

ANÁLISE DA DIVERSIDADE CRÍPTICA DAS ESPÉCIES DO GRUPO *bromeliae* DO GÊNERO *Drosophila* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE) COM OCORRÊNCIA NO SUL DO BRASIL

ANNA CLARA MÜLLER¹; ISABEL GOMES VIEIRA²; VINÍCIUS DA COSTA RODRIGUES³; JULIANA CORDEIRO⁴

¹Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, DEZG, IB, UFPel – mullerannaclara@gmail.com

²Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, DEZG, IB, UFPel - belgovieira@gmail.com

³Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, DEZG, IB, UFPel - viniescovich@gmail.com

⁴Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, DEZG, IB, UFPel - juliana.cordeiro@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Drosophila* possui por volta de 104 espécies que possuem uma alta especialização voltada para o uso de flores, as *flower breeding drosophilids* (FBD), cujo seu ciclo de vida é totalmente relacionado ao recurso floral, indo desde a oviposição, desenvolvimento larval, alimentação até acasalamento (BRNCIC, 1983; CORDEIRO *et al.*, 2020).

Os estudos de inventário e distribuição das FBD ainda são escassos e se restringem ao sul do Brasil. Nesta região, ocorrem três grupos de espécies antófilas, o grupo de espécie *D. flavopilosa*, atualmente com 16 espécies, o grupo *D. bromeliae* com 14 espécies, e o grupo *D. lutzii* com nove representantes (TAXODROS, 2023). Dentro destes grupos, todas as espécies são crípticas, sendo que a identificação das espécies é baseada na morfologia da genitália interna dos machos (SCHMITZ; VALENTE, 2019). No sul da América do Sul, o grupo *bromeliae* é representado por apenas *D. bromelioides*, sendo que já foram identificados seis potenciais novas espécies que ainda esperam por descrição formal (SCHMITZ; VALENTE, 2019; GRIMALDI, 2016; CORDEIRO *et al.*, 2020).

Desta forma, o presente trabalho tem o objetivo de analisar a diversidade críptica das espécies do grupo *bromeliae* coletadas no sul do Brasil e realizar a delimitação das espécies por meio molecular (DNA barcode). Assim, serão gerados os dados necessários para auxiliar na descrição das novas espécies.

2. METODOLOGIA

As moscas foram obtidas por meio de coletas realizadas no Pontal da Barra (Pelotas-RS) e Praia da Barrinha (São Lourenço do Sul-RS). O protocolo de coleta está disponível na página do laboratório DiverGE (wp.ufpel.edu.br/diverge). Após emergidos das flores, os drosofilídeos foram separados em microtubos contendo etanol 90% e identificados com códigos referentes às suas localidades de origem de coleta. Todos os machos foram dissecados de acordo com o protocolo de (BÄCHLI; VILELA, 2019) para identificação ao nível de espécie ou morfoespécie. A identificação das genitálias seguiu a literatura específica para o grupo *bromeliae* (GRIMALDI, 2016) e para os morfotipos já encontrados neste grupo (SCHMITZ; VALENTE, 2019).

Após a identificação morfológica, os indivíduos tiveram seu DNA extraído por meio do kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo protocolo informado pelo fabricante. Na etapa de PCR foi amplificado o gene mitocondrial COI utilizando PCR mastermix (Promega®) e os *primers* TYJ1460 (SIMON *et al.*, 1994) e HCO2198 (FOLMER *et al.*, 1994). As reações de PCR foram levadas ao termociclador nas seguintes condições: 5 min a 95°C, 35 ciclos de 40s a 95°C, 40s a 58°C, 40s a 72°C, finalizando com um ciclo de extensão de 72°C por 5 min.

As amostras foram purificadas pelo kit ExoSap-it (Thermo Fischer®) e enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen.

Os arquivos de sequenciamento foram editados e as sequências consenso foram obtidas utilizando o programa Staden Package (STADEN, 1996). O alinhamento das sequências foi realizado por meio do algoritmo ClustalW no programa MEGA11 (TAMURA *et al.*, 2021). Sequências pertencentes a *D. bromelioides* e aos morfotipos *D. bromeliae* sp.III e sp.V foram utilizadas no alinhamento. Esses indivíduos foram identificados por meio de DNA barcode, morfologia da genitália interna do macho e por meio de morfometria das asas (CARVALHO *et al.*, 2019; SILVA, 2023). A única sequência disponível no GenBank para *D. bromeliae* (GenBank: KF632602) também foi utilizada. Como grupo externo foi utilizada uma sequência de *Scaptodrosophila zebrina* (GenBank: MF066980.1). Foi realizada a busca por *stop codons* no programa MEGAX com a finalidade de identificar segmentos de DNA mitocondrial que ocorrem no DNA nuclear (*NUMTS - nuclear mitochondrial DNA sequences*) e foram amplificados com o mesmo par de *primers*. A presença desses segmentos no conjunto de dados envia as informações uma vez que tais sequências apresentam uma taxa de mutação maior que o esperado para DNA mitocondrial (ROBE *et al.*, 2012).

Para identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (OUTs) e a delimitação das espécies, foi utilizado a análise de monofilia das sequências seguindo a reconstrução filogenética com o modelo evolutivo Neighbor-Joining (NJ), com 1000 réplicas de bootstrap e modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2p. Também foi analisada a distância genética entre os grupos monofiléticos recuperados pela análise de NJ, utilizando o mesmo modelo de substituição nucleotídica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram geradas 26 sequências neste trabalho. Para as análises, além das 26 sequências obtidas foram utilizadas a sequência de *D. bromeliae* (GenBank: KF632602) e as demais 30 sequências obtidas de trabalhos anteriores (CARVALHO *et al.*, 2019). Após edição e alinhamento, a matriz de dados obteve o tamanho de 702pb. A Figura 1 apresenta a árvore filogenética com quatro clados monofiléticos obtida pelo NJ.

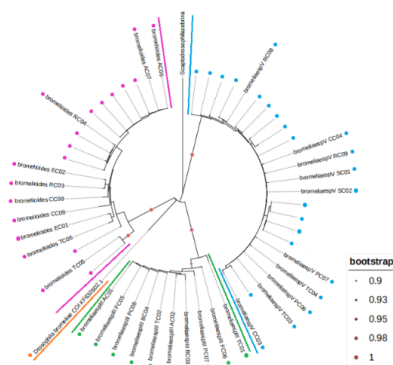


Figura 1: Árvore filogenética construída com o modelo evolutivo Neighbor-Joining, Kimura 2-p e 1000 réplicas de bootstrap. Traços com as mesmas cores delimitam os clados monofiléticos identificados. Valores de bootstrap menores que 0,9 não são mostrados.

A Tabela 1 apresenta os dados de divergência genética intra e intergrupos. Os valores de divergência genética, tanto intra quanto intergrupos foram baixos (maior valor intragrupo: 3,03%; menor valor intergrupos: 8%). As espécies amostradas apresentam pequenas diferenças morfológicas e possuem baixa divergência genética, podendo terem se diferenciado recentemente.

Tabela 1: Distâncias genéticas intra- e intergrupos. Valores em porcentagem. Os grupos são constituídos pelas sequências nucleotídicas que se mostraram monofiléticas na Figura 1, com bootstrap acima de 0,9. As distâncias genéticas intragrupos estão em negrito com seus valores mínimos e máximos entre parênteses.

	Rosa <i>D. bromelioides</i>	Azul <i>D. bromeliae</i> sp.V	Verde <i>D. bromeliae</i> sp.III	Laranja <i>D. bromeliae</i>
Rosa	3,03 (0,00-13,11)			
Azul	12,28	0,42 (0,00-0,92)		
Verde	10,45	12,26	0,84 (0,16-2,25)	
Laranja	8,25	9,77	8,00	0,00

As sequências de *D. bromeliae* sp.III, *D. bromeliae* e *D. bromelioides* partem de um mesmo ramo antes de divergirem entre si, indicando que não possuem uma grande diversidade genética entre estes grupos. Já as sequências de *bromeliae* sp.V (clado azul) não é visto essa monofilia ancestral com os demais grupos. Cordeiro et al (2020) mostra que *D. bromeliae* sp.V é a única potencial espécie especialista do grupo *bromeliae* pois até agora apenas as flores do gênero *Solanum* foram identificadas como sítio de oviposição para este morfotipo.

Analisando os valores máximo e mínimo de divergência genética do clado rosa, identifica-se uma grande diversidade dentro da espécie *D. bromelioides*, enquanto para o clado azul (*D. bromeliae* sp.V) os valores mínimos e máximos são baixos. Esta variação dos valores de divergência genética intragrupos podem estar relacionada ao tamanho populacional e a generalização/especialização do uso do recurso.

De forma geral as sequências identificadas como *D. bromeliae* sp.V se apresentaram monofiléticas, com baixa divergência genética intragrupo e alta divergência intergrupos. Esses dados apontam para a existência de uma nova espécie dentro do grupo *bromeliae* de moscas antófilas. Além disso, todos os indivíduos aqui analisados emergiram de flores da espécie *Solanum amygdalifolium* (Solanaceae), uma planta considerada em ameaça de extinção (BRACK et al., 2016)

4. CONCLUSÕES

O grupo *bromeliae* abrange uma diversidade de espécies que, apesar de crípticas, possuem clara divergência evolutiva representado pela distância genética das sequências nucleotídicas entre os clados. As análises moleculares

serviram como um complemento a taxonomia tradicional, onde por meio delas foi possível elucidar a presença de uma possível nova espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRNCIC, D. Ecology of flower breeding *Drosophila*. In: Asburner M.; Carson, H. L.; Thompson, Jr. J. N. **The genetics and biology of *Drosophila***. vol 3d. London: Academic press, 1983.
- CARVALHO, T.L. *et al.* Integrative taxonomy and evolutionary ecology of the anthophilous *Drosophila lutzii* species complex (Diptera, Drosophilidae) provide evidence for range expansion of *Drosophila alei*. **Insect Systematic and Evolution**, 2023.
- CARSON, H. L. 1971. **The ecology of *Drosophila* breeding sites** Harold L. Lyon Arboretum Lecture. Honolulu. University of Hawaii Press. 28 p, 1971.
- CORDEIRO, J. *et al.* High niche partitioning promotes highly specialized, modular and non-nested florivore–plant networks across spatial scales and reveals drivers of specialization. **Oikos**, V. 129, n. 5, p. 619-129, 2020.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- GRIMALDI, David A. Revision of the *Drosophila bromeliae* Species Group (Diptera: drosophilidae). **American Museum Novitates**, [S.L.], v. 3859, n. 3859, p. 1-55, 26 maio 2016. American Museum of Natural History
- BRACK, P.; AGUIAR, A.; PINHEIRO, P. G.; KUWER, F. I; OVERBECK, G. 2016. Lista preliminar das espécies ameaçadas da flora de Porto Alegre (com complementações). Instituto Gaúcho de Estudos Ambientais/INGÁ. Porto Alegre.
- ROBE, L. J.; MACHADO, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. The DNA barcoding and the caveats with respect to its application to some species of *Palaemonidae* (Crustacea, Decapoda). **Zoological Science**, Tokyo, v. 29, p. 714-724, 2012.
- SANTOS, R.C.O.; VILELA, C.R. Sítios de reprodução de Drosophilidae Neotropical (Diptera). 4. Flores vivas e caídas de *Sessea brasiliensis* e *Cestrum* spp. (Solanáceas). **Revista brasileira de entomologia**, v.49, p. 544-551, 2005.
- SILVA, M.B.P. Asas pra que te quero: Uso da morfometria em Drosophilídeos Antófilos para o auxílio na separação de Espécies e sua relação com a especialização ecológica **Trabalho de conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Bacharelado)** Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2023.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651–701, 1994.
- SCHMITZ, H.J.; VALENTE, V. L. S.. The flower flies and the unknown diversity of Drosophilidae (Diptera): a biodiversity inventory in the brazilian fauna. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 59, n. 1, p. 20195945, 19 set. 2019.
- STADEN, R. (1996) The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**. 5:233-241
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S.. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 23 abr. 2021.