

DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES AFRICANAS DE *MYCODROSOPHILA* OLDENBERG, 1914 (DIPTERA, DROSOPHILIDAE) A PARTIR DE ANÁLISES MOLECULARES

ANTÔNIA SEMPER VELEDA¹; MARCO SILVA GOTTSCHALK²; MONICA LANER BLAUTH³

¹*Universidade Federal de Pelotas* – antoniasemperveleda@gmail.com

²*Universidade Federal de Pelotas* – marco.gottschalk@yahoo.com

³*Universidade Federal de Pelotas* – blauth.monica@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Ao final do século XX, os taxonomistas teorizavam que a maioria das espécies do planeta seguiriam sem descrição e que parte dessa diversidade poderia ser extinta antes mesmo de ser conhecida (PANTE et al., 2015). Esse fenômeno passou a ser conhecido como o “impedimento taxonômico”, conforme Rodman e Coby (2003). Além disso, nas últimas décadas, há a chamada “crise taxonômica”, caracterizada pela escassez de especialistas e financiamento à pesquisa nesta área (PIRES; MARIONI, 2010).

Com o intuito de reduzir as limitações, as análises moleculares, em especial o código de barras molecular (HERBERT et al., 2003), foram propostas para complementar as descrições tradicionais. A utilização do *DNA barcoding* na taxonomia tem sido proposta como uma ferramenta capaz de acelerar a descoberta, identificação, delimitação e descrição de espécies, com especial relevância em casos de espécies crípticas (GOULDING; DAYRAT, 2016). Contudo, essa técnica não substitui a taxonomia morfológica, mas se insere em um contexto mais amplo de integração de diferentes fontes de dados, que tem se mostrado fundamental para a delimitação de espécies.

O gênero *Mycodrosophila* (BACHLI, 2025) tem 130 espécies descritas. Esse táxon é considerado micófago desde sua fase larval até a fase adulta (GOTTSCHALK et al., 2009), sendo sua associação a corpos de frutificação obrigatória e relacionada com a oviposição, corte sexual (BIZZO, 2008) e alimentação (COURTNEY, 1990). Embora ocorra em escala mundial, o gênero é mais frequentemente registrado em regiões da África, Ásia e Austrália (JUNGES et al., 2016).

Considerando a necessidade de integrar abordagens morfológicas e moleculares na delimitação de espécies o presente trabalho busca corroborar a determinação de seis espécies africanas de *Mycodrosophila* (CORRÊA, 2023) por meio da utilização de ferramentas moleculares, alinhando-se à proposta de taxonomia integrativa defendida por diversos sistematas. Os objetivos específicos são: (1) obter o *barcode gap* de espécies de *Mycodrosophila*; (2) analisar os agrupamentos das espécies obtidos por análise da sequência; (3) comparar os agrupamentos com as delimitações propostas pela análise morfológica.

2. METODOLOGIA

Para atingir os objetivos propostos neste trabalho, foram usados 13 sequências de DNA, obtidas por PCR usando primers C1-N1738 (SIMON et al.

1994) e LCO1490 (FOLMER et al. 1994) que amplificam sequência do gene mitocondrial Citocromo C oxidação subunidade 1 (COI). As sequências foram submetidas a base de dados *Barcode of Life Data System* (BOLD) a fim de verificar a identidade comparando com outras sequências depositadas no banco.

Todas sequências de *Mycodrosophila* do banco de dados foram baixadas no formato fasta para análise. As sequências foram abertas no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) (TAMURA et al. 2021) para que fosse feito o alinhamento de nucleotídeos, utilizando o software *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE). Após alinhamento, as sequências foram editadas quanto a inserção de símbolos que representam ausência de informação; e remoção das sequências sem identidade com o fragmento das sequências de interesse. Ainda, foi construída a árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) considerando a distribuição gama, Kimura 2 parâmetros e 1000 bootstrap. Após análise da árvore, sequências cuja identificação nominal não apresentaram agrupamento consistente, bem como sequências únicas, que não agrupavam, foram removidas. Após cada edição, as sequências foram realinhadas.

A matriz de distância das sequências, geradas no MEGA, foi exportada para análise do *barcode gap* nos programas *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) e *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) acessados pelo iTaxoTools (VENCES et al., 2021). O valor do *barcode gap* foi usado para colapsar as espécies na árvore de NJ.

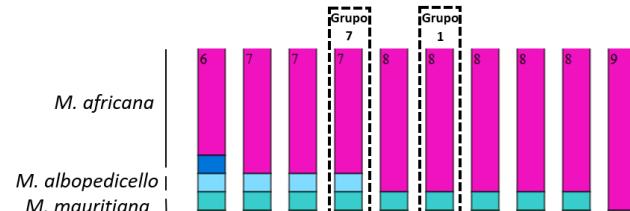
Ainda as sequências das espécies africanas e de *M. graciosa* foram usadas na construção de uma rede de haplótipos usando os programas DNASP (ROZAS et al., 2017) e Network (<http://www.fluxus-engineering.com>), segundo protocolo de Turchetto-Zolet et al. (2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

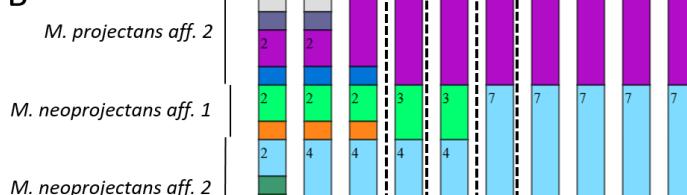
O cálculo do *barcode gap* apresentou valor de 0,3 em ambos os programas utilizados. Este valor está de acordo com outras espécies de *Drosophila* (YASSIN et al., 2010). A utilização do *barcode gap* na construção da árvore filogenética de NJ manteve os indivíduos de *M. david*, *M. burlai*, *M. mauritiana* e *M. madagascariensis* não agrupadas, mas os cinco indivíduos de *M. africana* e o único indivíduo de *M. albopedicelo* agrupadas com suporte de 85.

As dez proposições de agrupamento geradas no programa ASAP mantém as espécies *M. david*, *M. burlai*, *M. mauritiana* e *M. madagascariensis* isoladas. Entretanto, na proposição mais provável (grupo um), as espécies *M. africana* e *M. albopedicelo* formaram um grupo único (Figura 1). Analisando os demais agrupamentos, o particionamento sete apresenta um agrupamento plausível de *M. projectans affinis* 2, *M. neoprojectans affinis* 1 e *M. neoprojectans affinis* 2, mas separa *M. africana* de *M. albopedicelo* (Figura 1).

A



B



C

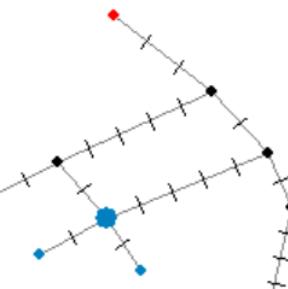


Figura 1: Resultado do agrupamento de espécies do programa ASAP e da rede de haplótipos, quanto ao posicionamento de *Mycodrosophila africana* e *M. albopedicello*. **A**- Partição de *M. africana* e *M. albopedicello* destacando o grupo 1, mais provável e grupo 7, com melhor concordância em relação ao posicionamento das outras espécies de *Mycodrosophila*. **B**- Partição de *M. projectans aff. 2*, *M. neoprojectans aff. 1* e *M. neoprojectans aff. 2* que dão suporte para o grupo 7. **C**- Detalhe da rede de haplótipos mostrando os indivíduos de *M. africana* (pontos azuis) e *M. albopedicello* (ponto vermelho). Traços mostram o número de mutações entre as espécies.

A rede de haplótipos, por sua vez, concorda com a separação de todas as espécies, incluindo a *M. africana* e *M. albopedicello*. Estas apresentam-se como espécies próximas, mas distintas, separadas por aproximadamente sete mutações, considerando um ancestral comum entre os dois grupos de indivíduos (Figura 1 C).

Corroborando com a proposição da taxonomia integrativa, observamos a necessidade de usar mais de uma abordagem molecular somada à análise morfológica. Os dados moleculares sugerem uma relação próxima entre as espécies *M. africana* e *M. albopedicello*. Também, sugere que a separação destas duas espécies é recente.

4. CONCLUSÕES

De modo geral, houve concordância entre os dados moleculares e a morfologia na separação das espécies africanas *M. david*, *M. burlai*, *M. mauritiana* e *M. madagascariensis*. A partir de uma série de abordagens, foi possível confirmar a identidade específica dos indivíduos de *M. africana* e *M. albopedicello*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIZZO, L. Contribuição à taxonomia e ecologia dos Drosophilidae (Diptera) micófagos neotropicais. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade de São Paulo.

CORRÊA, R. C. O gênero *Mycodrosophila* Oldenberg, 1914 (Diptera, Drosophilidae): taxonomia de espécies das Regiões Neotropical e Afrotropical com base na morfologia corporal. 2023. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pelotas.

CORRÊA, R. C.; GOTTSCHALK, M. S.; DA SILVA CARVALHO-FILHO, F.; MENDES, M. F.; DA SILVA VALENTE, V. L. Two new species and a new species group of *Mycodrosophila* Oldenberg,

1914 (Diptera: Drosophilidae) from the Amazon. **Zootaxa**, v. 5052, p. 78-90, 2021.

COURTNEY, S. P.; KIBOTA, T. T; SINGLETON, T. A. Ecology of Mushroom-feeding Drosophilidae. **Advances in Ecological Research**, v. 20, p. 225-274, 1990.

DUARTE, L. B.; VALER, F. B.; VIZENTIN-BUGONI, J.; BERNARDI, E.; VALENTE, V. L. DA S.; GOTTSCHALK, M. S. From visit to emergence: Interactions between mycophagous Drosophilidae (Insecta, Diptera) and macroscopic fungi (Basidiomycota) and their patterns in ecological networks. **Revista Brasileira De Entomologia**. v. 68, p. e20230097, 2024.

GOTTSCHALK, M. S.; BIZZO, L.; DÖGE, J. S.; PROFES, M. S.; HOFMANN, P. R. P.; VALENTE V. L. S. Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. **Iheringia. Série Zoologia**, v.99, p. 442–448, 2009.

GOULDING, T. C.; DAYRAT, B. Integrative taxonomy: Ten years of practice and looking into the future. **Archives of Zoological Museum of Lomonosov Moscow State University**, v. 54, p. 116-133, 2016.

JUNGES, J., GOTTSCHALK, M. S., LORETO, E. L. DA S., & ROBE, L. J. Two new species of *Mycodrosophila* (Diptera, Drosophilidae) proposed by molecular and morphological approaches, with a key to American species. **Revista Brasileira De Entomologia**, v. 6, p. 30–39.

PIRES, C. A.; MARINONI, L. União entre DNA barcoding e taxonomia tradicional através da Taxonomia Integrativa: uma visão que contesta o debate questionando uma ou outra metodologia. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 339-346, 2010.

PANTE, E., SCHOELINCK, C., PUILLANDRE, N. From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. **Systematic Biology**, v. 64, p. 152-160, 2014.

RODMAN, J.E; CODY, J.H. The taxonomic impediment overcome: NSF's Partnerships for Enhancing Expertise in Taxonomy (PEET) as a model. **Systematic Biology**, v. 52, p.428–435, 2003.

ROZAS J.; FERRER-MATA A; SÁNCHEZ-DELBARRO JC; GUIRAO-RICO S; LIBRADO P; RAMOS-ONSINS SE; SÁNCHEZ-GRACIA A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**. v. 34. p. 3299-3302.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L.B. **Guia prático para estudos filogeográficos**. Ribeirão Preto: SBG, 2013.

VENCES, M.; MIRALLES, A.; BROUILLET, S.; DUCASSE, J.; FEDOSOV, A.; KHARCHEV, V.; KUMARI, S; PATMANIDIS, S.; PUILLANDRE, N.; SCHERZ, M. D.; KOSTADINOV, I.; RENNER, S. S. iTaxoTools 0.1: Kickstarting a specimen-based software toolkit for taxonomists. **Megataxa**, v. 6, p. 77-92, 2021.

YASSIN, A., MARKOW, A. T., NARECHANIA, A., O'GRADY, M. P., DESALLE, R. The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species identification using DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, p. 509-517, 2010.

ZHANG, Y.; KATOH, T. K.; FINET, C.; IZUMITANI, H. F.; TODA, M. J.; WATABE, H.; KATOH, T. Phylogeny and evolution of mycophagy in the *Zygothrica* genus group (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 163, p. 107257, 2021.