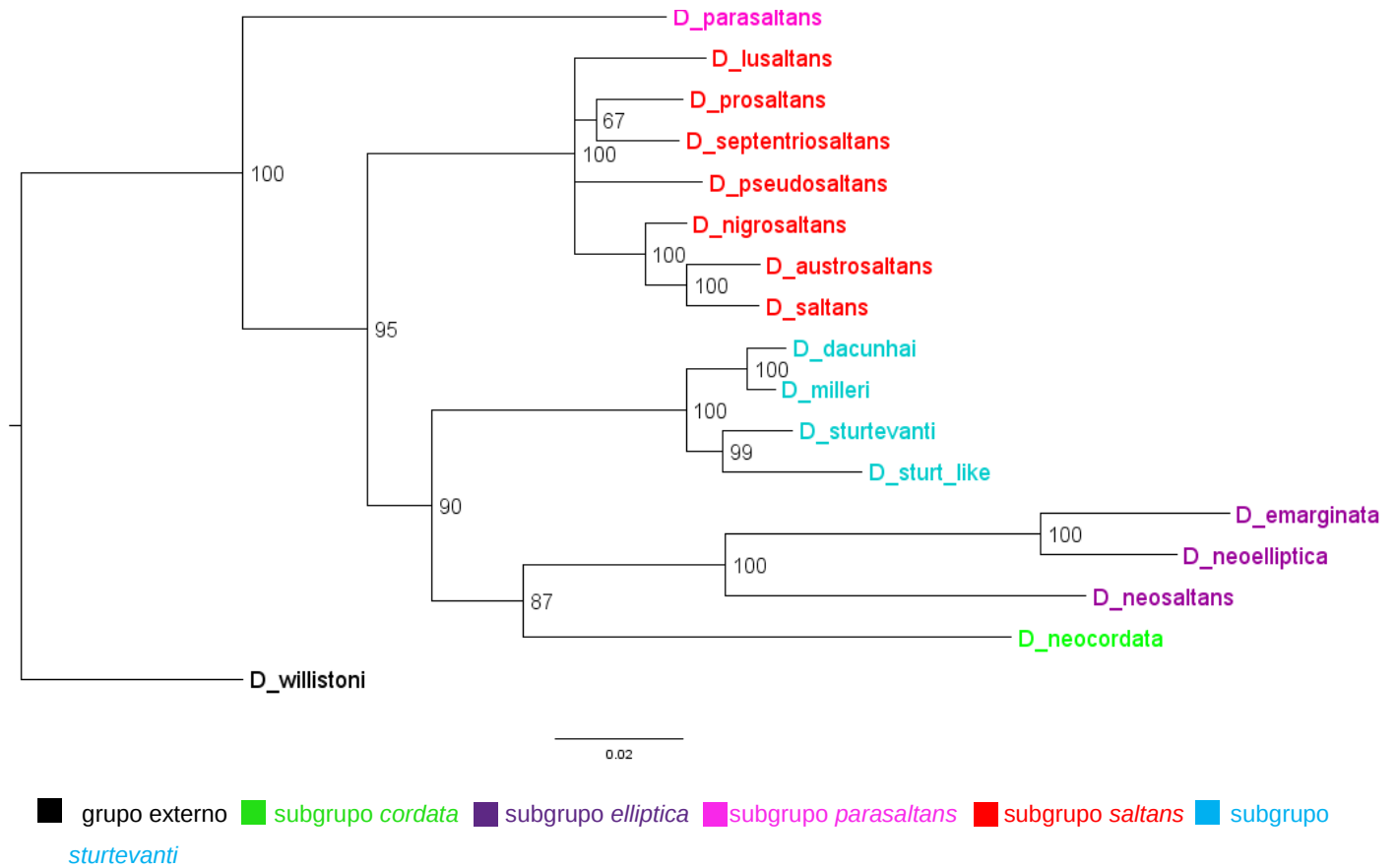
Figura 32. Relações filogenéticas inferidas por critério de Inferência Bayesiana, entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, baseada no marcador molecular *COII*.



4.4. Análise particionada por Inferência Bayesiana

A análise particionada gerada a partir da combinação de dados morfológicos e moleculares (*COI* e *COII*) (Figura 33), resultou em uma árvore muito semelhante à árvore gerada por meio do critério de Inferência Bayesiana utilizando o gene *COII* e com alto suporte. O clado contendo *D. parasaltans*, representante do subgrupo *parasaltans*, posicionou-se como clado irmão das demais espécies do grupo *saltans*. A maioria das espécies do subgrupo *saltans* posicionaram-se em uma politomia, apenas dois clados internos foram suportados, um constituído pelas espécies *D. austrosaltans* e *D. saltans* e o outro pela espécie *D. nigrosaltans*. As espécies do subgrupo *sturtevantii* se subdividiram em mais dois clados internos, um composto pelas espécies *D. dacunhai* e *D. milleri* e outro pela *D. sturtevantii* e *D. sturt-like*. O clado *sturtevantii* se alocou como irmão do clado composto pelos subgrupos *cordata* e *elliptica*. Da mesma forma, o subgrupo *elliptica* também suportou a formação de dois clados irmãos, um composto por *D. emarginata* e *D. neoelliptica* e o outro somente por *D. neosaltans*.

Figura 33. Relações filogenéticas inferidas por critério de Inferência Bayesiana, entre as espécies do grupo *saltans* de *Drosophila*, baseada em análise particionada utilizando dados morfológicos e moleculares.



5. DISCUSSÃO

As árvores geradas por meio do critério de Inferência Bayesiana foram as que obtiveram maior suporte estatístico, esclarecendo melhor o relacionamento entre as espécies do grupo *saltans*.

A partir das análises aqui apresentadas, o grupo *saltans* mostrou ser monofilético em concordância com estudos moleculares realizados anteriormente (O'GRADY; KIDWELL, 2002).

Destaca-se que nas análises efetuadas, as espécies de cada subgrupo posicionaram-se dentro de seus subgrupos em clados bem suportados indicando a confiabilidade nos marcadores selecionados. *Drosophila parasaltans* (subgrupo *parasaltans*) posicionou-se como clado irmão de todos os demais do grupo *saltans*, com alto suporte, nas análises moleculares e particionada. Este último resultado corroborou dados da literatura também com uso de marcadores moleculares (RODRIGUEZ-TRELLES et al., 1999; TARRIO et al., 2000).

O relacionamento entre os subgrupos foi incongruente em algumas análises realizadas no presente trabalho e quando comparadas com dados da literatura. Na análise de Inferência Bayesiana com o uso do marcador *COII* e análise particionada, o subgrupo *cordata* posicionou-se como clado irmão do subgrupo *elliptica* e estes últimos como irmão do clado *sturtevanti*. O relacionamento próximo dos subgrupos *cordata* e *elliptica* corroboram com a maioria dos trabalhos da literatura (THROCKMORTON; MAGALHÃES, 1962; O' GRADY et al., 1998; RODRIGUEZ-TRELLES et al., 1999; TARRIO et al., 2000; YASSIN, 2009).

Os subgrupos *parasaltans* e *saltans* estabeleceram-se como clados irmãos nas análises de Inferência Bayesiana com a utilização de dados morfológicos, corroborando com alguns dados da literatura, como os que também utilizaram marcadores morfológicos (THROCKMORTON; MAGALHÃES, 1962; YASSIN, 2009; SOUZA et al., 2014) e uma análise combinada de marcadores moleculares (O' GRADY et al., 1998). Este relacionamento robusto entre estes subgrupos, corroborado pelos trabalhos que utilizaram marcadores morfológicos, pode ser em parte devido a uma maior semelhança dos edeagos entre as espécies de cada subgrupo em relação ao formato e caracteres.

As relações das espécies do subgrupo *sturtevanti* foram robustas e bem suportadas. Em todas as análises com base no critério de Inferência Bayesiana as espécies se agruparam da mesma forma, estabelecendo dois clados internos, um composto por *D. sturtevanti* e *D. sturt-like* e outro por *D. dacunhai* e *D. milleri*. Estes dados corroboram os obtidos por Souza et al. (2014) para este subgrupo, sendo que das três espécies estudadas, *D. dacunhai* e *D. milleri* agruparam-se em um clado e *D. sturtevanti* se posicionou como um clado irmão. A morfologia do edeago das espécies do subgrupo *sturtevanti* é estritamente semelhante, mas por meio de análises detalhadas conseguimos observar esta mesma subdivisão amostradas nas árvores filogenéticas. Os edeagos de *D. dacunhai* e *D. milleri* apresentam como características marcantes escamas pontiagudas no processo ventral do edeago, formando um sulco na porção superior do mesmo. Já as espécies *D. sturtevanti* e *D. sturt-like* não apresentam as escamas no processo ventral do edeago, sendo essa uma estrutura lisa e fina.

O relacionamento entre as espécies do subgrupo *elliptica* também apresentou alto suporte, posicionando-se igualmente em todas as análises, formando dois clados internos, um composto por *D. emarginata* e *D. neoelliptica* e outro clado por *D. neosaltans*, próxima as duas anteriores. A morfologia da terminalia masculina de *D. emarginata* e *D. neoelliptica* é muito semelhante, e difere acentuadamente da terminália de *D. neosaltans*. Entre as diferenças, destaca-se em *D. neosaltans* o epândrio que possui aparentemente resquícios dos parâmeros ventrais, que são apresentados nas outras duas espécies, o que nos leva a pensar que esta estrutura poderia estar presente na espécie ancestral. O edeago de *D. neosaltans* é bem diferente das outras duas espécies, é menor e não tem forma de foice, o ápice do edeago é cilíndrico e não em forma de gancho e bifurcado. É a primeira vez que estudos filogenéticos são realizados com três das quatro espécies incluídas neste subgrupo, outros trabalhos foram somente com uma.

Todas as sete espécies que compoem o subgrupo *saltans* foram analisadas no presente trabalho, o que é inédito para um estudo filogenético deste subgrupo. Entretanto, o relacionamento entre as espécies deste subgrupo foi o que apresentou o maior número de incongruências entre as análises obtidas no presente trabalho quando comparadas com as da literatura (O' GRADY et al., 1998, YASSIN, 2009, SOUZA et al., 2014). A árvore obtida por máxima

parcimônia com dados morfológicos, suportou apenas a formação de um clado interno, e as demais espécies foram inseridas em uma politomia ou não obtiveram suporte. Logo, na análise de Inferência Bayesiana com a utilização de caracteres morfológicos, três cladogramas internos foram suportados, um constituído pelas espécies *D. lusaltans* e *D. saltans*, outro por *D. nigrosaltans* e *pseudosaltans* e por fim, *D. austrosaltans* e *D. septentriosaltans*. O relacionamento entre as espécies irmãs *D. lusaltans* e *D. saltans* também foi verificada em trabalhos de isolamento reprodutivo e inversão cromossômica (BICUDO, 1973a; BICUDO, 1973b). Da mesma forma, o relacionamento entre *D. austrosaltans* e *D. septentriosaltans* foi corroborado com estudo de polimorfismo cromossômico (BICUDO, 1973b).

As árvores filogenéticas obtidas por dados moleculares e análise particionada suportaram apenas a formação de dois cladogramas internos, um constituído por *D. austrosaltans* e *D. saltans* e outro somente por *D. nigrosaltans*. O relacionamento entre as espécies irmãs *D. austrosaltans* e *D. saltans* corroboraram com trabalhos da literatura sobre inversão cromossômica e padrão de esterases (BICUDO, 1973b; NASCIMENTO; BICUDO, 2002). O relacionamento entre as demais espécies do subgrupo: *D. lusaltans*, *D. prosaltans*, *D. septentriosaltans* e *D. pseudosaltans* não foi resolvido, resultando em politomias ou em baixo suporte dos nós.

As incongruências apresentadas pelo subgrupo *saltans* nos trabalhos anteriores (BICUDO, 1973a; BICUDO, 1973b; O' GRADY et al., 1998, YASSIN, 2009, SOUZA et al., 2014) e no presente trabalho podem ser resultantes da sua recente divergência, por este motivo O' Grady et al. (1998) mencionou sobre este subgrupo como sendo "um problema sistemático difícil" (O' GRADY et al., 1998; YASSIN, 2009).

De acordo com Throckmorton (1975), as espécies do subgrupo *saltans*, se divergiram por último em relação às outras espécies do grupo *saltans*, há aproximadamente 4,5 milhões de anos. A reconstrução filogenética entre as espécies de divergência recente pode se tornar muito mais complexa devido a três fatores biológicos: segregação de polimorfismo que antecipa a divergência das espécies, fluxo gênico durante e depois da especiação e, por fim, recombinação intra-locos (KOPP et al., 2006).

Portanto, os baixos suportes e politomias geradas para as espécies do subgrupo *saltans* podem estar ligadas a estes fatores citados acima. Um estudo de isolamento reprodutivo (BICUDO, 1973a) realizado com as sete espécies do subgrupo *saltans* mostrou, com exceção de *D. pseudosaltans*, que todas as espécies apresentaram isolamento reprodutivo incompleto, o que resulta em genealogias conflitantes. Ainda, sobre estudos com este subgrupo por Bicudo, 1973b, foi verificado um mesmo cariótipo para todas as espécies e um grau de homologia sequencial em estudos de polimorfismos cromossômico. Estes achados e as genealogias conflitantes geradas no presente trabalho podem corroborar a recente divergência das espécies do subgrupo *saltans*.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro sobre a filogenia do grupo *saltans* que reúne o maior número de espécies do grupo utilizando marcadores morfológicos e moleculares. As análises demonstraram a importância do uso de marcadores distintos que apresentaram resultados robustos, complementares e alguns deles concordantes entre si, recuperando a monofilia do grupo.

A relação de parentesco dentro do subgrupo *sturtevanti* foi estabelecida em dois clados irmãos, um composto pelas espécies *D. sturtevanti* e *D. sturt-like* e outro por *D. dacunhai* e *D. milleri*. Este agrupamento também é a primeira vez que está sendo apresentado tendo em vista a inclusão de uma nova espécie (*D. sturt-like*). O subgrupo *elliptica* se posicionou também em dois clados irmãos, um composto pelas espécies *D. emarginata* e *D. neoelliptica* e outro por *D. neosaltans*. Para este subgrupo também é a primeira análise realizada com o maior número de espécies. Para as espécies do subgrupo *saltans*, a relação de parentesco entre as espécies irmãs *D. austrosaltans* e *D. saltans*, e estas com *D. nigrosaltans* foi robusta, bem suportada e corroborada com dados da literatura. As demais espécies representantes do subgrupo *saltans* apresentaram genealogias conflitantes, sugerindo a recente divergência deste subgrupo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, D. S. Elementos básicos de sistemática filogenética. 2ª Edição. Ribeirão Preto: Holos, 226 p, 1997.
- AMORIM, D. S. Fundamentos de sistemática filogenética. 4ª edição. Ribeirão Preto: Holos, 156 p, 2011.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, p.3-15, 2009.
- BACHLI G. TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae, v1.04, Database 2017/07. <https://www.taxodros.uzh.ch/>. Acesso em janeiro de 2018.
- BAKER, R.H; GATESY, J. Is morphology still relevant? [A]. In: DESALLE. R.; GIRIBET, G.; WHEELER, W., eds. **Molecular Systematics and Evolution: Theory and Practice**[M]. Basel: Birkhäuser Verlag, p.163-174, 2002.
- BERNARDO, A. A. Caracterização do padrão de esterases de espécies de *Drosophila* do grupo *saltans* (subgênero *sophophora*) e sua aplicação ao estudo da filogenia e à identificação de espécies. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2007.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the saltans group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. v. 44, p. 313-329, 1973a.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the saltans group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. **Genetica**, v. 44, p. 520-552, 1973b.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV. The *sturtevantii* subgroup. **Revista brasileira de Genética**, v. 2, p. 247-258, 1979.
- CAVASINI, R. Aspectos ecológicos e genéticos no gênero *Drosophila* relacionados à fragmentação da floresta de Araucária. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Associação ampla UEPG/UNICENTRO, 114p., 2009.
- CARAVAS, J. Phylogenetic utility of mitochondrial and nuclear genes: a case study in the diptera (true flies). **PH.D. Thesis**, Wayne State University, Detroit, 2012.
- CASTRO, J. P.; CARARETO, C. M. A. P elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 32, p. 383-387, 2004.
- CLARK, J. B.; ALTHEIDE, T. K.; SCHLOSSER, M. J.; KIDWELL, M. G. Molecular evolution of P transposable elements in genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 902–913, 1995.
- DANIELS, S. B., PETTERSON, K. R., STRAUSBAUGH, L. D., KIDWELL, M. G., CHOVNICK, A.C. Evidence for horizontal transmission of the P transposable elements between *Drosophila* species. **Genetics**, v. 124, p. 339–355, 1990.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 2012.

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

EBERHARD, W. G. Sexual selection and animal genitália. **Havard University Press.**, p.256, 1985.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24 (5), p. 774-786, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p.95-98, 1999.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 270, S96, 2003.

HEINZ, N. P. Variabilidade molecular sazonal de *Drosophila mediopunctata* (Diptera: Drosophilidae). **Dissertação de mestrado**. Programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva. Associação ampla UEPG/UNICENTRO, p. 38, 2012.

HENNIG, W. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Berlin: Deutscher Zentralverlag, 1950.

HILLIS, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics[J]. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.18, p.23-42, 1987.

HUELSENBECK, J.P.; BULL, J.; CUNNINGHAM, C.W. Combining data in phylogenetic analysis. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p.152-158, 1996.

KANESHIRO, K. Y. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. **The University of Texas Publication**, Austin, v. 6918, p. 55-70, 1969.

KANESHIRO, K. Y. Ethological isolation and phylogeny in the *Platinibia* subgroup of Hawaiian *Drosophila*. **Evolution**, v. 30, p. 740-745, 1976.

KOPP, A.; FRANK, A. K.; BARMINA, O. Interspecific divergence, intrachromosomal recombination, and phylogenetic utility of Y-chromosomal genes in *Drosophila*. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 38, p. 731-741, 2006.

LEWIS, P. O. Phylogenetic systematics turns over a new leaf. **Trends Ecol. Evol.**, v. 16, p. 30–37, 2001.

LIU, H.; BECKENBACH, A.T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among tem orders of insects. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 1, p. 41-52, 1992.

MACHADO, C. A.; HEY, J. The causes of phylogenetic conflit in a classic species group. Proceeding of the Royal Society of London. **Series B: Biological Sciences**, v. 2170, 193p, 2003.

MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Microsatellite allele sequencing in population analyses of the South American cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 2010.

MACHADO, L. P. B.; SILVA, D. C.; SIMÃO, D. P.; MATEUS, R. P. Spatial variation of genetic diversity in *Drosophila* species from two different South American environments. In: **Genetic variation in animals**, Cap. 3. Mahmut Çaliskan (ed.). Intech, Rijeka, Croatia, p. 45-62, 2012.

MAGALHÃES, L. E. Description of four new species of the *saltans* group of *Drosophila* (Diptera). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 16, p: 273-280, 1956.

MAGALHAES, L. E.; BJÖRNBERG, A. J. S. Estudo da genitalia masculina de *Drosophila* do grupo *saltans* (Diptera). **Revista Brasileira de Biologia**, v.17, p. 435-450, 1957.

MAGALHÃES, L. E. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. **UT Publications** v. 6205, p. 135-154, 1962.

MARKOW, T. A; O'GRADY, P. M. *Drosophila*: A Guide to Species Identification and use. **Academic Press**, London, 2005.

MARKOW, T. A; O'GRADY, P. M. Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila*. **Annual Review Genetics**, v. 39, p. 263–291, 2006.

MARKOW, T. A; O'GRADY, P. M. *Drosophila* Biology in the Genomic Age. **Genetics**, v. 177, p. 1269-1276, 2007.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and Spatial Allozyme Variation in the South American Cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). **Biochemical Genetics**. v. 41, p. 219-233, 2003.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Population genetic study of allozyme variation in natural populations of *Drosophila antonietae*. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 136–143, 2007.

MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; MORAES, E. M.; SENE, F. M. Allozymatic divergence between border populations of two cryptic species of the *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera: Drosophilidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 410-415, 2010.

MORAES, E. M.; SENE, F. M. Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 336–344, 2007.

MORAES, E. M.; YOTOKO, K. S. C.; MANFRIN, M. H.; SOLFERINI, V. N.; SENE, F. M. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136–2147, 2009.

MOURÃO, C. A.; BICUDO, H. E. M. C. Duas espécies novas de *Drosophila* do grupo *saltans* (Drosophilidae, diptera). **Papéis avulsos de Zoologia**, v. 12, p. 123-134, 1967.

NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). **Genetica**, v. 114, p. 41–51, 2002.

NIXON, K. C. WinClada ver. 1.00.08, 2002.

O' GRADY, P. M.; CLARK, J. B.; KIDWEL, M. G. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p. 656–664, 1998.

O' GRADY, M. P.; CLARK, J. P.; KIDWELL, M. G. Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) Based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, San Diego, v. 22, n. 3, p. 442–453, 2002.

PAVAN, C. Espécies Brasileiras de *Drosophila*. II. Biol. Geral. **Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 1–37, 1952. PAVAN, C.; MAGALHÃES, L. E. In Pavan, 1950. Magalhaes: The *saltans* group of *Drosophila*, p. 153, 1950.

PINSKER, W.; HARING, E.; HAGEMANN, S.; MILLER, W. J. The evolutionary life history of P transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. **Chromosoma**, v. 110, p. 148–158, 2001.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. Tracer v1.5. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, 2009.

RAMBAUT, A. FigTree v1.4.2, 2012.

RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; TARRIO, R.; AYALA, F.J. Molecular evolution and phylogeny of the *Drosophila saltans* species group inferred from the Xdh gene. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 13, p.110–121, 1999.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p. 1572–1574, 2003.

SACCONE, C.; DEGIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, p. 195–209, 1999.

SCOTLAND, R.W.; OLMSTEAD, R.G.; BENNETT, J. R. Phylogeny reconstruction: the role of morphology[J]. **Systematic Biology**, v. 52, p. 539–548, 2003

SILVA, J.C.; KIDWELL, M.G. Horizontal transfer and selection in the evolution of P elements. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1542–1557, 2000.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Entomological Society of America** v. 6, p. 651–701, 1994.

SOUZA, T. A. J.; NOLL, F. B.; BICUDO, H. E. M. D. C.; MADI-RAVAZZI, L. Scanning Electron Microscopy of Male Terminalia and Its Application to Species Recognition and Phylogenetic Reconstruction in the *Drosophila saltans* Group. **PLoS ONE** v. 9(6): e97156, 2014.

- SPASSKY, B. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. **Univ. Texas**, v. 5721, p. 48-61, 1957.
- SPELTING, F. A. H.; HICKEY, D. A. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 656-665, 1994.
- STURTEVANTI, A. H. The North American species of *Drosophila*. **Carneg. Inst. Wash.**, v. 301, p. 1-150, 1921.
- STURTEVANTI, A. H. On the subdivision of genus *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 25, p. 137-141, 1939.
- STURTEVANTI, A. H. The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. **University of Texas Publications**, v. 421, p. 5-51, 1942.
- TARRÍO, R.; RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F.J. Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: The *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.16, p. 344-349, 2000.
- TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 789-809, 2004.
- THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- THROCKMORTON, L. H. The problem of phylogeny in the genus *Drosophila*[J]. **University of Texas Publications**, v.6205, p. 207-343, 1962.
- THROCKMORTON, L. H.; MAGALHAES, L. E. Changes with evolution of pteridine accumulations in species of the *saltans* group of the genus *Drosophila*. **University of Texas Publications**, v. 6205, p. 489-505, 1962.
- THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila* [A]. In: King RC. **Handbook of Genetics**. **Plenum Press**, v. 3, p. 421-469, 1975.
- WHEELER, M. R. Taxonomic and distributional studies of Nearctic and Neotropical Drosophilidae. **University of Texas Publications**, v. 5721, p. 79-114, 1957
- WORTLEY, A. H.; SCOTLAND, R. W. The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses[J]. **Systematic Biology**, v .55, p. 677-685, 2006.
- YASSIN, A. Phylogenetic Relationship Among Species Subgroups in the *Drosophila saltans* Group (Diptera: Drosophilidae): Can Morphology Solve a Molecular Conflict? **Zoological Research**, v. 30, p. 225-232, 2009.
- YASSIN, A. Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology**, v. 38, p. 349-364, 2013.