Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Suzana Casaccia Vaz

**Drosofilídeos (Diptera) associados a flores e fungos da mata atlântica:
identificação de novas espécies e evolução do cromossomo Y**

São Paulo
2014

Suzana Casaccia Vaz

**Drosophilídeos (Diptera) associados a flores e fungos da mata atlântica:
identificação de novas espécies e evolução do cromossomo Y**

Drosophilids (Diptera) associated to flowers and fungi of the Atlantic Forest:
identification of new species and Y-chromosome evolution

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a obtenção
de Título de Doutor em Ciências, na Área de
Biologia (Genética)

Orientador: Antonio Bernardo Carvalho

Co-orientador: Carlos Ribeiro Vilela

São Paulo
2014

Vaz, Suzana Casaccia

Drosofilídeos (Diptera) associados a flores
e fungos da mata atlântica: identificação de
novas espécies e evolução do cromossomo Y
124 páginas

Tese (Doutorado) – Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Drosofilídeos 2. sítios de desenvolvimento
3. cromossomo Y I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Orientador Antonio Bernardo Carvalho

É no ínfimo que eu vejo a exuberância.

(Manoel de Barros)

Resumo

A análise do conteúdo gênico do cromossomo Y em 12 espécies de *Drosophila* com genoma sequenciado em 2008 mostrou que o Y é pouco conservado entre espécies e está em processo de aquisição de genes, o que contradiz o modelo atual de evolução de cromossomos sexuais que o descreve como um homólogo degenerado do X, com constante perda de genes. Este resultado inicial incitou o estudo de espécies adicionais de *Drosophila* e de gêneros próximos. Uma dificuldade relevante para obtenção de espécimes é que muitos grupos taxonômicos de drosofilídeos não estão disponíveis nos “stock-centers”, e seus hábitos de vida são pouco conhecidos. Muitas espécies são encontradas na natureza associadas a fungos, flores, ou exsudados vegetais, e raramente são atraídas por isca com banana fermentada, que é o método usual de coleta de drosofilídeos. Os objetivos do presente trabalho foram: I) analisar o conteúdo gênico do cromossomo Y de drosofilídeos provenientes de substratos “não usuais”, II) determinar substratos de desenvolvimento larval e identificar espécies novas, e III) analisar a composição de bases de genes no Y. Os resultados revelam a natureza dinâmica de aquisição e perdas de genes do cromossomo Y na família Drosophilidae que, em poucos casos, inclui um movimento de todo o cromossomo (*p.e.*, fusão do Y a um autossomo). Descrevemos uma nova espécie, *Drosophila calathea*, cuja larva se desenvolve em flores do gênero *Calathea* (Marantaceae). Uma segunda espécie, provisoriamente codificada como *Drosophila* I4, e cujas larvas também se desenvolvem nessas flores, está em fase de descrição. A partir de análise morfológica, nenhuma dessas duas espécies pôde ser incluídas em algum dos grupos de espécies conhecidos. Uma filogenia molecular preliminar com dois genes do cromossomo Y (*kl-3* and *kl-5*) sugere que ambas pertencem à radiação *virilis-repleta* e que *D. calathea* tem relações (morfológicas e moleculares) com as espécies do grupo *bromeliae*. A análise do conteúdo GC de genes no Y mostrou que genes neste cromossomo são enriquecidos em AT em relação a genes autossômicos, e esta diferença na composição de bases é proporcional ao tempo que um gene está presente no Y. Portanto, o conteúdo GC pode servir como ferramenta no estudo da evolução do cromossomo Y ao determinar o estado ancestral de um gene (autossômico *vs.* ligado ao Y) e datar o movimento de genes entre esses dois compartimentos genômicos.

Abstract

The analyses of the Y chromosome gene content in 12 *Drosophila* species whose genome were sequenced in 2008 showed that the Y is not well conserved among species and is currently in the process of acquiring genes, contradicting the current model of sex chromosome evolution that describes the Y as a degenerate homolog of the X, in constant gene loss. This initial result prompted the study of additional *Drosophila* species and related genera. One of the difficulties in obtaining specimens is the fact that drosophilids from many taxonomic groups are not available in stock-centers and little is known about their ecology. Many species are found in nature associated with fungi, flowers, or plant exudates, and are rarely attracted to baits with fermented banana, the usual method of collecting drosophilids. The objectives of this study were: I) analysis of the Y chromosome gene content of species from “unusual” substrates, II) determination of drosophilids breeding / larval development sites, and III) analysis of the base composition of genes in the Y chromosome. The results emphasize the Y-chromosome dynamic nature of genes acquisition and loss in the family Drosophilidae, including a few cases of whole chromosome movements (*p.e.*, Y-autosome fusion). We describe a new species, *Drosophila calathea*, whose larvae develop in flowers of the genus *Calathea* (Marantaceae). *Drosophila* I4 (to be described) also breeds in these flowers. None of these two species could be included in a known taxonomic group of species. A phylogeny with two Y-chromosome genes (*kl-3* and *kl-5*) suggests that they belong to the *virilis-repleta* radiation and *D. calathea* is related to the *bromeliae* group. Analysis of base composition of Y-chromosome genes shows that they are AT-rich when compared to autosomal genes, and this difference is proportional to the time that a gene has been in the Y. Thus, GC content can be a tool to study the evolution of this chromosome.

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	10
1.1. Origem e evolução do cromossomo Y	10
1.2. O cromossomo Y de <i>Drosophila melanogaster</i> e seus “fatores” de fertilidade	11
1.3. Conteúdo gênico do cromossomo Y nas espécies sequenciadas de <i>Drosophila</i>	13
1.4. Conteúdo gênico do cromossomo Y em <i>Drosophila</i> e gêneros próximos	18
1.5. Sítios de desenvolvimento larval e descoberta de duas novas espécies de <i>Drosophila</i> ...	19
1.6. Parafilia do gênero <i>Drosophila</i> e filogenia de novas espécies	20
1.7. Genes de fertilidade em espécies com cariótipo X0	21
1.8. Localização de genes e composição de bases	22
1.9. Conteúdo GC como assinatura molecular de genes do cromossomo Y	25
2. Objetivos	26
3. Material & Métodos	27
3.1. Coleta, identificação e criação de espécies	27
3.2. Determinação de substratos de desenvolvimento larval	29
3.3. Terminália masculina e morfometria da série-tipo	29
3.4. Cromossomos mitóticos	32
3.5. Métodos moleculares	33
3.5.1. Escolha dos genes	33
3.5.2. Extração de <i>DNA</i>	33
3.5.3. Amplificação do <i>DNA</i> e teste de ligação ao cromossomo Y	33
3.5.4. Otimização de <i>PCR</i> degenerado: <i>Touchdown PCR</i>	35
3.5.5. Purificação, reamplificação e sequenciamento	37
3.6. Análise da composição de bases e uso de códons	38
3.7. Inferência filogenética	38

4. Resultados	40
4.1. “Developmental sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). V. Inflorescences of <i>Calathea cylindrica</i> and <i>C. monophylla</i> (Zingiberales: Marantaceae)” (Vaz <i>et al.</i> , 2014).....	41
4.2. Morfologia da <i>Drosophila</i> sp. I4 (em fase de descrição) e filogenia molecular preliminar com as duas novas espécies	59
4.3. “GC content dates gene gains in the <i>Drosophila</i> Y chromosome” (Vaz & Carvalho, artigo em preparação)	61
4.4. Localização e composição de bases de genes do cromossomo Y em outros drosofilídeos	77
4.5. Conteúdo gênico do cromossomo Y em espécies de <i>Drosophila</i> e gêneros próximos	82
 5. Conclusões, Discussão Geral & Perspectivas	84
 6. Referências Bibliográficas	87
 7. Anexos.....	93
7.1. Lista de espécies usadas para sequenciamento	94
7.2. Exemplo de sequenciamento e alinhamento	98
7.3. Morfometria (dados brutos) de <i>Drosophila</i> sp. I4 (em fase de descrição)	104
7.4. Exemplos de preparação de terminália masculina para identificação de espécie	116
 8. Índice de figuras e tabelas	124

1. Introdução

1.1. Origem e evolução do cromossomo Y

Em muitos organismos o sexo é determinado por um par de cromossomos, os cromossomos sexuais, que diferem entre macho e fêmea. Na maioria das espécies de mamíferos, por exemplo, as fêmeas portam dois cromossomos X, enquanto os machos portam um X e um Y. Comumente, o X é bem similar aos autossomos quanto ao tamanho, conteúdo gênico, e é majoritariamente eucromático, enquanto o Y é um cromossomo distinto que tem poucos loci, é majoritariamente heterocromático, tem grande quantidade de *DNA* repetitivo não codificante e elementos de transposição. Há muitas evidências, em vertebrados, de que o X e o Y se originaram de um par de autossomos homólogos e que, com o tempo, a perda progressiva de genes no Y tornou-o um cromossomo degenerado (Bull, 1983). Os cromossomos sexuais humanos, por exemplo, parecem se comportar dessa maneira: 18 dos 27 genes conhecidos do Y tem homólogos no X (Skaletsky *et al.*, 2003; Ross *et al.* 2005), e o X tem cerca de 20 vezes mais genes do que o Y (Galtier *et al.*, 2001).

Como evoluem os cromossomos sexuais? O que permitiu um par de autossomos homólogos, que troca informação genética por permutação, se diferenciar em X e Y? Segundo a explicação tradicional para esta questão (Bull, 1983; Rice, 1996; Lahn & Page, 1997; Charlesworth & Charlesworth, 2000; Graves & Shetty, 2001), os cromossomos sexuais evoluíram a partir de um estágio inicial de similaridade (um par de autossomos) num processo resumido em três etapas (Figura 1): I) aquisição de um, ou mais, genes de determinação sexual por um autossomo, transformando-o num proto-Y, e seu homólogo num proto-X; II) supressão da permutação entre o proto-X e proto-Y (a presença de genes de efeito antagônico nos sexos pode ser uma causa desse processo seletivo) e III) degeneração e perda de genes do proto-Y, com manutenção, por seleção, de funções essenciais. O resultado é um cromossomo Y com alguma homologia ao cromossomo X, porém com muito menos genes, e heterocromático, com acúmulo de sequências repetitivas que se “protegem” da seleção natural devido à ausência de recombinação (vou me referir à “recombinação” como simplificação de “recombinação como resultados de permutação”). A degeneração do Y é consequência direta da baixa eficiência da seleção natural na ausência de recombinação (Charlesworth & Charlesworth, 2000). A chance de fixação de mutações benéficas no cromossomo Y é reduzida, enquanto a chance de fixação de mutações deletérias é aumentada (revisto em Kaiser & Bachtrog, 2010). Genes de função especificamente masculina costumam estar localizados no cromossomo Y em diversos grupos de organismos, como mamíferos (Lahn & Page, 1997, Skaletsky *et al.*, 2003), *Drosophila* (Carvalho *et al.*, 2000) e, ao menos, numa espécie de planta (Matsunaga, 2006). O cromossomo Y é uma localização esperada para um gene que beneficia machos, mas é desvantajoso nas fêmeas (Fisher, 1931; Bull, 1983).

Figura 1. Modelo tradicional de evolução dos cromossomos sexuais. (i) Aquisição de um gene de determinação sexual S, (ii) Supressão da permutação (e, como consequência, da recombinação) entre os cromossomos proto-X e proto-Y, dando origem aos cromossomos X e Y, (iii) Degeneração do cromossomo Y.

Apesar dessa uniformidade de expressão masculina do cromossomo Y em espécies de diversos grupos taxonômicos, os cromossomos sexuais variam quanto às suas origens e quanto aos mecanismos de determinação sexual. Em praticamente todas as espécies de mamíferos, o cromossomo Y contém o *SRY*, gene responsável pela diferenciação masculina da gônada bipotencial do embrião e, consequentemente, pela determinação sexual. Isto é, portadores de Y desenvolvem testículos e são, portanto, machos. Além disso, ao menos 10 genes do Y só são expressos no testículo, e estão envolvidos na espermatogênese (Roldan & Golmendio, 1999). A região pseudoautosômica de homologia entre X e Y (região *PAR*) corresponde a ~5 % do cromossomo Y de mamíferos, e corresponde ao resquício do par autossômico ancestral.

A evolução da determinação sexual em insetos difere da de mamíferos, em muitos aspectos. Há sistemas XX-XY, sistemas ZZ-ZW (a fêmea é o sexo heterogamético), sistemas XX-X0 (ausência de Y) e sistemas ZZ-Z0 (ausência do W). Espécies do gênero *Drosophila* têm o sistema XY, mas, diferentemente de mamíferos, é o cromossomo X e não o Y que determina o sexo, ou seja, a presença de dois cromossomos X resulta em fenótipo feminino, enquanto a presença de só um X resulta em macho. Na maioria das espécies do gênero, porém, o cromossomo Y possui genes de fertilidade masculina e o cariótipo X0 (ausência do Y) resulta em macho estéril (Voelker & Kojima, 1971).

1.2. O cromossomo Y de *Drosophila melanogaster* e seus “fatores” de fertilidade

A descoberta de que o Y de *Drosophila melanogaster* contém genes essenciais só para a fertilidade do macho data do nascimento da genética de *Drosophila* e da teoria cromossômica da herança (Bridges, 1916). Stern mostrou, em 1929, que esses genes estavam localizados em ambos braços curto (YS) e longo (YL) do cromossomo Y e, em 1960, Brosseau usou mutações induzidas por raio-X para identificar sete grupos de complementação, 2 no YS (*ks-1* e *ks-2*) e 5 no YL (*kl-1* a *kl-5*). Em 1981, Kennison obteve linhagens férteis com

translocações X-Y e usou-as para construir machos com deleções em cada um dos fatores de fertilidade. Com essas linhagens confirmou 6 dos 7 fatores de fertilidade identificados por Brosseau (1960), sendo *kl-4* o único não confirmado. Na busca pelo papel biológico desses fatores, descobriu-se que a deleção de *kl-3* ou *kl-5* causava a perda do braço externo dos microtúbulos do axonema da cauda do espermatozoide (Hardy *et al.*, 1981). O axonema, que é o cerne citoesquelético de cílios e flagelos, é uma estrutura que, em alguns organismos, contém dineína, uma proteína que pode ser considerada um motor molecular (Figura 2). De fato Goldstein *et al.* (1982) mostraram que, em *Drosophila melanogaster*, espermatozoides de machos com deleções *kl-3*⁻, *kl-5*⁻ (e também *kl-2*⁻) não têm 3 proteínas de alto peso molecular com mobilidade similar a das cadeias pesadas de dineína. Finalmente, em 1993, Gepner and Hays sequenciaram parte do gene *kl-5* e mostraram que ele codifica uma cadeia pesada de betadineína de axonema que é expressa nos testículos. Note que este foi o primeiro gene identificado molecularmente no cromossomo Y, e que, nesta época, dezenas de outros genes já haviam sido identificados nos outros cromossomos. As causas deste atraso são apresentadas na próxima seção.

Figura 2. Corte transversal de axonema da cauda de espermatozóide. Reproduzida de Mitchison & Mitchison (2010). O batimento da cauda é consequência de uma alternância entre estados ativos e inativos das dineínas que constituem os braços interno e externo do axonema.

1.3. Conteúdo gênico do cromossomo Y nas espécies sequenciadas de *Drosophila*

Até a década passada, *kl-5* era o único gene de fertilidade de sequência conhecida do cromossomo Y de espécies de *Drosophila*. A ausência de recombinação nesse cromossomo não permite experimentos de mapeamento clássico, feito com base na análise da frequência de recombinantes. Mesmo com a era genômica o sequenciamento de *DNA* não resolveu imediatamente o estudo do cromossomo Y, pois sequências heterocromáticas têm sérios problemas de montagem e mapeamento, devido à sua natureza repetitiva. Os trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório por Carvalho e colaboradores (2000, 2001, 2003) representam importantes contribuições para o estudo molecular do cromossomo Y de *Drosophila*: com métodos moleculares e computacionais foram identificados 12 dos 13 genes de cópia simples, atualmente conhecidos, no Y de *D. melanogaster* (Figura 3). Alguns destes genes (as dineínas de cadeia pesada *kl-2*, *kl-3* e *kl-5*) correspondem aos fatores de fertilidade identificados por Kennison (1981), outros são “candidatos” (*WDY* pode corresponder a *kl-1*, *CCY* a *ks-2*, *ORY* a *ks-1*) e os demais são genes não essenciais para a fertilidade (Carvalho *et al.*, 2009). A maioria das proteínas codificadas apresenta semelhança com as de um gene autossômico, supostamente seu parálogo ancestral. E a maioria, senão todas, tem função macho-específica. Os genes, a proteína codificada, quando conhecida, e suas possíveis funções estão mostrados na Tabela 1. Curiosamente, nenhum desses genes possui homólogos no cromossomo X; todos são derivados de parálogos autossômicos, ou seja, os genes do cromossomo Y de *D. melanogaster* têm origem autossômica, e não no cromossomo X.

Figura 3. Genes do cromossomo Y de *D. melanogaster*. Em cinza as regiões correspondentes aos fatores de fertilidade (nomes acima) e os genes nelas localizados estão marcados com chaves. Reproduzida de Dupim (2012). Detalhes sobre as funções e origens dos genes estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Evidência de função masculina dos parálogos autossômicos de 12 genes do cromossomo Y de *D. melanogaster* e 3 genes do Y de *D. virilis*^{*3}. 1: Gepner & Hays (1993), 2: Carvalho *et al.* (2000), 3: Carvalho *et al.* (2001), 4: Vibranovski *et al.* (2008), 5: Cohen (1997), 6: Dupim (2012), 7: Koerich *et al.* (2008), 8: Reiss *et al.*, (2004), 9: Carvalho & Clark (2013), ?: sem informação. ^{*}1autossomo e braço em *D. melanogaster*. (L=braço esquerdo, R=direito)^{*}2Jy-alpha está no Y ancestral de *Drosophila* (ver Figura 4A) e mudou para um autossomo no grupo *melanogaster*. Os 3 últimos genes foram descobertos no Y de *Drosophila virilis* e seus ortólogos são autossômicos em *D. melanogaster*.

Gene autossômico parental				
Gene do Y	Essencial p/fertilidade	Região ^{*1}	Evidência para função masculina	Referência
<i>kl-2</i>	sim	2R	Dineína do axonema, componente do flagelo do espermatozoide	2
<i>kl-3</i>	sim	3R	idem	2
<i>kl-5</i>	sim	3R	idem	1
<i>PRY</i>	não	2L	Contém receptor de domínio de <i>egg jelly</i> (REJ); expressão restrita ao testículo	7
<i>ORY</i>	?	3R	Ortólogo em <i>Chlamydomonas</i> é componente do flagelo; expressão restrita ao testículo	8
<i>CCY</i>	?	3R	-	3
<i>Pp1-Y1</i>	não	2R	Serina /treonina fosfatase – subunidade catalítica; expressão restrita ao testículo	3, 5, 6
<i>Pp1-Y2</i>	não	3R	idem	3, 6
<i>PPr-Y</i>	não	2L	Serina /treonina fosfatase – subunidade regulatória; expressão restrita ao testículo	3, 6
<i>ARY</i>	não	3R	Envolvido na conversão de glicose para a frutose, que, em mamíferos, é a fonte de energia para espermatozoides	4
<i>WDY</i>	?	2L	?	4, 6, 7
<i>FDY</i>	não	?	?	6
<i>JYa</i> ^{*2}	sim	?	Subunidade de Na-K ATPase de espermatozoide	9
<i>dipep</i> ^{*3}	não	?	Pertence à família gênica da dipeptidase M20; expressão restrita ao testículo	9
<i>CG11719</i> ^{*3}	não	3R	Proteína estrutural da cauda de espermatozoides	9
<i>CG2964</i> ^{*3}	não	2L	Piruvato-quinase macho-específica presente no proteoma de espermatozoides	9

(a)

(b)

Figura 4. A) Ganhos (setas vermelhas) e perdas (setas azuis) de genes do cromossomo Y no gênero *Drosophila*. As setas tracejadas representam movimentos que presumivelmente ocorreram antes da divergência entre os subgêneros *Sophophora* e *Drosophila* (genes *kl-2*, *kl-3*, *ORY*, *PRY*, *PprY* e *JYa*). * No grupo *obscura* todo o cromossomo Y ancestral (e, portanto, todos os genes) foi translocado para um autossomo. Adaptada de Koerich *et al.* (2008) acrescida de dados de Carvalho & Clark (2013). B) Análise de sintenia mostrando a localização ancestral autossômica do gene *kl-5* no cromossomo 2 de *D. willistoni* e *Anopheles gambiae*.

Quando a sequência genômica de outras espécies de *Drosophila* tornou-se disponível (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), Koerich *et al.* (2008), como parte do projeto desenvolvido em nosso laboratório, analisaram o conteúdo gênico dos cromossomos Y dessas espécies. Eles testaram, em cada espécie, a presença dos genes conhecidos do cromossomo Y de *D. melanogaster* e concluíram que o conteúdo gênico deste cromossomo é pouco conservado, variando até mesmo entre espécies próximas. Alguns genes de fertilidade, como *kl-2* e *kl-3*, provavelmente estiveram no cromossomo Y durante os 60 milhões de anos de história do gênero, enquanto outros genes parecem ter sido adquiridos ou perdidos

recentemente em algumas linhagens. A Figura 4A mostra os eventos de ganho e perda de genes. O gene *kl-5*, por exemplo, está no cromossomo Y de todas as espécies do subgênero *Drosophila*, mas em *Sophophora* ele só está no Y no grupo *melanogaster*. Ou seja, houve ao menos dois movimentos independentes para o cromossomo Y, indicados pelas setas vermelhas na figura. A condição ancestral autossômica do gene *kl-5* foi inferida pela análise de sintenia (Figura 4B), mostrando que, em *D. willistoni* e *Anopheles gambiae*, *kl-5* está na mesma posição do cromossomo 2. Outro resultado importante desse estudo é que, no balanço geral, o cromossomo Y do gênero *Drosophila* adquiriu 10 vezes mais genes do que perdeu, ou seja, não parece ser um cromossomo em processo de degeneração, mas sim um cromossomo dinâmico, com aquisições independentes de genes dos autossomos.

Em resumo, há duas conclusões relevantes dos trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório: I) Na maioria das espécies estudadas de *Drosophila*, nenhum dos genes identificados no Y são compartilhados pelo X, o que não é esperado pelo mecanismo aceito de origem dos cromossomos sexuais a partir de um par de autossomos homólogos (mecanismo da Figura 1). É possível que o sinal de homologia tenha se perdido, devido a muito tempo de evolução independente de cromossomos de um par sem recombinação. Por outro lado, é possível que o cromossomo Y de *Drosophila* não seja, nem nunca tenha sido, um homólogo degenerado do atual X, mas tenha outro tipo origem (Carvalho, 2002; Carvalho *et al.*, 2009); II) Os cromossomos Y das espécies de *Drosophila* estudadas não têm o conteúdo gênico uniforme, ele varia mesmo entre espécies do mesmo grupo (Carvalho & Clark, 2005; Koerich *et al.*, 2008). Além disso, este cromossomo adquiriu genes ao longo da evolução (Koerich *et al.*, 2008), ao contrário da ideia de perda de genes e degeneração que existe no modelo tradicional de evolução deste cromossomo (*e.g.*, Charlesworth & Charlesworth, 2000).

Outro suporte para uma evolução não usual do cromossomo Y de *Drosophila* veio com a descoberta de que o cromossomo Y de *D. pseudoobscura* é um construto particular, sem semelhança ao cromossomo Y ancestral de *Drosophila* (Carvalho & Clark, 2005). Este cromossomo Y ancestral (presente em *D. obscura*, *D. virilis* e *D. melanogaster*, por exemplo) virou parte de um autossomo em *D. pseudoobscura*, e esta espécie possui um Y novo, aparentemente sem homologia com o Y de outras espécies. Uma explicação possível é que o novo Y não seja um X degenerado, mas tenha surgido de uma especialização de um cromossomo supernumerário, como um cromossomo B (Hackstein *et al.*, 1996). Cromossomos supernumerários são cromossomos extras, dispensáveis, presentes em muitas espécies de eucariotos (Camacho *et al.*, 2000), de origem não muito elucidada. Em *Drosophila*, é possível que esses cromossomos resultem de não disjunção de autossomos do tipo *dot* (puntiformes): em *D. melanogaster*, há evidências de uma semelhança molecular entre o Y e estes cromossomos (Hackstein *et al.*, 1996). Esta relação entre o cromossomo Y e o *dot* foi fortalecida por três trabalhos recentes. O cromossomo Y ancestral de *D. pseudoobscura* (homólogo a outras espécies de *Drosophila*) foi translocado para o cromossomo *dot* (Larracunte *et al.*, 2010), e seu novo Y tem origem desconhecida. Em algumas espécies do grupo *testacea*, uma cópia derivada do gene *kl-5* do cromossomo Y está presente no cromossomo *dot* (Dyer *et al.*, 2011). Ainda mais recentemente mostrou-se que o *dot* foi,

ancestralmente à *Drosophila*, um cromossomo X diferenciado (Vicoso and Bachtrog, 2013). A hipótese de origem do Y via cromossomo supernumerário tem suporte nos trabalhos de Nokkala *et al.* (2000, 2003) que mostraram que o que chamamos de cromossomo Y em duas espécies de Homoptera são de fato cromossomos B que adquiriram um forte emparelhamento e segregação estável com o X (menos de 0.5% de não disjunção). De fato, o cromossomo Y de espécies de *Drosophila* tem grande semelhança molecular com cromossomos B; por exemplo, consistem predominantemente de sequências repetitivas de *DNA*, normalmente contém sequências de *DNA* ribossomal, e alguns genes inseridos na heterocromatina (Hackstein *et al.*, 1996). Entretanto, essas semelhanças podem ser resultado de uma convergência evolutiva e não necessariamente de uma origem comum. A Figura 5 mostra algumas possibilidades de evolução de cromossomos sexuais além da usual (ou “canônica”).

Cabe ressaltar que muitos dos trabalhos com *Drosophila* que consideram o Y como um cromossomo em processo de degeneração se baseiam no modelo presente em *Drosophila miranda*. Nesta espécie um autossomo sofreu translocação para o cromossomo Y. Como o homólogo autossômico continua a segregar como par do autossomo translocado criou-se um sistema conhecido como neo-X/neo-Y (Figura 5b, modelo ii). O autossomo que sofreu a fusão, o neo-Y tem transmissão patrilinear, enquanto seu homólogo segrega com o cromossomo X, formando o neo-X. O neo-X e o neo-Y tem regiões homólogas. Ou seja, *D. miranda* é um modelo interessante para analisar a diferença entre a evolução de cromossomos muito semelhantes, inserido em diferentes partes do genoma: um repentinamente segregando como X e o outro como Y. Como esperado pelo modelo de degeneração do Y, o neo-Y de *D. miranda* é um cromossomo que, por falta de recombinação, teve sua diversidade diminuída em 30 vezes, quando comparado ao seu homólogo ancestral, o neo-X, que tem uma evolução adaptativa muito mais rápida (Bachtrog & Charlesworth, 2002). O neo-Y de *D. miranda* é um Y degenerado, com perda de funcionalidade em cerca de metade de seus genes e acúmulo de sequências repetitivas e elementos de transposição, e alteração na estrutura da cromatina, com o surgimento de extensos segmentos heterocromáticos (Kaiser & Bachtrog, 2010). Entretanto, é possível que o par de cromossomos sexuais ancestrais (antes do evento de translocação nessa espécie) fosse semelhante ao de outras espécies de *Drosophila*, isto é, sem compartilhamento de genes entre os cromossomos X e Y, com a possibilidade de origem via cromossomo supernumerário (Figura 5b, modelo iii). Porém, não podemos descartar a possibilidade de que o Y de *Drosophila* tenha se originado de um par de autossomos homólogos, e a degeneração do cromossomo Y já tenha apagado os sinais de homologia.

Figura 5. Origens do cromossomo Y. (a) genes do Y de (i) *D. melanogaster* e (ii) humanos. A quantidade de genes ancestralmente compartilhados com o X é mostrada em vermelho e genes adquiridos dos autossomos estão representados em azul. Genes de origem desconhecida estão agrupados no verde. A maioria dos genes do Y de humanos mostra homologia com o X. O mesmo não acontece com nenhum dos 12 genes de cópia única de *D. melanogaster* sugerindo que o X e Y não têm origem de um par de cromossomos homólogos. (b) hipóteses para a origem e evolução do cromossomo Y. (i) o modelo tradicional assume que a origem é um par de autossomos homólogos onde um deles adquire um gene de determinação masculina (M) tornando-se um “proto-Y” e seu homólogo um “proto-X”. A maturação desse sistema é a degeneração do Y e a aquisição de compensação de dose pelo X. (ii) a hipótese via neo-Y (mostrado aqui numa espécie X0): começa com uma fusão X-autossomo, transformando o X num neo-X, e o homólogo livre num neo-Y, cujo futuro é a degeneração. (iii) a hipótese alternativa às anteriores começa quando um cromossomo B adquire a capacidade de emparelhamento com o X. A aquisição de genes de fertilidade masculina (F) forma um cromossomo que chamaremos de “Y”. Em contraste com os caminhos anteriores, o Y com origem via cromossomo B, não tem região de homologia ao X, e não se formam por degeneração. Código de cor: azul=autossomos, vermelho=cromossomos sexuais maduros, amarelo=cromossomos extranumerários, como cromossomos B. Reprodução da figura 1 de Carvalho *et al.* (2009).

1.4. Conteúdo gênico do cromossomo Y em *Drosophila* e gêneros próximos

Os movimentos de ganho e perda de genes no cromossomo Y de *Drosophila* constatados no estudo com as 12 espécies de genoma sequenciado (Figura 4A) sugere que o Y é um cromossomo dinâmico, que adquire genes dos autossomos, não aparentando ser apenas um cromossomo degenerado em vias de extinção. Mas quão frequente é este movimento de genes para dentro e fora do Y? Existem outros casos de fusão Y-autossomo como visto em *D. pseudobscura* por Carvalho & Clark (2005)? Esta questão está sendo estudada em nosso laboratório (em especial por, Eduardo Dupim, como projeto de doutorado) usando-se *Drosophila* como modelo, analisando-se o conteúdo gênico de cerca de 400 espécies deste gênero, pertencentes a diversos grupos. Muitas espécies podem ser obtidas nos centros de manutenção de estoques (*stock-centers*), porém muitas outras não se criam em condições

artificiais, e pouco se sabe sobre sua biologia. *Hirtodrosophila*, *Zygothrica* e *Mycodrosophila*, por exemplo, são gêneros próximos a *Drosophila* (ver Figura 6) que não se encontram em *stock centers* e, na natureza, estão associados a frutificações de fungos. Parte do presente projeto de tese, consiste na obtenção e identificação de espécimes oriundos do campo, especialmente da mata atlântica dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo.

1.5. Sítios de desenvolvimento larval e descoberta de duas novas espécies de *Drosophila*

A maioria dos trabalhos de campo com drosofilídeos visa à coleta de moscas do gênero *Drosophila* e usa isca com banana em fermentação. Porém, imagos de muitas espécies, tanto de *Drosophila* como de vários outros gêneros (como *Hirtodrosophila* e *Zygothrica*), são atraídas por fungos, flores ou exsudados vegetais e não são atraídos por frutas em fermentação (Vilela & Bächli, 2004). Nossa busca por espécies de Drosophilidae teve como foco esses substratos menos usuais. *Drosophila calathea* (espécie que descrevemos recentemente; Vaz *et al.*, 2014, seção 4.1) é um exemplo do desconhecimento dos substratos de desenvolvimento larval de espécies neotropicais. Descobrimos esta espécie em inflorescências de duas espécies do gênero *Calathea* (família Marantaceae) nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo. Uma coleta com aspirador bucal sobre inflorescências de *C. monophylla* da reserva florestal do Instituto de Biociências da USP (Cidade Universitária), durante cinco dias não consecutivos em dezembro de 2006, por apenas uma hora por dia, resultou em uma amostra de 177 indivíduos dessa nova espécie. Cabe que ressaltar que em um levantamento feito nessa reserva florestal de apenas 10 hectares, com isca de banana em fermentação em coletas mensais, por um período de 24 meses consecutivos, nenhum exemplar desta espécie foi encontrado entre as 25.843 moscas amostradas (Ratcov, 2002). Isso é forte evidência de sua especificidade por flores e talvez apenas por aquelas do gênero *Calathea* ou da família Marantaceae. Segundo características ecológicas (em especial o substrato de desenvolvimento) e morfológicas, foi levantada inicialmente a hipótese de *D. calathea* pertencer ao grupo *xanthopallescens*, definido por Pipkin (1964) para quatro espécies (*D. xanthopallescens*, *D. aureopallescens*, *D. alexanderae* e *D. othoni*), de coloração amarelo-pálida, associadas às inflorescências dos gêneros *Calathea* e *Heliconia* no Panamá. Desde os trabalhos de Pipkin, não há menção na literatura sobre este pouco conhecido grupo de espécies de *Drosophila*. O uso de flor como recurso de reprodução está presente em diversos grupos neotropicais do gênero. A maioria das espécies que se criam em flores em decomposição é polífaga (também usa frutos em fermentação, por exemplo). Em alguns casos, porém, há espécies que só se criam em flores vivas. Dentre elas estão as do grupo *bromeliae*, do grupo *flavopilosa*, e do subgênero *Phloridosa* (Brncic, 1983), que usam, como substrato de desenvolvimento larval, flores de espécies não necessariamente aparentadas. Há também aquelas espécies que parecem ser menos generalistas, pois só foram relatadas usando flores de alguns gêneros da mesma família. Dentre estas estão as do grupo *xanthopallescens*, que aparentemente só se criam em inflorescências dos gêneros *Calathea* e *Heliconia* da família Marantaceae (Pipkin, 1964) e as moscas do subgênero *Siphlodora* (vide Vilela & Baechli, 2000).

Além da *D. calatheae*, também aspiramos e vimos emergir de inflorescências de *Calathea spp.*, outra espécie não descrita (no momento codificada como “*Drosophila* sp. I4”, a ser nomeada “*Drosophila asymmetrica*”). A observação preliminar da terminália masculina e feminina não permitiu um diagnóstico de seu grupo taxonômico. É um dos objetivos do presente projeto descrever morfologicamente essas duas espécies de *Drosophila*, determinar seus sítios de desenvolvimento larval (inflorescências de *Calathea monophylla* e *Calathea cylindrica*), e definir suas relações filogenéticas com outros grupos do gênero.

1.6. Parafilia do gênero *Drosophila* e filogenia de novas espécies

Drosophilidae é uma família de dípteros que inclui cerca de 4000 espécies descritas, distribuídas por todos os continentes, exceto a Antártida (Brake & Bächli, 2008). Entre os caracteres diagnósticos principais da família estão duas quebras na nervura costal da asa, fenda lateral no segundo segmento da antena e três pares de setas fronto-orbitais, sendo a anterior proclinada e as duas seguintes reclinadas (Grimaldi, 1990). *Drosophila* é seu gênero-tipo e *Drosophila melanogaster* é uma das espécies de eucariotos mais estudadas em biologia (Remsen & O’Grady, 2002). A família Drosophilidae compreende duas subfamílias monofiléticas: Steganinae e Drosophilinae (Grimaldi 1990; Russo *et al.*, 1995; Remsen & O’Grady 2002). A grande maioria dos gêneros descritos pertence a Drosophilinae, cujo gênero *Drosophila* é o mais representativo. Entretanto, este gênero, que compreende pouco mais que um quarto das espécies de drosofilídeos descritas, não é monofilético (Remsen & O’Grady, 2002, Van der Linde *et al.*, 2010). O problema seria em parte resolvido elevando-se o subgênero *Sophophora* à categoria de gênero, mas isso implicaria na alteração do binômio do organismo-modelo da genética de *Drosophila melanogaster* para *Sophophora melanogaster*, o que não agrada a maior parte dos biólogos. A questão esteve em debate no Comitê Internacional de Nomenclatura Zoológica (Van der Linde *et al.*, 2007; Prigent, 2008). Em termos de filogenia, a atual definição taxonômica de *Drosophila*, gênero e subgênero, é excessivamente ampla e inclusiva (“catch-all designation”) e não reflete uma história evolutiva de um grupo (Remsen & O’Grady, 2002). Porém, há alguns resultados consensuais confortantes entre filogenias morfológicas e moleculares como, por exemplo, a monofilia das radiações *virilis-repleta* e *immigrans-tripunctata* de espécies de *Drosophila* (Throckmorton, 1975; Grimaldi, 1990; Russo *et al.*, 1995; Remsen & O’Grady, 2002, Van der Linde *et al.*, 2010; ver Figura 6). A descrição de novas espécies de *Drosophila* deveria, sempre que possível, verificar sua relação filogenética com essas radiações monofiléticas.

Figura 6. Filogenia da subfamília Drosophilinae, família Drosophilidae. Dados compilados de Van der Linde *et al.* (2010), com a posição de *Zygothrica* sugerida por Grimaldi (1990) e DeSalle & Grimaldi (1991).

1.7. Genes de fertilidade em espécies com cariótipo X0

Entre as espécies que se encontram em substratos “não usuais”, ou seja, diferentes de frutas (e não são encontradas em “stock-centers”) estão as dos gêneros *Hirtodrosophila*, *Zygothrica*, *Mycodrosophila* e a maioria das espécies de *Chymomyza*. Espécies dos três primeiros gêneros são encontradas sobre corpos de frutificação de fungos, especialmente das famílias Auriculariaceae, Polyporaceae e Pleurotaceae (Grimaldi, 1990; Vilela & Baechli, 2004; nossas observações). Imagos de espécies do gênero *Chymomyza* são geralmente encontradas em troncos recém-quebrados ou cortados, mas pouco se sabe sobre os substratos de criação de espécies desse gênero. Temos especial interesse em estudar espécies desses grupos pelos seguintes motivos: 1) *Hirtodrosophila*, *Zygothrica* e *Mycodrosophila* formam um grupo de espécies muito semelhantes às do gênero *Drosophila*. Na realidade, trabalhos de filogenia molecular consideram esses gêneros inclusos no polifilético gênero *Drosophila* (revisão em Markow & O’Grady, 2006; Van der Linde *et al.*, 2010, ver Figura 6). Como estamos estudando a variação do conteúdo gênico no gênero *Drosophila*, é importante incluí-las em nossas análises; 2) das sete espécies de *Hirtodrosophila* com estudos citológicos, cinco têm o sistema X0/XX, ou seja, o macho não possui o cromossomo Y (Clayton, 1998). O mesmo acontece com pelo menos quatro espécies, de diferentes grupos taxonômicos, do gênero *Chymomyza*, um grupo externo à *Drosophila* (vide Figura 6; Watabe & Shimba, 1991; Clayton, 1998; Watabe, 1998; Matsuda, 2002). Por que estudar espécies X0? Como comentamos anteriormente, a falta de compartilhamento de genes entre os cromossomos X e Y de *Drosophila* sugere que o Y, nesse gênero, não deriva de um homólogo degenerado do X. Uma alternativa é que o Y tenha surgido a partir de um cromossomo supernumerário

que adquiriu a capacidade de emparelhar e segregar como Y (Figura 5b iii). Uma maneira de estudar esta questão é investigar o estado ancestral dos cromossomos sexuais de *Drosophila* usando espécies próximas (outros gêneros de drosofilídeos como, por exemplo, *Chymomyza*). A presença de espécies X0 na família, por exemplo, pode sugerir uma origem não usual do Y. Em *Drosophila* a ausência de Y não é esperada, porque indivíduos X0 são inférteis na grande maioria das espécies (Volker & Kojima, 1971). Onde estão os genes de fertilidade das espécies X0 em outros gêneros? Teria o Y sofrido translocação para um autossomo, como é o caso de *D. pseudoobscura*? Ou será que há, em outras espécies de Drosophilidae, genes de fertilidade diferentes dos de *Drosophila melanogaster*? É objetivo do presente projeto obter espécies de *Hirtodrosophila* (e seus parentes próximos: *Zygothrica* e *Mycodrosophila*) e de *Chymomyza* para testar a presença e a localização (no Y ou não) daqueles genes presentes no Y de espécies de *Drosophila*, relacionados à fertilidade.

1.8. Localização de genes e composição de bases

A proporção entre o conteúdo GC e AT do DNA varia entre espécies e entre compartimentos do genoma da mesma espécie. Dois processos evolutivos tradicionalmente explicam essa variação: seleção natural e pressão de mutação (Mooers & Holmes, 2000). A seleção natural atua na preferência por códons (*codon bias*), aumentando a eficiência da tradução e maximizando o nível de expressão de determinado gene. Em 11 das 12 primeiras espécies de *Drosophila* cujos genomas foram sequenciados, existe preferência por códon para cada aminoácido, e essa preferência é muito conservada entre essas espécies (Drosophila 12 genome consortium, 2007). Com exceções em *D. willistoni*, todos os códons preferenciais de *Drosophila* terminam em G ou C (Drosophila 12 genome consortium, 2007). Quanto à segunda força evolutiva, mutação, seu efeito na composição de bases está relacionado a uma substituição desigual entre bases, ou seja, existe um desvio, uma preferência de substituições para AT no lugar de GC, ou vice-versa. No caso de espécies de *Drosophila*, esse desvio ocorre preferencialmente na direção de AT (Powell & Moriyama, 1997; Bachtrog, 2003; Keightley *et al.*, 2009). Outro fator importante que afeta o conteúdo GC em determinado cromossomo ou parte do cromossomo é a taxa de recombinação. De um modo geral, o grau de recombinação determina o quanto a seleção e a mutação terão efeito no conteúdo GC. O efeito da seleção, direcionado para a preferência por códons, seria mais forte em regiões com suficiente recombinação, ou seja, sem ligação entre mutações favoráveis e não favoráveis. A ligação entre alelos vantajosos e desvantajosos, que predomina em regiões com pouca ou nenhuma recombinação (como ocorre no cromossomo Y), reduz a eficiência da ação purificadora da seleção. De fato, há menos *codon bias* em regiões com menos recombinação (Powell & Moriyama, 1997; Akashi *et al.*, 1998; Marais *et al.*, 2003). Se, em espécies de *Drosophila*, a seleção favorece a ocorrência de C e G na terceira posição do códon, enquanto a mutação tende a aumentar a frequência de AT, podemos esperar que, onde há mais recombinação, há mais GC em relação a regiões com menos recombinação. De fato, vários estudos, como o de Marais *et al.* (2001; 2003) observaram uma correlação positiva entre recombinação e

conteúdo GC em espécies de *Drosophila*, assim como encontrado para o genoma humano (Fullerton *et al.*, 2001; Meunier & Duret, 2004).

Figura 7. Mecanismos que alteram a composição de bases do *DNA*. A) Conversão gênica tendenciosa (*biased gene conversion*) durante um evento de permutação. Adaptado de Galtier *et al.* (2001). (I) Bivalente com sítio heterozigótico (retângulo fechado representa par A:T e retângulo aberto representa par G:C). (II) Formação de um heterodúplex. (III) Erro de pareamento: o sítio heterozigoto resulta em um encontro T:G no heterodúplex. (IV) Reparo de emparelhamento para C:G ou (V) Reparo de emparelhamento para A:T, resultando numa segregação não mendeliana de alelos (VI) e (VII). Um excesso de reparo para C:G leva a um aumento do conteúdo GC da sequência de *DNA*. B) Variação do conteúdo GC em espécies de *Drosophila* de acordo com o grau de recombinação e localização genômica. Dados de Díaz-Castillo & Golic (2007). O cromossomo *dot* é um autossomo de natureza heterocromática que apresenta pouca recombinação (Wang *et al.*, 2002). *Autossomos exceto o *dot*. Dados de GC para genes no Y de espécies de *Drosophila* são escassos e obtê-los é um dos objetivos do presente projeto.

Um mecanismo alternativo, ou complementar, à seleção, para explicar o efeito da recombinação no conteúdo GC é um tipo de conversão gênica tendenciosa (*biased gene conversion* ou *BGC*). Durante a meiose, após a quebra da fita dupla de *DNA*, a união de duas fitas homólogas (uma de origem paterna e outra materna) resulta numa estrutura chamada heterodúplex. Quando os alelos parentais são diferentes, o erro de emparelhamento criado no heterodúplex sofre reparo com a mudança de um dos nucleotídeos (Marais *et al.* 2003; Muyle *et al.* 2011). Aparentemente este reparo é tendencioso, isto é, existe uma preferência pela substituição pelas bases G ou C em relação a A ou T (Figura 7A). Como este efeito depende

do evento de recombinação, ele deve ser mais evidente em regiões do genoma com alta taxa de recombinação. De um modo geral, autossomos e o cromossomo X têm conteúdo GC maior do que o Y (que não recombina) (Galtier *et al.*, 2001). Como comentado anteriormente, a falta de recombinação em um segmento cromossômico ou no cromossomo inteiro (como o Y) está associada à redução da eficiência da seleção natural: o consequente acúmulo de mutações deletérias em ligação com alelos favorecidos, acrescido ao efeito de deriva gênica, pode resultar no acúmulo de sequências repetitivas, elementos de transposição e perda de função gênica (revisto em Charlesworth & Charlesworth, 2000). Essa degeneração cromossômica, como o previsto para cromossomos Y, também está associada a um aumento de regiões heterocromáticas. O cromossomo Y de muitas espécies é praticamente todo heterocromático. Portanto, existe uma relação entre heterocromatina e recombinação: regiões heterocromáticas correspondem a regiões de pouca ou nenhuma recombinação. A Figura 7B mostra um resumo da variação na composição de bases em espécies de *Drosophila* de acordo com o equilíbrio entre mutação e seleção, dependendo da taxa de recombinação de diferentes regiões genômicas. De acordo com a figura, espera-se que regiões heterocromáticas tenham menos conteúdo GC, provavelmente por efeito pequeno, ou ausente, de conversão gênica tendenciosa (*biased gene conversion*) somado a um efeito de mutação desviada para AT. Suporte para um efeito importante da mutação em regiões heterocromáticas é que sua taxa pode estar aumentada nesses domínios, provavelmente porque o acesso a mecanismos de reparo de DNA é menor (Schuster-Böckler & Lehner, 2012). Alguns estudos mostram essa variação de GC de acordo com a estrutura da cromatina. Yasuhara *et al.* (2005) analisaram um segmento de eucromatina do cromossomo 4 de *D. pseudoobscura* que, em *D. melanogaster*, está inserido em um braço heterocromático (2L). O conteúdo GC em sete genes ortólogos é maior na eucromatina (*D. pseudoobscura*) do que na heterocromatina (*D. melanogaster*). Díaz-Castillo & Golic (2007) encontraram resultado semelhante para a família de genes *Troponin C*, em *D. melanogaster*, onde dois genes heterocromáticos têm conteúdo GC em torno de 42% enquanto os três genes eucromáticos apresentam este valor entre 55 e 56%. Podemos esperar que o cromossomo Y, por falta de recombinação e excesso de heterocromatina, também tenha um baixo conteúdo GC em relação a genes autossômicos. Em humanos, a média do conteúdo GC na terceira posição do códon para os 23 genes do cromossomo Y é 50,8% enquanto este valor para genes autossômicos (5729 genes) é 62,1% (Galtier *et al.*, 2001). Dados sobre o conteúdo GC de genes do cromossomo Y em espécies de *Drosophila* são escassos. Miskei *et al.* (2011) analisaram a família de fosfoproteínas fosfatases nos 12 genomas inicialmente sequenciados e mostraram que o conteúdo GC diminuiu ~10% quando um dos genes mudou-se para o cromossomo Y. Díaz-Castillo & Golic (2007) compararam oito genes do Y de *D. melanogaster* com seus parálogos autossômicos e observaram diferença semelhante. Marais (2003) e Campos *et al.* (2012) mostraram que, como esperado por causa do código degenerado, a variação do conteúdo GC na última posição do códon (o GC3) é mais evidente do que a do conteúdo GC geral para comparar genes de diferentes localizações genômicas. O conteúdo GC na última posição de códons sinônimos (GC3s), que pretendemos usar, deve ser uma marca molecular ainda mais evidente para genes no Y. De fato, analisando *kl-2* e

kl-3, genes presentes no Y ancestral do gênero *Drosophila* (vide Figura 4A), obtivemos um resultado preliminar de ~25% de GC3s (nas espécies com genoma sequenciado).

1.9. Conteúdo GC como assinatura molecular de genes do cromossomo Y

O gene *FDY* está presente no cromossomo Y de *Drosophila melanogaster* e é autossômico para as outras espécies de *Drosophila*, portanto sabemos que *FDY* sofreu uma translocação autossomo-Y há menos de 5,4 milhões de anos, que é o tempo de separação entre as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* (Tamura *et al.*, 2004; ver Figura 4A). Os genes *kl-5* e *WDY* foram adquiridos pelo Y entre 44 e 55 milhões de anos atrás, ou seja, antes da divergência entre os grupos *melanogaster* e *ananassae*, e depois da divergência do grupo *obscura*. Os genes *CCY* e *ARY* foram aparentemente translocados para o Y entre a divergência do grupo *willistoni* e a separação dos subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*. E os genes *kl-2* e *kl-3* são genes do Y ancestral do gênero (e estamos pesquisando vários gêneros da família para determinar se também estavam no Y ancestral da família Drosophilidae). A previsão do modelo que correlaciona menos recombinação com menos conteúdo GC (Figura 7B) é que a %GC3s seja menor para genes que estão há mais tempo no Y. Do mesmo modo que podemos avaliar a taxa de diminuição do conteúdo GC em relação ao tempo em que um gene está no Y, podemos prever um aumento da %GC quando um gene do Y é translocado para um autossomo como, por exemplo, *JYa* no grupo *melanogaster*, *PRY* em *D. mojavensis*, ou todos os genes em *D. pseudoobscura* (movimentos representados em azul na Figura 4A).

Além de espécies de *Drosophila*, nosso laboratório está obtendo dados sobre o conteúdo do cromossomo Y em espécies de drosofilídeos mais distantes (pertencentes às subfamílias Drosophilinae e Steganinae). O objetivo é verificar se a família Drosophilidae compartilha o mesmo Y. O conteúdo GC de alguns genes desses grupos “externos” a *Drosophila* também será analisado no presente trabalho, onde um dos objetivos é responder as seguintes questões: I) Qual a taxa de variação do conteúdo GC3s ao longo do tempo de genes translocados de um autossomo para o Y e do Y para um autossomo em espécies de *Drosophila*? II) O conteúdo GC3s serve como ferramenta de localização e datação da movimentação de genes dentro e fora de *Drosophila*? III) O conteúdo GC pode dar alguma dica sobre a origem do cromossomo Y na família Drosophilidae?

2. Objetivos

- Descrever duas espécies novas de *Drosophila*, identificando seus sítios de desenvolvimento larval (inflorescências do gênero *Calathea*), e suas relações filogenéticas com outros grupos do gênero;
- Coletar e identificar espécies de Drosophilidae para estudo do conteúdo gênico do cromossomo Y;
- Comparar a composição de bases desses genes entre espécies e entre diferentes ambientes genômicos (em particular Y *versus* autossomo);

3. Material & Métodos

3.1. Coleta, identificação e criação de espécies

As espécies “usuais” de *Drosophila* são coletadas com iscas de frutos em fermentação (especialmente banana). A nossa busca por espécies “não usuais” consistiu em evitar esse tipo de substrato (pois boa parte das espécies que ocorrem nele está disponível em “stock centers”) e localizar corpos de frutificação de fungos, troncos cortados, flores, entre outros substratos possíveis como sítio de acasalamento ou desenvolvimento de drosofilídeos (Figura 8). As coletas foram realizadas em regiões de mata atlântica, principalmente nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Os indivíduos foram coletados com aspirador bucal e colocados em frascos com meio de cultura instantâneo, quando se pretendia criar alguma espécie em laboratório, ou colocados diretamente em tubos de microcentrífuga com etanol 95% para preservar o *DNA*. No laboratório fazemos uma triagem sob estereomicroscópio, e os espécimes de interesse, *i.e.* não representados em nossa coleção, são identificados em nível de espécie principalmente a partir de observação da terminália masculina interna. As lâminas das terminálias são preparadas segundo uma adaptação da metodologia descrita em Bächli *et. al* (2004): 1) dissecação do epândrio+hipândrio e edeago (porção terminal do abdômen masculino), 2) aquecimento da estrutura por 30 minutos a 100°C, em solução de KOH a 10% para digestão dos tecidos moles, 3) coloração com fucsina ácida, 4) imersão em uma gota de creosoto sobre lâmina de vidro escavada, onde se retira com microalfinetes as partes indesejadas, 5) observação e fotografia ao microscópio. As terminálias são fotomicrografadas em um fotomicroscópio Zeiss II, usando o software *Leica Application Suite (LAS EZ)*. Em alguns casos fizemos uma montagem de vários planos focais utilizando o programa *CombineZm*, disponível na Internet (<http://hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/CZM/News.htm>). Em seguida a fotografia é comparada com descrições disponíveis na literatura. A Figura 9 mostra um exemplo de identificação com esse procedimento. Para termos machos e fêmeas seguramente da mesma espécie (o que é muito desejável para estudar o conteúdo de genes do Y em determinado táxon) o ideal seria criar em laboratório uma linhagem oriunda de uma única fêmea fertilizada do campo (linhagem “isofêmea”), por ao menos uma geração. Como as espécies em que estamos interessados dificilmente criam-se nos meios de cultura usuais de laboratório, tentamos usar o próprio substrato onde a fêmea foi encontrada, previamente congelado ou fervido para garantir a eliminação de ovos e larvas trazidos do campo (controles negativos verificaram a eficácia desse método). O substrato descongelado foi colocado em frascos com meio instantâneo (Formula A-24 instant *Drosophila* medium, da *Carolina Biological Supply Company*) e um pedaço de papel filtro para absorver o excesso de umidade. Outra maneira de termos macho e fêmea da mesma espécie é a coleta de casais em cópula, o que pode ser observado eventualmente sobre o substrato natural, ou dentro de frascos com adultos recém-coletados.

Figura 8. Exemplo de sítio de alimentação e acasalamento de drosofilídeos “não usuais”. Espécies do gênero *Zygothrica* são encontradas em corpos de frutificação de fungos como este *Pleurotus djanor* (*Pleurotaceae*), onde se acasalam mas aparentemente não se reproduzem; suas larvas aparentemente se desenvolvem em flores (Grimaldi, 1987).

Figura 9. Terminália masculina interna de *Zygothrica nigropleura* em vista ventral. a) extraído de Grimaldi (1987: 231 [fig.399]). b) fotomicrografia da terminália, preparada em nosso laboratório, a partir de espécime coletado sobre fungo na natureza. Escala 0,1mm.

3.2. Determinação de substratos de desenvolvimento larval

A metodologia que usamos para constatar se as inflorescências de espécies do gênero *Calathea* são usadas como substrato de desenvolvimento de duas novas espécies de *Drosophila* está descrita em Vaz *et al.* (2014; seção 4.1). Consiste basicamente em aspirar adultos sobre o substrato durante alguns dias seguidos e coletar as inflorescências, colocando-as em garrafas de plástico arejadas, com areia úmida no fundo para observar as imagos que emergem. As inflorescências coletadas são então observadas por vários dias consecutivos para coleta das imagos eventualmente emergidas. Estes são mantidas vivas em frascos com meio de cultura por um tempo suficiente para endurecimento do exoesqueleto, o que facilita a sua preparação para observação e identificação ao microscópio. Para as espécies a serem descritas, alguns indivíduos são selecionados para compor a série-tipo (vide seção 3.3). Algumas moscas aspiradas ou emergidas são armazenadas em etanol 95% para extração de *DNA*.

3.3. Terminália masculina e morfometria da série-tipo

O aspecto morfológico mais informativo para a identificação de uma espécie de *Drosophilidae* é, normalmente, sua terminália masculina. Para observar esta estrutura preparamos a lâmina para visualização no estereomicroscópio conforme descrito na seção 3.1. Em seguida, fotografamos a estrutura manualmente em 15-50 planos focais e fazemos uma montagem computadorizada com esse conjunto de imagens, resultando numa imagem final com aspecto tridimensional. Esse procedimento se repete para cada estrutura e cada ângulo de visualização da estrutura. Essa metodologia está descrita em Vaz *et al.* (2014; seção 4.1). Outra informação fundamental na descrição de uma espécie de inseto é sua morfometria, ou seja, a medida, em geral relativa, de suas diversas partes externas, pertencentes à cabeça, ao tórax e ao abdômen. O conjunto de indivíduos, machos e fêmeas, selecionados para serem descritos é chamado de série-tipo, e deve ser depositado em museu zoológico após a descrição. Usaremos o padrão de descrição adotado por Vilela (1983), modificado por Baechli *et al.* (2004). A morfometria é feita separadamente para machos e fêmeas. As Figuras 10-12 exemplificam algumas medidas e índices relativos usados na descrição morfológica das espécies do presente projeto.

Figura 10. Anatomia e morfometria da cabeça de *Drosophila* sp.. Adaptado de Baechli *et al.* (2004: 8-9 [figs 1 e 4]).
a=largura anterior da fronte, b=comprimento da fronte, c=largura posterior da fronte, d=distância entre a primeira e terceira cerdas orbitais, e=distância entre a terceira cerda orbital e a cerda vertical mediana, f=maior diâmetro do olho, g=menor diâmetro do olho, h=largura da gena.

Figura 11. Anatomia e morfometria do tórax de *Drosophila* sp. Adaptado de Baechli *et al.* (2004: 11 [figs 7, 8]). a=distância transversal entre as cerdas dorsocentrals, b=distância longitudinal entre as cerdas dorsocentrals anteriores, c=distância entre as cerdas escutellares apicais, d=distância entre as cerdas escutellares apical e basal, e=comprimento da cerda escutelar basal, f=comprimento da cerda escutelar apical, g, h, i=comprimentos das cerdas esternopleurais anterior, mediana e posterior, respectivamente, j e k=comprimentos das cerdas humerais anteriores e posteriores, respectivamente.

Figura 12. Anatomia e morfometria da asa de *Drosophila* sp.. Adaptado de Baechli *et al.* (2004: 12 [fig. 12])). a, b, c=comprimentos das seções II, III e IV da nervura costal (C), respectivamente; índice costal= a/b , índice costal apical= b/c , d, e=comprimentos das seções III e IV da nervura mediana (M), respectivamente; índice 4v (da quarta nervura)= e/d , f=comprimento da nervura dM-Cu, entre a mediana (M) e a cúbito-anal (CuA), g=comprimento da nervura CuA, índice $5x=g/f$, h,i=largura e comprimento da asa, respectivamente, índice da asa= i/h .

3.4. Cromossomos mitóticos

Para a visualização dos cromossomos mitóticos diseca-se larvas de 3º estágio para separação dos gânglios cerebrais e preparação de acordo com o protocolo de Sullivan *et al.* (2000). O método está detalhado em Vaz *et al.* (2014; seção 4.1). Os objetivos da visualização de cromossomos mitóticos são: 1) determinar o cariótipo de espécies novas (como parte de sua descrição) e 2) confirmar o cariótipo X0 de espécies que não apresentam nenhum gene ligado ao Y nos testes de PCR (ver seção 3.5). Algumas espécies de *Hirtodrosophila* e *Chymomyza* têm machos X0 (Clayton, 1998). Se os genes de fertilidade que estão no Y de *D. melanogaster* forem amplificados em macho e fêmea de uma espécie fora do gênero *Drosophila*, há duas explicações possíveis: I) eles são ancestralmente autossômicos ou II) eles são derivadamente autossômicos. A explicação mais plausível para o segundo caso é o que todo o cromossomo Y tenha se translocado para um autossomo e a espécie tenha o cariótipo X0. Se a espécie for XY, podemos supor que ela tenha um Y bem diferente do de *D. melanogaster*. O maior obstáculo para preparação dos cromossomos mitóticos é a necessidade de moscas no estado larval e, portanto, que se criem por ao menos uma geração em laboratório. Portanto, nossas coletas incluem coletas do substrato para tentativas de estabelecer um meio de cultura em laboratório.

3.5. Métodos moleculares

3.5.1. Escolha dos genes

A escolha dos genes a serem testados para ligação ao Y em espécies dos grupos externos (fora do gênero *Drosophila*) foi baseada na informação que poderemos obter sobre o Y ancestral de *Drosophila* e na possibilidade de desenhar bons *primers* degenerados. Esta parte do trabalho foi feita por A.B. Carvalho, E. Dupim e G. Nassar. Os genes *kl-2*, *kl-3* e *JYa* estão presentes no Y ancestral de *Drosophila* (Figura 4A), porém não se sabe em que momento da evolução da família Drosophilidae eles se moveram para este cromossomo, pois provavelmente têm como ancestrais genes autossômicos que foram duplicados. Portanto é interessante testá-los. O gene *kl-5*, que apresenta mais de um movimento Y-autossomo e vice-versa no gênero *Drosophila* (Koerich, 2008; Dyer *et al.*, 2011; Dupim, 2012) e está presente no Y de algumas espécies de *Scaptodrosophila* (Carvalho *et al.*, dados não publicados), também será testado nos grupos externos. O gene *CG11719*, que está presente no Y do clado que une *D. virilis* e *D. mojavensis* (Figura 4A) e é autossômico nos outros grupos, também está no Y de algumas espécies de *Scaptodrosophila* (dados não publicados). Isto sugere ao menos dois movimentos deste gene na filogenia da família e, por isso, foi incluído em nossos estudos. Outro gene escolhido foi *WDY*, que está no cromossomo Y das espécies do grupo *melanogaster*, é autossômico nas outras espécies de *Drosophila*, mas também está no Y de algumas espécies de *Scaptodrosophila* (nossos dados preliminares). Seleccionamos ao todo seis genes para testar ligação ao Y nas espécies de drosofilídeos fora do gênero *Drosophila*: *kl-2*, *kl-3*, *kl-5*, *JYa*, *CG11719* e *WDY*. Estes mesmos genes serão sequenciados em cada espécie estudada para análise do conteúdo GC.

3.5.2. Extração de DNA

A extração de DNA é sempre feita separadamente para machos e fêmeas. As moscas são inicialmente fotomicrografadas sob estereomicroscópio modelo *Leica EZ4D ou S8* (*Leica*, Alemanha), e os abdomens e asas de machos e fêmeas são guardados como *vouchers* (espécimes testemunhos) em etanol 95% à -20 °C. Usamos o *kit* comercial *Puregene Tissue Core Kit B* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (disponível em www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=103451). Nas etapas iniciais do trabalho usamos o *kit DNeasy Blood & Tissue*, também da *Qiagen* ou o método de fenol-clorofórmio. O DNA extraído é quantificado por espectrofotometria de fluorescência no *Quibit Fluorometer* (Invitrogen, EUA), sendo geralmente diluído na concentração de 10 ng/uL em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,0-8,0), e congelado a -20°C até o uso.

3.5.3. Amplificação do DNA e teste de ligação ao cromossomo Y

Para amplificar o DNA realizamos *PCR* usando inicializadores (*primers*) degenerados, com sequências projetadas em nosso laboratório (vide Dupim, 2012; eu não participei da elaboração de *primers*). De maneira resumida, um *primer* normal, não degenerado, é

planejado com base numa sequência conhecida, disponível no *Gene Bank* ou outra base de dados. Esse *primer* só funciona para a espécie ou para determinado grupo de espécies próximas, dependendo do grau de conservação na região do *primer*. Para espécies mais distantes de *Drosophila*, inclusive outros gêneros, o *primer* é planejado a partir de regiões conservadas entre sequências ortólogas de aminoácidos de diferentes espécies de *Drosophila* e de outros dípteros com sequências disponíveis no *Gene Bank*. Como as sequências diferem, especialmente na terceira posição do códon (devido à substituições sinônimas), o *primer* degenerado consiste, na realidade, de uma mistura de *primers* idênticos em algumas posições (as conservadas), mas com degeneração, ou seja, com A, T, G ou C nas posições variáveis. Os *primers* (nomes e sequências) usados neste projeto estão listados na Tabela 2. Eles foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (EUA). A maior parte dos experimentos de *PCR* foram feitos com os *kits* comerciais de *AmpliTaq® Gold DNA Hot-Start* (*Applied Biosystems*, EUA; nº de catálogo #N8080247) e *GoTaq® Hot-Start Polymerase* (*Promega*, EUA; nº de catálogo #M5005). Estes *kits* contêm *DNA*-polimerases “*hot-start*”, desenvolvidas para serem ativadas após um período de incubação a 94-95 °C, o que reduz amplificações inespecíficas. Cada reação, de volume final de 20 µl, continha 1µl (~10 ng) de *DNA* genômico de macho ou fêmea da espécie de interesse, 0,5 µl de cada *primer* específico para o teste de ligação do gene de interesse (concentração de 10 mM para *primers* normais, e 40 mM para *primers* degenerados), 0,4 µl (10 mM) de *dNTPs*, 2 µl (2,5 mM) de cloreto de magnésio e 14,6 µl de tampão específico para a *DNA*-polimerase em uso, diluído em água purificada e livre de nucleases (*Ambion*, EUA; nº de catálogo #4387936). O termociclador usado nas reações foi o modelo *AB Veriti 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, EUA; nº de catálogo #4375786). Testamos tanto o *DNA* de macho quanto da fêmea, com o objetivo de verificar a localização dos genes. Quando o produto é amplificado em machos e fêmeas, significa que o gene está nos autossomos (ou no X); quando o gene só é amplificado em machos, significa que ele está no cromossomo Y (Figura 13).

Figura 13. Teste de ligação de um gene ao cromossomo Y, a partir de *PCR*. Neste exemplo, um segmento de 1.6kb do gene *kl-5* foi amplificado usando-se os primers *FIFM_F* e *MMVY_R* (ver Tabela 2). O gene *kl-5* está no Y de *Drosophila melanogaster* (mel) e *D. dreyfusi* (drey), pois só amplifica em machos, e é autossômico em *D. willistoni* (will), pois amplifica nos dois sexos.

3.5.4. Otimização de *PCR* degenerado: *Touchdown PCR*

A amplificação de *DNA* com *primers* degenerados depende de uma hibridação adequada de *primers* que não são perfeitamente complementares à sequência alvo. Uma maneira de melhorar este emparelhamento, e garantir a amplificação, é aumentar o tempo de hibridação, em relação a *primers* comuns (90 segundos, em vez de 30 segundos). Um maior tempo de hibridação pode permitir a adição de alguns pares de base pela *DNA*-polimerase ainda nesta etapa, estabilizando um possível emparelhamento ruim entre *primer* e sequência alvo (Dieffenbach & Dveksler, 2003). Outra estratégia para otimizar o *PCR* é o uso de programas do tipo “*Touchdown*” (Sambrook & Russell, 2001). Neste programa, antes do início dos ciclos usuais de desnaturação-hibridação-extensão, há um estágio preliminar onde a temperatura de hibridação começa mais alta e pode ser ligeiramente reduzida a cada ciclo (por exemplo, -0,2 °C por ciclo, ao longo de 20 ciclos, totalizando uma queda de 4 °C na temperatura de hibridação ao fim deste estágio). O objetivo principal do *Touchdown* é evitar produtos espúrios ao otimizar a especificidade dos primeiros emparelhamentos *primer-DNA* a partir de uma temperatura inicial mais alta. Este estágio preliminar é seguido por outros ciclos de amplificação usando a temperatura de hibridação final do estágio de *Touchdown*. A Tabela 3 resume os programas de *PCR* usados neste projeto. Os resultados das reações de *PCR* são observados por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio (TBE 0,5x [Tris 0,05M, EDTA 0,001M e ácido bórico 0,05M], em campo elétrico de ~5 V por centímetro de comprimento da cuba, ~1 hora de corrida). A concentração de agarose do gel variou de 1 a 2%, dependendo do tamanho do produto de *PCR* a ser analisado. Após a corrida de eletroforese, o gel é fotografado com exposição à luz ultravioleta, com o sistema *Kodak EDAS 290* (Kodak, EUA; nº de catálogo: 1446764).

Tabela 2. Nome, temperatura de hibridação (em °C), e sequência dos pares de *primers*, e tamanho dos segmentos amplificados, para cada gene estudado. *Primers* degenerados foram usados para testar ligação ao cromossomo Y. *Primers* não degenerados (sufixo “_nd” no nome) serviram para sequenciamento com os seguintes objetivos: 1) verificar se amplificamos o gene correto, 2) usar em análise filogenética e 3) analisar a composição de bases. Códigos dos sítios degenerados (sublinhados): M=A ou C; R=A ou G; Y=C ou T; H=A, C ou T; N=qualquer base. Duas temperaturas em parênteses significa temperatura inicial e final do *PCR* com *touchdown* (ver Tabela 3).

Gene	Primer 3' (senso)	Primer 5' (antisenso)	Tamanho (em pb)
kl-2			
	<i>KVME</i> (60, 56) CGCCCATGAARATHGARAARGTNATGGA <i>KVME_nd</i> (62) ACGCGCCCATGAAGAT <i>PMID_F1</i> (58, 54) TCTGGAGGTGGTNATGCCNATGATHGA <i>PMID_nd</i> (63) TCTGGAGGTGGTAATGCC	<i>QMQE_R1</i> TGTTCTTGATCCARTTRTTNGCYTGCATYTG <i>QMQE_nd</i> ACGTGTTCTTGATCCAGTTGTT <i>QMQE_R1</i> idem acima <i>QMQE_nd</i> idem acima	~860 ~950
kl-3			
	<i>AMKE_F2</i> (55) GKGARCTGATGACBAAYRARGCNATGAARGA <i>AMKE_nd</i> (55) GAGCTGATGACCAATAAAGC <i>DKMD</i> (60, 56) GGCCAAGAARTGYCANGAYAARATGGA <i>DKMD_nd</i> (58) ACGGCCAAGAAGTGCA <i>RWTE_F</i> (54) GGCCGGCGARAARATHMGNTGGACNGA <i>RWTE_nd</i> (58) TTGGCCGGCGAAAAGAT	<i>EMQD_R2</i> CAGAATRGTSCKRATVGTRTCYTGATYTC <i>EMQD_nd</i> CAGAATGGTCCTGATCGTAT <i>MYQT_R</i> GGAACTGCACCAGNGANGTYTGRTACAT <i>MYQT_nd</i> GGAACTGCACCAGCGA <i>MYQT_R</i> idem acima <i>MYQT_nd</i> idem acima	~920 ~1140 ~1080
kl-5			
	<i>FIFM_F</i> (56, 52) GGARCCBTTYATHTTYATGGA <i>FIFM_nd 2</i> GGAACCGTTCATTTTCATGG <i>MWDF</i> (58, 54) CTGGTGAARATHATGTGGGAYTT <i>MWDF_nd</i> (entre 57 e 60) CTGGTGAAGATCATGTGGGA	<i>MMVY_R</i> WRCARTTRAANACRTANACCATCAT <i>MMVY_R_nd2</i> TGCAGTTGAACACATACACCA <i>MMVY</i> TGCTCGGAGCARTTRAANACRTANACCAT <i>MMVY_nd</i> TGCTCGGAGCAGTTGAA	~1600 ~1800
JYa			
	<i>RIAN</i> CGATAACACCGTGATGGGNMGNATHGCNAA <i>RIAN_nd</i> (64) CGATAACACCGTGATGGGAAG	<i>MVTG</i> GTGATGGGGTGATCNCCNGTNACCAT <i>MVTG_nd</i> GTGATGGGGTGATCGCC	~1090
CG11719			
	<i>EPMV</i> (64, 60) CGAGAAGATCGTNCCNGARCCNATGGT <i>EPMV_nd</i> AGCGAGAAGATCGTGCC	<i>WNTH</i> CAGGGCCRCARTGNGTRTTCCA <i>WNTH_nd</i> CGCAGGGCCACAATG	~780
WDY			
	<i>IKVW_F1</i> (56, 52) CCGTGGATTACCACAARATHATHAARGTNTGG	<i>NMSI_R1</i> GTAACCTCTTGATCCGGYTGDA TRCTCATRTT	~520

Tabela 3. Programas de *PCR*. O *PCR* degenerado tem tempo de hibridação do *primer* maior que o *PCR* normal, e o *PCR* degenerado com *touchdown* tem duas rodadas de amplificação, sendo a primeira com temperatura de hibridação caindo 0,2 °C a cada ciclo, e estabilizando esta temperatura num valor 4 °C mais baixo que a inicial (X °C-4 °C) para os 25 ciclos subsequentes. *Dois minutos é o tempo exigido para ativar a enzima polimerase *GoTaq® Hot-Start*; a enzima *AmpliTaq® Gold DNA Hot-Start* necessita de 9 minutos para ativação. **A temperatura de hibridação X °C e Y °C variam de acordo com o conjunto de *primers* usados (Tabela 2). ***O tempo de extensão depende do tamanho da sequência a ser amplificada: para a sequência de 1.6 kb do gene *kl-5* amplificada no experimento da Figura 13, por exemplo, usou-se 90 segundos de extensão.

Fase, nº de ciclos e temperatura		Tempos
Desnaturação inicial 1x, 95 °C		2 ou 9 min*
Amplificação 40x	desnaturação, 95 °C	30s
	hibridação, X °C**	<i>PCR</i> normal: 30s <i>PCR</i> degenerado: 90s
	extensão, 72 °C	60s/kb***
Extensão final 1x, 72 °C		7 min

<i>PCR</i> degenerado com <i>touchdown</i>		
Fase, nº de ciclos e temperatura		Tempos
Desnaturação inicial 1x, 95 °C		2 ou 9 min*
Amplificação inicial 20x	desnaturação, 95 °C	30s
	hibridação, Y °C** [-0,2 °C /ciclo]	90s
	extensão, 72 °C	60s/kb***
Amplificação final 25x	desnaturação, 95 °C	30s
	hibridação, Y °C** -4 °C	30s
	extensão, 72 °C	60s/kb***
Extensão final 1x, 72 °C		7 min

3.5.5. Purificação, reamplificação e sequenciamento

Para fins de sequenciamento, o produto específico inicialmente amplificado com *primers* degenerados precisa ser purificado e reamplificado com *PCR* comum. A primeira etapa de purificação é física: consiste no corte de um pequeno pedaço de gel onde está localizada a banda de tamanho desejado, usando ponteiras para micropipetas (de 1000 µl) com a ponta cortada manualmente até um diâmetro de ~5 mm. Desse modo, elimina-se produtos espúrios de outros tamanhos. Como precisamos visualizar as bandas no gel para cortá-las, mas não podemos expor o *DNA* à luz ultra-violeta, que o danifica, usamos, no lugar do brometo de etídio, outro corante (*SYBR® Safe DNA Gel Stain* da *Invitrogen*, EUA, na concentração de 0,1 ul/ml de gel) que permite a visualização do *DNA* em luz azul com um transiluminador especial (*Safe Imager™*, *Invitrogen*, EUA; nº de catálogo #S37102). O *DNA* é purificado dos fragmentos de gel utilizando o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*, EUA; nº de catálogo #28-9034-70). A purificação consiste resumidamente em

dissolver o gel de agarose com calor e agentes químicos e, em seguida, colocar a solução num recipiente especial com uma coluna onde o *DNA* se liga, enquanto é “lavado” com solução alcólica, que é centrifugada e descartada. Na etapa final, um tampão de eluição recupera o *DNA* da coluna, e ele pode ser armazenado no congelador, ou seguir para a etapa de reamplificação e sequenciamento. A razão pela qual precisamos fazer uma segunda rodada de *PCR* é que *primers* degenerados não funcionam bem como *primers* de sequenciamento. Essa segunda reação de *PCR*, com produto purificado, é realizada com *primers* não degenerados (os mesmos que serão usados na reação de sequenciamento). O protocolo consiste em 40 ciclos de amplificação com 30 segundos para a fase de hibridação do *primer* (ver Tabela 3). O produto reamplificado é colocado para correr em gel de agarose com brometo de etídio e quantificado com o software Kodak EDAS 290 v.3.6 (Kodak, EUA; nº de catálogo #1111103), usando como padrão o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA, nº de catálogo #10068-013). Em seguida é enviado para a empresa *Macrogen* (Coreia do Sul) para fins de sequenciamento, com os devidos *primers*. As sequências obtidas (da *Macrogen*) são analisadas manualmente no programa *SeqMan* (da *Lasergene*) e sua qualidade é avaliada a partir do seu alinhamento com a sequência do gene de *D. melanogaster* em questão usando o programa *Blast* do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.6. Análise da composição de bases e uso de códons

O portal Mobyly oferece uma plataforma para análises de bioinformática (<http://mobyly.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#welcome>), entre as quais o programa CodonW que calcula índices de uso de códon e composição de bases. Temos como interesse especial a contagem das bases G e C em posições sinônimas dos códons (% GC3s), e estimar a frequência de códons ótimos (FOP) para comparar a diferença de composição entre genes do Y e dos autossomos e aqueles recentemente mudados de um para o outro. Também pretendemos avaliar a taxa de substituição de bases impulsionada por seleção (*codon bias*) e/ou mutação quando um gene muda de um ambiente genômico para outro.

3.7. Inferência filogenética

Como discutido na seção 1.6, *Drosophila* é um gênero parafilético e a descrição de novas espécies deveria, sempre que possível, verificar sua relação filogenética com algum grupo ou radiações conhecidos. Para nossa análise filogenética, em parte por motivo de ordem prática, usamos marcadores no cromossomo Y que sequenciamos para os estudos de composição de bases. Esta escolha tem também vantagens do ponto de vista teórico: como os genes do cromossomo Y têm polimorfismo molecular muito reduzido (Zurovcova & Eanes, 1999), um gene no Y tem menos chance de gerar um problema na inferência filogenética causada por polimorfismo ancestral (coalescência profunda de alelos; revisado em Nichols, 2001). A ausência de polimorfismo intraespecífico pode facilitar a análise filogenética, desde que exista suficiente variação interespecífica como sinal filogenético. Zurovcova & Eanes (1999) analisaram uma região de 1738 pb do gene *kl-5* do cromossomo Y em 10 linhagens

de *D. melanogaster* e 11 de *D. simulans* de várias partes do mundo. Não observaram nenhum polimorfismo intraespecífico, com exceção de apenas um sítio com substituição sinônima em *D. simulans*. De fato, esse segmento do gene *kl-5* apresentou 141 (~8%) de sítios de nucleotídeo variáveis, dentro do subgrupo *melanogaster*. Ou seja, acreditamos que ~1600 pb deste gene (amplificados pelo par de *primers* *FIFM* e *MMVY*, ver Tabela 2) sejam informativos para a análise filogenética de táxons mais distantes (relação entre espécies de *Drosophila*, *Sophophora* e gêneros próximos). Para aumentar a quantidade de sítios, usaremos também o segmento de ~1140 pb do gene *kl-3* amplificados pelo par de *primers* *AMKE* e *EMQD* (Tabela 2).

Usaremos a plataforma MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) para o alinhamento (ClustalW), e escolha de modelos (ModelTest) e métodos de construção de árvore filogenética. A robustez da topologia será testada com o uso de diferentes métodos para a construção da árvore, e com a análise estatística de *bootstrap* (n=1000).

A Figura 14 relaciona os métodos e objetivos deste projeto.

Figura 14. Passos metodológicos para atingir os objetivos principais (em negrito) deste projeto.

*(O sequenciamento foi feito pela empresa *Macrogen*).

4. Resultados

4.1. “Developmental sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). V. Inflorescences of <i>Calathea cylindrica</i> and <i>C. monophylla</i> (Zingiberales: Marantaceae)” (Vaz <i>et al.</i> , 2014).....	41
4.2. Morfologia da <i>Drosophila</i> sp. I4 (em fase de descrição) e filogenia molecular preliminar com as duas novas espécies	59
4.3. “GC content dates gene gains in the <i>Drosophila</i> Y chromosome” (Vaz & Carvalho, artigo em preparação)	61
4.4. Localização e composição de bases de genes do cromossomo Y em outros drosofilídeos	77
4.5. Conteúdo gênico do cromossomo Y em espécies de <i>Drosophila</i> e gêneros próximos.....	82

4.1. “Developmental sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). V. Inflorescences of *Calathea cylindrica* and *C. monophylla* (Zingiberales: Marantaceae)” (Vaz *et al.*, 2014)

[Este artigo é continuação de uma série de trabalhos visando descobrir os substratos de desenvolvimento larval de espécies de drosofilídeos neotropicais (Santos & Vilela 2005). Aqui identificamos as espécies de drosofilídeos aspiradas e emergidas de inflorescências de duas espécies do gênero *Calathea* e descrevemos a espécie *Drosophila calatheae*]

MAY 2014
VOLUME 107
NUMBER 3

PUBLISHED BY THE
ENTOMOLOGICAL
SOCIETY OF AMERICA

US ISSN 0013-8746
AESAAI 107(3)
549–708 (2014)

EDITOR-IN-CHIEF

Lawrence E. Hurd

SUBJECT EDITORS

Michael B. Blackburn
Carlos A. Blanco
Michael S. Caterino
Christopher Dietrich
Lee A. Dyer
Ann M. Fraser
David J. Horn
Joshua R. King
Gadi V. P. Reddy
Mark A. Sarvary
Todd E. Shelly
Vonnie D. C. Shields
Allan T. Showler
Karen R. Sime
Allen L. Szalanski
David B. Taylor
Donald B. Thomas
S. Nelson Thompson
Kelley J. Tilmon

Annals of the Entomological Society of America

Developmental Sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera): V. Inflorescences of *Calathea cylindrica* and *Calathea monophylla* (Zingiberales: Marantaceae)

S. C. VAZ,^{1,2,3} C. R. VILELA,¹ F. J. KRSTICEVIC,² AND A. B. CARVALHO²

Ann. Entomol. Soc. Am. 107(3): 607–620 (2014); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/AN13148>

ABSTRACT In December 2006, 495 drosophilids belonging to 19 species were aspirated from inflorescences of *Calathea monophylla* (Vellozo) Körn at a forest reserve in the city of São Paulo, state of São Paulo, and 42 specimens belonging to three species of *Drosophila* were aspirated from those of *Calathea cylindrica* (Roscoe) Karl Schumann in an urban forest in the city of Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro, Brazil. In addition, 20 inflorescences of *C. monophylla* and 14 inflorescences of *C. cylindrica* were collected and observed for the emergence of flies in the laboratories. In total, 137 drosophilids belonging to *Zygothrica dispar* (Wiedemann, 1830) plus five species of *Drosophila* (*Drosophila griseolineata* Duda and four undescribed species) emerged from *C. monophylla* inflorescences, and a total of 22 specimens, all belonging to two undescribed species of *Drosophila*, emerged from those of *C. cylindrica*. *Drosophila calathea* sp. nov., ungrouped but related to both the *xanthopallescens* Pipkin and the *bromeliae* Patterson & Stone species groups, is described based on both aspirated and emerged flies from *C. monophylla* inflorescences from São Paulo city. This new species was also reared in the laboratory with a new medium recipe, thus providing larvae for chromosomal studies.

RESUMO Em dezembro de 2006, um total de 495 drosofilídeos pertencentes a 19 espécies foram aspirados de inflorescências de *Calathea monophylla* (Vellozo) Körn numa reserva florestal na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, e 42 espécimes pertencentes a três espécies de *Drosophila* foram aspirados de inflorescências de *Calathea cylindrica* (Roscoe) Karl Schumann, em uma floresta urbana na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Adicionalmente, 20 inflorescências de *C. monophylla* e 14 inflorescências de *C. cylindrica* foram coletadas e observadas quanto à emergência de moscas adultas em laboratório. Um total de 137 drosofilídeos pertencentes a *Zygothrica dispar* (Wiedemann) e a cinco espécies de *Drosophila* (*D. griseolineata* Duda e quatro espécies não descritas) emergiram de inflorescências de *C. monophylla*, e 22 espécimes, todos pertencentes a duas espécies de *Drosophila* não descritas, emergiram das inflorescências de *C. cylindrica*. *Drosophila calathea* sp. nov., espécie não agrupada, porém relacionada aos grupos *xanthopallescens* Pipkin e *bromeliae* Patterson & Stone, é descrita a partir de espécimes aspirados e emergidos de inflorescências de *C. monophylla* da cidade de São Paulo. Esta nova espécie também foi criada em laboratório com uma nova receita de meio de cultura, fornecendo larvas para estudos cromossômicos.

KEY WORDS *Drosophila*, flower-feeding, karyotype, Brazil

The Neotropical plant genus *Calathea* G.F.W. Meyer, occurring throughout the humid American tropics, comprises ≈300 species (Andersson 1998). There are an estimated 70–90 species inhabiting Brazil (Braga 2005), where they are vernacularly known as “caeté” or “caetê”. According to Andersson (1998), numerous species of *Calathea* occur primarily in swamp or riverine inundated forests and, although needing special

arrangements for indoor cultivation, are rapidly increasing in importance as ornamentals, especially in tropical and subtropical horticulture. Lorenzi and Souza (2008) display remarkable color photographs of 27 species of *Calathea* being cultivated as ornamentals in Brazil, which represent ≈9% of the species belonging to the genus. The flowers of *Calathea* have a corolla tube 5–25 times the length of its width and are grouped in roughly spiciform to capitate inflorescences (Andersson 1998).

Pipkin (1964) described species of *Drosophila* from Panama that depend on *Calathea* flowers to complete their development. Flower-associated *Drosophila* be-

¹ Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

² Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Corresponding author, e-mail: vazsuz@gmail.com.

Table 1. *Drosophilids aspirated from inflorescences of C. monophylla*

Species	Collection date: Dec., 2006 ♂ / ♀					Total (♂ + ♀)
	12	18	22	26	28	
<i>Drosophila bromelioides</i> Pavan & Cunha, 1947	1/1	6/2	1/1	3/2	1/-	18
<i>D. calathea</i> sp. nov.	1/1	15/5	21/17	38/26	35/18	177
<i>Drosophila caponei</i> Pavan & Cunha, 1947	-	-	-	4/-	-	4
<i>Drosophila cuaso</i> Bächli, Vilela, & Ratcov, 2000	-	-	4/1	-	-/1	6
<i>D. fuscolineata</i>	-	-	-	-	-/1	1
<i>D. griseolineata</i>	-	2/1	-	-	-	3
<i>D. mediopunctata</i>	-	-	-/1	-	-	1
<i>Drosophila ornatifrons</i> Duda, 1927	-	-	-	-/2	-	2
<i>Drosophila paraguayensis</i> Duda, 1927	1/-	2/1	3/1	-	1/-	9
<i>Drosophila trifilum</i> Frota-Pessoa 1952	-	1/-	-	-	-	1
<i>Drosophila</i> sp. B3	1/-	3/-	1/-	1/1	1/-	8
<i>Drosophila</i> sp. W3	2/2	-/2	2/2	-	-	10
<i>Drosophila</i> sp. G4	2/1	7/5	23/10	41/29	71/37	226
<i>Drosophila</i> sp. I4	-	3/4	1/1	3/3	6/3	24
<i>Drosophila</i> sp. (<i>morelia</i> group)	-	1/-	-	-	-	1
<i>Drosophila</i> sp. ?	-	-/1	-	-	-	1
<i>Diathoneura</i> sp. 1	-	-	1/-	-	-	1
<i>Diathoneura</i> sp. 2	-	-	1/-	-	-	1
<i>Paramycodrosophila costaricana</i> Duda 1925	1/-	-	-	-	-	1
Total	9/5	40/21	58/34	90/63	115/60	495

Collections made in five nonconsecutive days in December 2006 at the forest reserve of the IB-USP (23° 33.96' S; 46° 43.72' W, ≈750 m elevation), CUASO, São Paulo, state of São Paulo, Brazil.

longing to several species groups within the subgenus *Drosophila*, such as the *bromeliae*, *flavopilosa*, *xanthopallenscens*, and *onychophora*, as well as to other subgenera, such as *Phloridosa* and *Siphodora*, have been reported from the Neotropical Region (reviewed in Brncic 1983). The ability to exploit such resources has been independently acquired several times in different lineages (Markow and O'Grady 2008). Imagoes of these species depend on living flowers for displaying sexual behavior, feeding, and ovipositing, whereas larval development and metamorphosis can occur on both living and fallen (decaying) flowers.

The purpose of this article is twofold: 1) to identify drosophilids associated with two species of *Calathea* in southeastern Brazil by aspirating adult flies directly from inflorescences in the field and by observing imago emergence from infested flowers in the laboratory, and 2) to describe the most abundant of the five new species of *Drosophila* that were collected. This article is the fifth of a series (Vilela and Pereira 1992, Vilela and Selivon 2000, Vilela 2001, Santos and Vilela 2005) aiming to determine the developmental sites of Neotropical drosophilids.

Materials and Methods

Collection and Handling of Flies and Floral Resources. Collections were made in the cities of São Paulo and Rio de Janeiro. During the late summer blooming season (December 2006 to January 2007), plants of *Calathea monophylla* (Vellozo) Körn (non-ornamental) from a São Paulo urban forest reserve of the Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" (CUASO), and of *Calathea cylindrica* (Roscoe) Karl Schumann, an ornamental from Rio de Janeiro in the Jardim Botânico district, adjacent to

Parque Nacional da Tijuca (PNT), an urban reserve, were inspected for the presence of adult drosophilids. Imagoes swarming around or perching on inflorescences were aspirated, followed by the collection of 20 inflorescences of the former species and 14 of the latter.

For the São Paulo collection, the inflorescences were taken to the laboratory in screen-capped plastic boxes and halved longitudinally. Halves were placed individually in 250-ml vials containing wet sand and plugged with synthetic foam stoppers. The vials were kept in an incubator with constant temperature (22 ± 1°C) and photoperiod of 13:11 (L:D) h, until emergence of adult drosophilids and other insects. To prevent desiccation, water was added to the vials with a plant sprayer when necessary. Emerged insects were removed daily, late in the afternoon, with an aspirator until no further emergence took place (≈4 wk). All emerged adults were maintained on banana-agar culture media for ≈20 d and then preserved in 70% ethanol. Later, drosophilids were dehydrated by passage through 100% ethanol, tertiary butanol, and hexane (>2 h each) and double-mounted by gluing to cardboard points (Bächli et al. 2004). Flies were sexed and, when possible, identified to species. For detailed information regarding the forest reserve of the IB-USP, formerly known as forest reserve of the CUASO, see Rossi (1994) and Groppo and Pirani (2005). According to the latter paper, two species of *Calathea*, *Calathea lietzei* E. Morren and *Calathea communis* Wanderley & S. Vieira, are present in the forest reserve. The first is an introduced species and the latter, which is native to the area, was later (Braga 2005) placed in synonymy with *C. monophylla*. No voucher specimens of *C. monophylla* were collected during this project, as three dried specimens (two of them being paratypes [M. Groppo Jr. 70 and M. Groppo Jr. 246]

Figs. 1–6. *C. monophylla*. (1) Clumps of *C. monophylla* (São Paulo). (2) Detail of an inflorescence. (3) *D. calathea* sp. nov. female ovipositing on a *C. monophylla* petal at laboratory. (4) Egg of *D. calathea* sp. nov. on *C. monophylla* petal (note its four filaments). (5) Larva of *D. calathea* sp. nov. from laboratory culture (note its very long posterior spiracles). (6) Puparia of *Drosophila* sp. I4 (upper) and *D. calathea* sp. nov. (lower): note the long horn and the wide air-filled space on the anterior end, probably related to floatation inside bracts phytotelmata. Scale bars = 50 and 5 cm in 1 and 2, respectively, and 1 mm in 3–6.

of *C. communis*) from the collection site had been previously deposited in the herbarium of the Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP (coded SPF).

For the Rio de Janeiro collection, inflorescences were treated in much the same way as those from São Paulo, except for the following. Inflorescences were kept individually in larger vials (1,000 ml) in natural summer photoperiod of 14:10 (L:D) h and examined at 2, 5, and 17 d post collection for emerged adults,

which were preserved in 95% ethanol. Currently, the main forest remnant in Rio de Janeiro city is PNT, which covers $\approx 30 \text{ km}^2$. The park originated with a reforestation project in the second half of the 19th century and is now considered the world's largest urban forest. The collection sites (locally known as Jardim Botânico or Horto Florestal at $\approx 22^\circ 57.95' \text{ S}$, $43^\circ 14.31' \text{ W}$) are adjacent to PNT.

At the São Paulo collection site, the nonornamental and native host plant *C. monophylla* blooms from Oc-

Figs. 7–12. *C. cylindrica*. (7) Clump of *C. cylindrica* (Rio de Janeiro). (8) Inflorescence of *C. cylindrica* (arrow points to a *D. calathea* sp. nov. specimen). (9) A couple in copula on a *C. cylindrica* petal. (10) Same as anterior figure with a male voyeur. (11) Close view of *D. calathea* sp. nov. specimen from laboratory culture on a tip of inflorescence bract placed over culture medium. (12) Four-filamented egg on culture medium. Scale bars = 15 and 1 cm in 7 and 8, respectively, and 1 mm in 9–12.

tober to December (Groppo and Pirani 2005) and occurs along the swampy banks of a brooklet, whereas at the Rio de Janeiro collection site, the ornamental and invasive host plant species *C. cylindrica* blooms year-round and has an affinity for well-lit forest edges (Barreto and Freitas 2007).

Identification and Imaging of Fly and Plant Taxa. Plant species were identified using Wanderley and Vieira (2002), Braga (2005), Groppo and Pirani (2005), and Lorenzi and Souza (2008). *Drosophilids* were identified using Malogolowkin (1953), Burla

Table 2. *Drosophila* species aspirated from inflorescences of *C. cylindrica*

Species	♂	♀	♂ + ♀
<i>Drosophila</i> sp. G4	13	12	25
<i>D. calathea</i> sp. nov.	7	8	15
<i>Drosophila cardinoides</i>	1	1	2
Dobzhansky and Pavan, 1943			
Total	21	21	42

Collections made in five nonconsecutive days in December 2006 in Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro, Brazil (at forest sites adjacent to PNT; 22° 57.95' S; 43° 14.31' W, ≈90 m elevation).

Table 3. Drosophilids emerged in laboratory from 20 inflorescences of *C. monophylla*

Species	Emergency date: Dec., 2006/Jan., 2007 ♂ / ♀																		Total (♂ + ♀)		
	29	30	31	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15		16	17
<i>D. calathea</i> sp. nov.	1/2	1/1	7/5	5/5	2/5	1/1	1/1	3/1	-/2	2/4	3/5	2/3	1/-	1/1	-/1	-	-	-	1/-	-	68
<i>D. griseolineata</i>	-	-	-	-	1/-	-	-/1	-	-	1/1	-	1/-	-	-	1/-	-	-	-/1	-	-	7
<i>Drosophila</i> sp. B3 (tripunctata group)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/1	-	-	1/1	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Drosophila</i> sp. G4 (guarani group)	-	1/-	-	-	2/-	1/1	-/1	-/1	1/-	-	1/1	1/1	4/2	1/1	-/2	-	-	-	-	-	22
<i>Drosophila</i> sp. I4 (undetermined group)	-	-/2	2/1	2/2	1/5	2/1	-/1	2/1	1/1	-/1	-	-	-	-/1	-	-/3	-	-	-	-/1	30
<i>Z. dispar</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/-	-	-/1	-/1	1/2	1/-	-	-	-	7
Total	1/2	2/3	9/6	7/7	6/10	4/3	1/4	5/3	2/3	3/7	4/6	5/4	6/3	2/4	1/4	1/5	1/-	-/1	1/-	-/1	137

Inflorescences kept under controlled temp ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) after collection on 29-XII-2006 at the forest reserve of the IB-USP ($23^\circ 33.96' \text{S}$; $46^\circ 43.72' \text{W}$, $\approx 750 \text{ m}$ elevation), CUASO, São Paulo, State of São Paulo, Brazil.

(1954), Breuer and Rocha (1971), Val (1982), Grimaldi (1987), Vilela and Bächli (1990), and Bächli et al. (2000). Flies were identified to species by examination of external morphology and male terminalia, especially the aedeagus, which can be extruded by gently squeezing the distal end of the abdomen of anesthetized live specimens, as detailed by Spassky (1957). Dissections were performed according to Wheeler and Kambyssellis (1966), as modified by Kaneshiro (1969) and Bächli et al. (2004), when necessary. Samples of aspirated and emerged flies, including non drosophilids, were pinned, labeled, and deposited in the Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZSP), São Paulo, São Paulo. Nondrosophilid flies were not identified.

Photomicrographs of terminalia structures were taken with an Olympus BX60 microscope and an Olympus Q-Color 5 digital camera. A $10\times$ objective was used to generate a set of 20–50 pictures by manually focusing on a given structure at different depths. This set of photomicrographs was then digitally stacked to create an all-in-focus composite (open-source software CombineZP at <http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/CZP/Installation.htm>). This technique works especially well for heavily sclerotized structures in oblique posterior view (e.g., Fig. 21) where minor internal details do not show up clearly. Photomicrographs of polytene and metaphase chromosomes were taken with $40\times$ and $100\times$ oil immersion objectives, respectively. Outdoor photographs were taken with either analog (for *C. monophylla*) or digital (for *C. cylindrica*) portable cameras. Close views of flies, eggs, pupae, and wing were obtained on a stereomicroscope with an integrated digital camera, except for type specimens that were photographed with analog equipment.

Rearing Flies in Laboratory. Although apparently being a flower feeding and breeding specialist, *Drosophila calathea* sp. nov. collected in Rio de Janeiro was reared for ≈ 4 yr (2007–2011) in the laboratory using a new flower enriched medium: agar (1.9 g), mold inhibitor methylparaben (0.7 g), Fleischmann's dry yeast (6.6 g), malt extract (7.2 g), banana fruits of the prata cultivar (112.5 g), Karo corn syrup (11.4 g), and inflorescences of *C. cylindrica* (34 g). The inflorescences were collected during the rainy season,

from October to March, placed inside zipper storage plastic bags, and frozen at -20°C until used. The ingredients were placed into a blender jar with 240 ml of deionized water and homogenized for 4 min, with the mold inhibitor previously dissolved in ethanol. The soft mixture was then heated to boiling with continuous stirring. After boiling, 0.53 ml of propionic acid (an additional mold inhibitor) was added to cooled medium ($<70^\circ\text{C}$). The medium was then poured into 300-ml glass bottles. To simulate oviposition sites, a tip of thawed inflorescence was placed on the surface of the medium. The flies were kept at 22°C in a rearing chamber and transferred once a week to fresh medium.

Preparation of Mitotic and Polytene Chromosomes. Larvae were sexed (Cooper 1950) and dissected. For each sample, cerebral ganglia, imaginal discs, and salivary glands were simultaneously extracted. The first two structures were used for preparation of metaphase chromosomes, whereas the salivary glands were used for preparation of polytene chromosomes. Polytene chromosomes were prepared with the squash technique followed by staining with lacto-acetic-orcein (Ashburner 1989). We followed the protocol of Pimpinelli et al. 2000 for mitotic chromosomes with the following modifications: a drop of sodium citrate (0.5%) plus a drop of potassium chloride (0.28%) as the hypotonic solution, no colchicine, a fresh mixture of ethanol and acetic acid (3:1) as the fixative solution, and lacto-acetic-orcein as the staining solution described by Ashburner (1989).

Description Model. Description of the new species follows Vilela and Bächli (1990, 2000) and Bächli et al. (2004, 2005). Measurements of paired structures were

Table 4. *Drosophila* species emerged in laboratory from 14 inflorescences of *C. cylindrica*

Species	♂	♀	♂ + ♀
<i>D. calathea</i> sp. nov.	9	12	21
<i>Drosophila</i> sp. I4	1	0	1
total	10	12	22

Inflorescences collected on 22-XII-2006 at Horto Florestal, border of PNT, Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro, Brazil ($22^\circ 57.95' \text{S}$; $43^\circ 14.31' \text{W}$, $\approx 90 \text{ m}$ elevation). Emerged flies aspirated on 24-XII-2006, 27-XII-2006, and 8-I-2007.

Figs. 13–15. *Z. dispar* male. (13) Anesthetized adult emerged from *C. monophylla* inflorescence, dorsal view. (14) Internal terminalia of the same specimen, ventral view (proximal end of aedeagal apodeme missing; arrow points the accidentally cut tip). (15) Idem, left lateral view. Scale bars = 1 and 0.1 mm, respectively.

taken from the flies' left side. The right wing of one female paratype was removed and treated with the same procedure used for preparing the terminalia, including staining with diluted Gage's stain. Label data attached to each type specimen are cited in full with slashes indicating a label change and clarifying notes are included in brackets.

Results and Discussion

Drosophilids aspirated and emerged from inflorescences of *C. monophylla* and *C. cylindrica*, collected in São Paulo and Rio de Janeiro, respectively, are listed in Tables 1–4. The 11 most abundant (>1 individual) aspirated species of *Drosophila* and all emerged drosophilids

are included in separate identification keys (Supp Keys 1 and 2 [online only], respectively). As stressed by Carson (1971), although most species of *Drosophila* are attracted and able to feed upon a large variety of substrates, oviposition and larval development are more host-specific. The close association between the most abundant new species of *Drosophila*, described below, and its putative primary host plants (inflorescences of *C. monophylla* and *C. cylindrica*) is shown in Figs. 1–12.

Aspirated Flies. In total, 495 drosophilids belonging to 19 species were aspirated from living inflorescences of *C. monophylla* (Table 1) and 42 specimens belonging to three species of *Drosophila* were aspirated from those of *C. cylindrica* (Table 2). As with fleshy fungi

Figs. 16–19. *D. calatheae* sp. nov. two type specimens. (16–17) Male holotype in dorsal and left lateral views, respectively. (18–19) Female paratype in dorsal and left lateral views, respectively. Scale bar = 1 mm.

(Grimaldi 1987), only a small subset of the species feeding or resting or displaying sexual courtship behavior on inflorescences use them as larval developmental sites. Five undescribed species of *Drosophila* were aspirated from the inflorescences of *C. monophylla*. One species, described below as *D. calatheae*, has thus far been successfully reared in laboratory conditions, allowing for detailed analysis. The remaining four species (coded with a capital letter followed by a number in Table 1) will be the subjects of forthcoming papers. *Drosophila fuscolineata* Duda and *Drosophila mediopunctata* Dobzhansky and Pavan, for which only one female specimen was aspirated from the inflorescences, were identified using their male offspring.

Emerged Flies. In total, 137 drosophilids belonging to *Zygothrica dispar* (Wiedemann, 1830), and five species of *Drosophila*, *D. griseolineata* plus four putatively undescribed species, emerged from the inflorescences of *C. monophylla* collected in São Paulo (Table 3), whereas 22 specimens, all belonging to two undescribed species of *Drosophila*, emerged from the inflorescences of *C. cylindrica* collected in Rio de Janeiro (Table 4). A broad-headed male of the polymorphic species *Z. dispar* that emerged from an inflorescence of *C. monophylla* was photomicrographed (Fig. 13), dissected, and had its identification confirmed through the analysis of the terminalia (also photomicrographed; Figs. 14 and 15). Unfortunately, part of the anterior region of the aedeagal apodeme

was accidentally cut and lost during dissection, thus not showing its complete extension well beyond the anterior margin of hypandrium, which, as stated by Grimaldi (1987), has an important diagnostic feature. However, its extension could be deduced from the remaining part. Like most, if not all, of its congeners, *Z. dispar* is often seen in relatively large numbers over fleshy fungi. However, after surveying the literature on >100 described species of Neotropical *Zygothrica*, Grimaldi (1987) noted that only 3 of ≈ 16 species, for which the breeding sites are known, were found to use fungi as larval developmental sites. So far, *Z. dispar* has been reared from decaying flowers of *Brunfelsia grandiflora* D. Don (according to Frota-Pessoa 1952) and *Brunfelsia excelsa* (according to Malogolowkin, 1953

Fig. 20. Left wing of an ordinary *D. calatheae* sp. nov. female aspirated from *C. cylindrica* from Rio de Janeiro, ventral view. Scale bar = 1 mm.

Figs. 21–30. *D. calatheae* sp. nov. (21–29) Male holotype and female paratype terminalia. (21) Epandrium, cerci, surstyli, and decasternum; oblique posterior view. (22) Hypandrium and gonopods, posterior view. (23) Idem, left lateral view. (24–28) Aedeagus–aedeagal apodeme and paraphyses, several views from dorsal through ventral. (29) Tergite VIII, epiproct, hypoproct, and left oviscapt valve; left lateral view. (30) Spermathecae and inner capsules, lateral view. Scale bar = 0.1 mm.

and Grimaldi 1987; however this binomial was not found in the botanical literature), belonging to the Solanaceae, in the Rio de Janeiro Botanical Garden, Brazil. According to Frota-Pessoa (1952), it has also been reared from living flowers of two ornamental and exotic species, *Hedychium coronarium* J. Koenig (Zingiberaceae) and *Thumburgia alata* Bojer ex Sims (Acanthaceae), collected in the same Botanical Garden. Santos and Vilela (2005) reared this species from a fallen flower of *Cestrum amictum* Schlechtendal (Solanaceae) and, based on this observation and the literature, they wrote that *Z. dispar* “seems to be an opportunistic, polyphagous and ground-feeding species that could oviposit in any decaying flower.”

The smaller diversity of species that emerged from the inflorescences in the Rio de Janeiro collection compared with the São Paulo collection may be because of different plant samples, 14 and 20 inflorescences collected, respectively. It could also be because of the host plant species itself, an ornamental and invasive at the collection site (*C. cylindrica*) versus the native (*C. monophylla*).

Four of five putatively undescribed species of *Drosophila* aspirated from inflorescences of *C. monophylla*, including the new species described below, also emerged from them. This species of “caeté” is most likely the main host plant used by those *Drosophila* species for larval development.

Table 5. Comparison among *D. calathea* sp. nov. and the *bromeliae* and *xanthopallescens* species groups regarding morphology, chromosomes, and developmental sites

Characteristics	Taxon		
	<i>D. calathea</i> sp. nov.	<i>bromeliae</i> group	<i>xanthopallescens</i> group
Body color	Dull yellow	Idem	Idem
Prescutellars	Yes	Yes	No
Wings	Spotted; costal index ≈ 1.3	Unspotted; costal index > 2	Unspotted; costal index > 2
Male terminalia	Hypandrium without dorsal arch; anal plates fused to epandrium	Idem	Idem
Testes	6–7 coils	3–6 coils	8–11 coils
Ventral receptacle	< 30 coils	≈ 10 coils	> 90 coils
Karyotype	$2n = 10$	$2n = 8$	Unknown
Host plant families	Marantaceae and Heliconiaceae	> 10	Marantaceae and Heliconiaceae

Data compiled from Sturtevant (1921: 72–73), Pavan and da Cunha (1947: 24–27), Throckmorton (1962: 254), Pipkin (1964: 231–237), and Brncic (1983: 336–339); morphological terminology and botanical taxonomy updated following Bächli et al. (2004) and Lorenzi and Souza (2008), respectively.

***Drosophila calathea* Vaz, Vilela, Krsticevic
et Carvalho sp. nov.**

(Figs. 3–6[lower], 8–12, 16–41)

Type Material. (26 imagines [13 ♂♂ and 13 ♀♀], deposited in MZSP). **HOLOTYPE:** 1 male (Figs. 16–17) [photomicrographed, double-mounted, dissected, terminalia illustrated] labeled: “Brasil - SP - São Paulo, Reserva Florestal do IB-USP, Cidade Universitária (M18), 12 to 28-XII-2006, C.R. Vilela coll./aspirada de inflorescência de [aspirated from inflorescence of] *C. monophylla* / *D. calathea* ♂ Vaz et al./HOLOTYPE/[microvial with terminalia in glycerin]”. **PARATYPES:** Twenty-five (12 ♂♂, 13 ♀♀), same data as holotype, except for 3 ♂♂ and 4 ♀♀, coded M20, emerged from inflorescences collected on 29-XII-2006 and bearing the label: “emergida de inflorescência de [emerged from inflorescence of] *Calathea monophylla*”. Two of the female paratypes were dissected, and one was previously photomicrographed (Figs. 18 and 19) and other had its right wing removed.

Type Locality. BRAZIL: State of São Paulo, São Paulo, Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira,” Forest Reserve of IB-USP (23° 33.96' S; 46° 43.72' W, ≈ 750 m elevation; urban secondary Atlantic Forest fragment, stream border, aspirated over or emerging from inflorescences of *C. monophylla*).

Diagnosis. Body color dull brownish yellow, covered with brown setae and setulae; orange eyes (in live specimens); frons brownish yellow, medially and laterally light brown pollinose; antennae and palpi brownish yellow, the latter sexually dimorphic; scutum brownish yellow; h index 0.7–1.2; mid katapisternal ≈ 33 –67% of the anterior one; two large prescutellars; abdomen dull, uniformly yellow; wings light brown, slightly darker anteriorly, conspicuously spotted (Fig. 20); C index 1.1–1.4.

Male. (Figs. 16 and 17). Head brownish yellow, relatively large, slightly laterally enlarged somewhat embracing the anterior border of the thorax. Frons brownish yellow, dull, frontal length 0.36 mm (0.32–0.39 mm); frontal index = 1.01 (0.93–1.14), top to bottom width ratio = 1.50 (1.31–1.71). Frontal triangle light brown pollinose, $\approx 100\%$ of frontal length; ocellar triangle shiny light brown, ≈ 31 –40% of frontal length.

Or3 to or1 = 67–120% of that to inner vertical; or1–or3 ratio = 0.99; or2–or1 ratio = 0.68; poc 35–54%, oc 67–80% of frontal length; vt index = 1.12 (1.00–1.22), vibrissal index = 0.44 (0.22–0.56), facial carina light brown, nose-like, slightly sulcate. Gena light brown, cheek index ≈ 12.54 (9.33–15.00). Eye conspicuously large, orange (in live specimens, somewhat similar to the mutant *eosin* of *Drosophila melanogaster* (Meigen)). Eye index = 1.42 (1.32–1.56). Pedicel brown, laterally lighter, first flagellomere light brown, length to width ratio 1.58 (1.20–2.00). Arista with 4–5 dorsal, 2–3 ventral, and 2–7 tiny inner branches, plus terminal fork. Proboscis brown. Palpus brownish yellow, globose, densely haired, brush-like.

Thorax brownish yellow; length 1.25 mm (1.19–1.32 mm). Scutum pollinose, brownish-yellow, 8–9 rows of acrostichal setae. h index = 0.92 (0.73–1.12). Transverse distance of dorsocentral setae 309% of longitudinal distance; dc index = 0.64 (0.59–0.71). One pair of large prescutellars, prscut index = 0.48 (0.38–0.56). Scutellum pollinose, laterally light brown, medially darker; distance between apical scutellar setae $\approx 80\%$ of that of apical to basal one, basal setae convergent; apical setae cruciate, scut index = 0.90 (0.84–1.00). Halteres yellow. Pleura brownish yellow, sterno index = 0.74 (0.67–0.88), mid katapisternal seta ≈ 31 –67% of the anterior one. Legs brownish yellow.

Wing (Fig. 20) light brown, anteriorly slightly darker, lappet dark brown, bearing five conspicuous dark brown spots along distal border, decreasing in size from first through fifth, both cross-veins strongly clouded, length 2.38 mm (2.29–2.49 mm), length to width ratio = 2.05 (1.98–2.11). Indices: C = 1.26 (1.17–1.36), ac = 2.94 (2.54–3.36), hb = 0.64 (0.60–0.66), 4C = 1.42 (1.32–1.56), 4v = 1.51 (1.39–1.62), 5x = 0.84 (0.73–1.00), M = 0.37 (0.31–0.46), prox. x = 0.70 (0.64–0.75).

Abdomen uniformly yellow, tergites devoid of distal marginal bands. Male sternite 5 wider (1.7 times) than long.

Terminalia. (Figs. 21–28). Epandrium mostly microtrichose, with 17 lower, and no upper setae; ventral lobe microtrichose ventrally, distally slightly concave, dorsoposteriorly partially fused to surstylus and

Figs. 31-38. Metaphasic and prometaphasic neuroblast chromosomes of *D. calathea* sp. nov. ($2n = 10$), from an isofemale line from Rio de Janeiro. (31-34) Females (XX). (35-38) Males (XY). Note the entirely heterochromatic J-shaped Y chromosome and the remarkably huge and heterochromatic pair, which probably corresponds to typical *Drosophila* spp. dot chromosomes. Arrow in 36 points to the partially heterochromatic V-shaped autosome pair. Scale bar = 5 μm .

slightly covering it. Cerci anteriorly and medially fused to epandrium, mostly microtrichose and devoid of ventral lobe. Surstylus dorsally fused to distal one-quarter of epandrium lobe, ventrally microtrichose, bearing ≈ 10 dorso-positioned, cone-shaped prensisetae, 28 outer and mostly over ventral area, and two inner setae. Decasternum as in Fig. 21. Hypandrium (Figs. 22 and 23) U-shaped in ventral view (flattened in lateral view), anterior and posterior margins somewhat concave, shorter than epandrium; posterior hypandrial process and dorsal arch absent; gonopod fused to hypandrium (fusion line apparent), linked to paraphysis by membranous tissue, apparently bearing one setula near the anterior inner margin. Aedeagus (Figs. 24-28) short, anteriorly expanded laterally,

somewhat hut-shaped, fused to aedeagal apodeme, dorsally convex, ventrally bearing a pair of short, anteriorly projected spurs, which reach the paraphysis; dorsal cleft reduced to a small opening adjacent to the fusion aedeagus-aedeagal apodeme. Aedeagal apodeme shorter than aedeagus, posteriorly expanded, laterally flattened. Ventral rod entirely fused to aedeagal apodeme. Paraphysis square-shaped, not microtrichose, distally with one setula, connected to distal margin of aedeagal apodeme by membranous tissue.

Female. (Figs. 18 and 19). Measurements: frontal length 0.38 mm (0.34-0.42) mm; frontal index = 0.99 (0.88-1.07), top to bottom width ratio = 1.46 (1.07-1.67). Frontal triangle $\approx 100\%$ of frontal length; ocellar

Fig. 39. Ideogram of *D. calathea* sp. nov. male karyotype. Black regions = strong heterochromatin, gray = light heterochromatin, white = euchromatin. The first pair represents the sex chromosomes, the second pair is the partially heterochromatic one, and the aberrantly huge fifth pair represents the heterochromatic *Drosophila* dot. Interpretation was based on a larger set of metaphasic plates than those shown in Figs. 31–38.

≈31–40% of frontal length. Or3 to or1 = 83–120% of that to inner vertical; or1–or3 ratio = 1.01; or2–or1 ratio = 0.66; poc 35–47%, oc 59–80% of frontal length; vt index = 1.10 (1.00–1.22); vibrissal index = 0.44 (0.22–0.62). Cheek index ≈11.97 (7.50–16.00). Eye index = 1.32 (1.27–1.39), first flagellomere length to width ratio 1.70 (1.33–2.25). Arista with 4–5 dorsal, 2 ventral, and 2–4 tiny inner branches, plus terminal fork. Palpus brownish yellow, boomerang-shaped, sparsely haired. Thorax length 1.36 (1.20–1.46) mm. — Eight to nine rows of acrostichal setae. h index = 1.00 (0.90–1.22). Transverse distance of dorsocentral setae 307% of longitudinal distance; dc index = 0.62 (0.50–

0.71); prscut index = 0.47 (0.44–0.53). Distance between apical scutellar setae ≈79% of that of apical to basal one, scut index = 0.90 (0.84–0.95). Sterno index = 0.78 (0.61–0.88), mid katepisternal seta ≈33–64% of the anterior one. Wing length 2.55 (2.44–2.68), length to width ratio = 2.04 (1.94–2.15). Indices: C = 1.28 (1.12–1.40), ac = 2.99 (2.80–3.08), hb = 0.63 (0.58–0.67), 4C = 1.46 (1.38–1.60), 4v = 1.56 (1.48–1.68), 5x = 0.84 (0.75–0.92), M = 0.37 (0.33–0.44), prox. x = 0.73 (0.65–0.88).

Terminalia. (Figs. 29 and 30). Tergite VIII dorso-posteriorly microtrichose, strongly sclerotized in its upper two-thirds, weakly sclerotized in its lower one-third, ventrally bearing six setulae. Oviscap valve apically rounded with ≈12 marginal and six discal peg-like ovisensilla. Spermathecal capsule spherical, sclerotized, proximally sulcate, distally papillate (Fig. 30); basal introvert approximately five-sixths of capsule length; apical introvert absent.

Eggs. Whitish, bearing four filaments of equal length; posterior ones twice as wide as anterior ones (Figs. 4 and 12).

Puparia. Remarkably long (≈5.6 mm, without spiracles) relative to body length of imagoes (≈4 mm without wings); light brown; long horns (Fig. 6 [lower]); horn index ≈3.8; stalk of anterior spiracle conspicuously black, with ≈22 light brownish yellow tracheal branches.

Etymology. The epithet *calathea* is a noun in the genitive case, referring to the putative main host plants genus (*Calathea* spp.).

Distribution. Cities of São Paulo (type locality) and Rio de Janeiro, Brazil. However, it probably also occurs in the states of Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul, following the distribution range of *C. monophylla* (Wanderley and Vieira 2002: 117 [cited as *C. communis*] and Braga 2005). We predict *D. calathea* sp. nov. might also occur in the eastern parts of the states of Bahia and Espírito Santo, in association with flowers of *C. cylindrica* according to this plant distribution (Barreto and Freitas 2007: 422). Although *C. cylindrica* is not present in the forest reserve of the IB-USP (Groppo and Pirani 2005: 201), located in the western part of São Paulo, it does occur naturally in a much larger area (527 ha) named “Parque Estadual das Fontes do Ipiranga,” a state park

Figs. 40–41. Salivary gland polytene chromosomes of *D. calathea* sp. nov. third-instar larvae. (40) Female. (41) Male. Note the two long X chromosome arms in each sex. Arrow points to chromocenter. Scale bar = 10 μ m.

Figs. 42–43. Putative pollinator and robber bees (Apidae) of *C. monophylla*. (42) *B. (Fervidobombus) morio* female, (43) *E. (Euglossella) mandibularis* male. Specimens were collected at the forest reserve of IB-USP, CUASO, São Paulo, São Paulo, by net sweeping over inflorescences. Scale bar = 1 cm.

of natural Atlantic Forest located in the southern part of the city (Wanderley 1991).

Relationship. This species cannot be adequately included within any known Neotropical *Drosophila* species group at this time. It shares features with the *bromeliae* and *xanthopallescens* species groups (Table 5). These two, poorly known, groups are in need of revision to clarify their relationships.

Chromosomes. *D. calatheae* sp. nov. has a diploid chromosome number of $2n = 10$ (Figs. 31–38). Female mitotic metaphase consists of four pairs of V-shaped and one pair of rod-shaped chromosomes (Figs. 31–34). Male mitotic metaphase differs from the female in having a J-shaped Y chromosome (Figs. 35–38). The largest V-shaped pair is almost completely heterochromatic and presents a secondary constriction in the less heterochromatic arm. This pair probably corresponds to the dot chromosome of the supposedly plesiomorphic karyotype ($2n = 12$ [five pairs of rod, one pair of dots]; Sturtevant and Novitski 1941). Unexpectedly, it is not dot-like, being about twice as long as the second largest chromosome (the X chromosome). A similar condition, although not presenting such a remarkable size difference, has been described for *Drosophila dreyfusi* Dobzhansky & Pavan (*dreyfusi* group) by Dobzhansky and Pavan (1943) and for *Drosophila arauna* Pavan & Nacur (*annulimana* group) by Tosi and Pereira (1993). Heterochromatic blocks were also detected adjacent to the centromere of one arm of a medium-sized V-shaped pair (Fig. 36, arrow). Apparently, there is a tendency for the heterochromatic chromosomes (largest V-shaped and Y) to remain close to each other at the mitotic metaphase plates. Figure 39 summarizes our interpretation of *D. calatheae* sp. nov. karyotype. Only six chromosomal arms, corresponding to euchromatic regions, were evident in the polytene preparations (Figs. 40–41). A chromocenter (Fig. 40, arrow) strongly unites the two X chromosome arms to the arm of the rod-shaped chro-

sosome, the remaining pairs apparently stand unattached or detach frequently during the squashing process. No karyotypic variation was detected between the samples from São Paulo and Rio de Janeiro.

Ecology. Larvae develop in inflorescences of *C. monophylla*, *C. cylindrica* (Marantaceae), and *Heliconia bihai* (L.) (Heliconiaceae). We predict the larvae could be pollen, nectar, or petal feeding, most probably after the pollinator has triggered the explosive pollination mechanism while opening the flowers.

Laboratory Rearing. Aiming to establish isofemale lines, 31 specimens of *D. calatheae* sp. nov. (17 ♂♂: 14 ♀♀) were aspirated from several inflorescences of *C. monophylla* at the forest reserve of the IB-USP, São Paulo (São Paulo), on 17 and 19 November 2009 (coded M39), and distributed randomly in seven vials (at least a couple per vial) containing banana-agar medium in addition to two fresh open *Calathea* flowers per vial. Occasionally, flies, primarily females, moved their proboscis rapidly back and forth over the wet outer surface of the darker and grayish petals and staminodes suggesting they were feeding. Subsequently, the gut of females usually turned grayish and became somewhat visible through the semitransparent abdominal pleura, reinforcing our suspicion. On 24 November 2009, the flies were transferred to seven new vials containing fresh culture medium plus fresh flowers collected early in the morning. Late in the afternoon, dozens of four-filamented eggs were observed mainly on the basal region of the outer surface of petals and petal-like staminodes of most flowers, especially those that were wetter and darker. Larvae were also seen moving around the curved stigma of pollinated flowers and within the corolla tube. Even though it is likely the eggs and larvae belong to *D. calatheae* sp. nov., the most abundant species, other less abundant species of Drosophilidae could also have oviposited before the flowers were collected. While transferring the flies, three larvae were observed on

the banana-medium of one of the seven original vials (then kept at uncontrolled room temperature) where they developed and pupariated on different dates. One puparium was more roundish and reddish brown in color, bearing rather conspicuous black branches emerging from reddish brown horns, and the other was more elongate, light brown in color and bore inconspicuous brown-colored branches emerging from the horns. Upon emerging from the darker puparium, one male imago was identified as *Z. dispar*; however, no imago emerged from the lighter puparium because its pupa had mummified. It clearly was not *D. calathea* sp. nov. because of its relatively short puparial horn. The remaining larva pupariated on 3 December and upon emerging was identified as a female *Z. dispar*. Similar to one of the two puparia that was previously observed, it had the conspicuously black branches emerging from reddish brown horns.

A modified culture medium enriched with previously frozen inflorescences of *C. cylindrica* was successfully used in Rio de Janeiro to maintain an isofemale line of *D. calathea* sp.n. for ≈ 4 yr.

Remarks. An additional and preliminary experiment took place in an island named “Ilha Grande” (a forest reserve in Angra dos Reis, state of Rio de Janeiro) to verify if inflorescences of *H. bihai* are used as developmental site by drosophilids. In six nonconsecutive days between October and November, 2008, drosophilids were aspirated from the bracts of this plant, and 9 of the 23 collected flies belonged to *D. calathea* sp. nov. On 11 December 2008, 10 inflorescences were collected and kept in plastic vials and observed until 22 December 2008. From the 33 emerged drosophilids, 14 belonged to this new species. We have also aspirated *D. calathea* sp. nov. from *H. bihai* bracts in “Quinta da Boa Vista” (Rio de Janeiro) ≈ 100 km from the first cited collection site.

Putative Pollinators and Robbers. Large Apidae bees were sometimes seen flying around inflorescences while the flies were being aspirated at the São Paulo collection site. On 22 December 2009, three large bees belonging to two different species were netted while landing on inflorescences of *C. monophylla*: two females *Bombus* (*Fervidobombus*) *morio* Swederus (Fig. 42), and a male *Euglossa* (*Euglossella*) *mandibularis* (Fig. 43). The bumblebee *B. morio* is abundant in southern Brazil where it has been collected on almost one-fourth of the plant species in urban and natural biomes (Cortopassi-Laurino et al. 2003), and is most probably a nectar (or pollen) robber of *Calathea* spp. flowers. *Euglossa* is a genus of apid bees (tribe Euglossini) that includes pollinators of several species of *Calathea* (Kennedy 1978, Barreto and Freitas 2007). The three specimens, labeled “Brasil-SP-São Paulo, Reserva Florestal do IB-USP, Cidade Universitária (M40), 22.XII.2009, C.R. Vilela coll.,” were kindly identified by Dr. Isabel Alves dos Santos and are deposited in Cepann (Coleção Entomológica Paulo Nogueira Neto) at Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Acknowledgments

We are indebted to José Mariano Amabis and Beatriz Goñi for their advice on chromosomes, to Denise S. Sheepmaker for allowing the use of her stereophotomicroscope, to Giovana Vaz for preparing the plates, to Janaina Brito for help with field work, to Beto Campos for taking most of the outdoor pictures, to Eduardo Dupim and Dulci Pereira da Rocha for help with rearing of flies, to Isabel Alves dos Santos for identifying Apidae species, to Augusto dos Santos Rampasso for testing and revising the keys, to Wayne N. Mathis for reviewing the English, and to David B. Taylor and one anonymous referee for corrections and useful suggestions that improved the submitted version. Flies were collected with authorization from IBAMA-SISBIO (number 31434-1). This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and NIH grant GM64590.

References Cited

- Andersson, L. 1998. Marantaceae, pp. 278–293. In K. Kubitzki (ed.), The families and genera of vascular plants, vol. 4. Flowering plants, Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer, Berlin, x + 511 pp.
- Ashburner, M. 1989. *Drosophila: a laboratory manual*. Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, xxiii, p. 434.
- Bächli, G., C. R. Vilela, and V. Ratcov. 2000. Morphological differences among *Drosophila paraguayensis* Duda, 1927 and its close relatives (Diptera, Drosophilidae). Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 73: 67–92.
- Bächli, G., C. R. Vilela, A. S. Escher, and A. Saura. 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomologica Scandinavica, vol. 39. Brill, Leiden, p. 362.
- Bächli, G., C. R. Vilela, and S. F. McEvey. 2005. Nine new species of Afrotropical *Leucophenga* (Diptera, Drosophilidae). Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 78: 23–57.
- Barreto, A. A., and L. Freitas. 2007. Atributos florais de um sistema de polinização especializado: *Calathea cylindrica* (Roscoe) K. Schum. (Marantaceae) e abelhas Euglossini. Rev. Bras. Bot. 30: 421–431.
- Braga, J. M. A. 2005. Marantaceae - Novidades taxonômicas e nomenclaturais III: Tipificações, sinônimos e uma nova combinação em *Calathea*. Acta Bot. Bras. 19: 763–768.
- Breuer, M. E., and R. F. Rocha. 1971. Genitalia masculina de algumas espécies de *Drosophila* dos grupos “repleta” e “tripunctata” (Diptera, Drosophilidae). Pap. Avulsos Zool. 25: 121–137.
- Brncic, D. 1983. Ecology of flower-breeding *Drosophila*, pp. 333–382. In M. Ashburner, H. L. Carson, and J. R. Thompson (eds.), The genetics and biology of *Drosophila*, vol. 3. Academic, London, United Kingdom.
- Burla, H. 1954. Study on the polymorphism in *Zygothrica dispar* and *Z. prodispar*, and description of *Z. laticeps* sp. n. (Drosophilidae), Diptera. Arq. Mus. Paranaense. 10: 231–252.
- Carson, H. L. 1971. The ecology of *Drosophila* breeding sites. Harold L. Lyon Arboretum Lecture. 2: 1–28.
- Cooper, K. W. 1950. Normal spermatogenesis in *Drosophila*, pp. 1–56. In M. Demerec (ed.), Biology of *Drosophila*, John Wiley, New York, NY.
- Cortopassi-Laurino, M., F. R. N. Knoll, and V. L. Imperatriz-Fonseca. 2003. Nicho trófico e abundância de *Bombus*

- morio e *Bombus atratus* em diferentes biomas brasileiros. In G.A.R. Melo and I. Alves-dos-Santos (eds.), *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESC, Criciúma.
- Dobzhansky, T., and C. Pavan. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. Univ. São Paulo, Fac. Filos., Cienc. Let., Bol. 36, Biologia Geral. 04: 7–72.
- Fruta-Pessoa, O. 1952. Flower-feeding drosophilidae. *Drosoph. Inf. Serv.* 26: 101–102.
- Grimaldi, D. A. 1987. Phylogenetics and taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 186: 103–268.
- Groppi, M., and J. R. Pirani. 2005. Levantamento florístico das espécies de ervas, subarbustos, lianas e hemiepipfitas da mata da Reserva da Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”, São Paulo, SP, Brasil. *University São Paulo, Bol. Bot.* 23: 141–233.
- Kaneshiro, K. Y. 1969. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. *Univ. Tex. Publ.* 6918: 55–70.
- Kennedy, H. 1978. Systematics and pollination of the “closed-flowered” species of *Calathea* (Marantaceae). *Univ. Calif. Publ. Bot.* vol. 71. University of California, Berkeley, 90 pp. + 20 plates.
- Lorenzi, H., and H. M. Souza. 2008. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras, 4th ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Malogolowkin, C. 1953. Notas sobre “*Zygothrica dispar*” (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Biol.* 12: 455–457.
- Markow, T. A., and P. O’Grady. 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Func. Ecol.* 1–13. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01457.x>
- Pavan, C., and A. B. da Cunha. 1947. Espécies brasileiras de *Drosophila*. Univ. São Paulo, Fac. Filos., Cienc. Let., Bol. 86, Biol. Geral. 7: 1–47.
- Pimpinelli, S., L. Bonaccorsi, L. Fanti, and M. Gatti. 2000. Preparation and analysis of *Drosophila* mitotic chromosomes, pp. 3–23. In W. Sullivan, M. Ashburner, and R. S. Hawley (eds.), *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Pipkin, S. B. 1964. New flower breeding species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 66: 217–245.
- Rossi, L. 1994. A flora arbóreo-arbustiva da mata da Reserva da Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira” (São Paulo, Brasil). *Univ. São Paulo, Bol. Bot.* 9: 1–105.
- Santos, R.C.O., and C. R. Vilela. 2005. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). IV. Living and fallen flowers of *Sesaea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). *Rev. Bras. Entomol.* 49: 544–551. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262005000400015>
- Spassky, B. 1957. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Univ. Tex. Publ.* 5721: 48–61.
- Sturtevant, A. H. 1921. The North American species of *Drosophila*. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 301: 1–150.
- Sturtevant, A. H., and E. Novitski. 1941. The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* 26: 517–541.
- Throckmorton, L. H. 1962. The Problem of phylogeny in the genus *Drosophila*. *Univ. Tex. Publ.* 6205: 207–343.
- Tosi, D., and M.A.Q.R. Pereira. 1993. Karyotypes and phylogenetic relationships in *Drosophila* species of the *anulimana* group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Genet.* 16: 321–333.
- Val, F. C. 1982. The male genitalia of some Neotropical *Drosophila*: notes and illustrations. *Pap. Avulsos Zool.* 34: 309–347.
- Vilela, C. R. 2001. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). III. Rotting infructescences of *Philodendron bipinnatifidum* (Araceae). *Rev. Bras. Entomol.* 45: 339–344.
- Vilela, C. R., and G. Bächli. 1990. Taxonomic studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.* 63: 1–332.
- Vilela, C. R., and G. Bächli. 2000. Morphological and ecological notes on the two species of *Drosophila* belonging to the subgenus *Siphodora* patterson & mainland, 1944 (Diptera, Drosophilidae). *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.* 73: 23–47.
- Vilela, C. R., and M.A.Q.R. Pereira. 1992. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). *Rev. Bras. Entomol.* 36: 475–482.
- Vilela, C. R., and D. Selivon. 2000. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). II. Fallen fruits of *Citharexylum myrianthum* Cham. (Verbenaceae). *Drosoph. Inf. Serv.* 83: 475–482.
- Wanderley, M.G.L. 1991. Flora fanerogâmica da reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo Brasil): 183- Marantaceae. *Hoehnea* 18: 49–51.
- Wanderley, M.G.L., and S. Vieira. 2002. Nova espécie de *Calathea* G. Mey (Marantaceae) para o Brasil. *Hoehnea* 29: 115–118.
- Wheeler, M. R., and M. P. Kambysellis. 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. *Univ. Tex. Publ.* 6615: 533–565.

Received 17 September 2013; accepted 11 February 2014.

Supp. Key S1. Key to the 11 most abundant *Drosophila* species attracted to inflorescences of *Calathea monophylla* in a forest reserve of western São Paulo city (SP, Brazil).

- 1 Wings conspicuously spotted (Fig. 20); crossveins heavily clouded; prescutellars present; yellow fly (Brazil: São Paulo and Rio de Janeiro) *D. calathea* sp. nov.
- Wings unspotted; crossveins slightly clouded or not; prescutellars present or absent 2
- 2(1) Prescutellars present; small and uniformly yellow flies (Brazil) *D. bromelioides*
- Prescutellars absent 3
- 3(2) Anterior scutellars convergent; yellowish flies; costal index ≤ 2.5 4
- Not entirely as above 5
- 4(3) Brownish yellow thorax; smoky wings; abdominal tergites 2-5 bearing medium-sized posterior brown bands; costal index ca. 2.5; very long vibrissa (ungrouped) *Drosophila* sp. I4
- Yellowish thorax; hyaline wings; abdominal tergites 2-4 bearing tiny posterior brown bands; costal index ca. 2.0 (Brazil) *D. caponei*
- 5(3) Costal index < 3.5 ; small coffee-brown flies 6
- Costal index > 4 ; medium-sized brownish or yellowish flies 7
- 6(5) Abdominal tergites 2-4 bearing interrupted and well delimited posterior brown bands; oviscapt valves distally pointed (*guarani* group) *Drosophila* sp. W3
- Abdominal tergites 2-4 bearing interrupted and poorly delimited posterior brown bands; oviscapt valves distally blunt (*guarani* group) *Drosophila* sp. G4
- 7(5) First genal seta as long as vibrissa 8
- First genal seta ca. half vibrissa length 9
- 8(7) Brownish; thorax with longitudinal dark brown bands; both crossveins heavily clouded (Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, Venezuela) *D. griseolineata*
- Light brown; thorax unicolorous (Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, Uruguay) *D. ornatifrons*
- 9(7) Yellowish thorax; abdominal tergite 6 with a large, shiny, well-outlined, black, median spot (Brazil, Colombia) *D. cuaso*
- Light brown or yellowish thorax; abdominal tergite 6 usually unspotted; if spot present, it is relatively small, dull, light brown, and poorly outlined 10
- 10(9) Uniformly light brown thorax (Brazil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay) *D. paraguayensis*
- Yellowish thorax, scutellum slightly darker than mesonotum (*tripunctata* group) *Drosophila* sp. B3

Supp. Key S2. Key to Drosophilidae species emerged from inflorescences of *Calathea monophylla* in a forest reserve of western São Paulo city (SP, Brazil).

- 1 Hypercephalic flies, much more evident in males; pale yellow body; dark markings on tergites; costal index ca. 2.5 (Fig. 13; Brazil) *Zygothrica dispar*
- Normal-headed flies 2
- 2 Wings conspicuously spotted (Fig. 20); crossveins heavily clouded; prescutellars present; yellow fly (Brazil: São Paulo and Rio de Janeiro) *D. calathea* sp. nov.
- Wings unspotted; prescutellars absent 3
- 3 Anterior scutellars convergent; brownish yellow thorax; smoky wings; abdominal tergites 2 through 5 bearing interrupted posterior brown bands; costal index ca. 2.5; very long vibrissa (ungrouped) *Drosophila* sp. I4
- Not entirely as above 4
- 4 Costal index < 3.5; small coffee-brown flies; abdominal tergites 2 through 4 bearing interrupted and poorly delimited posterior brown bands; oviscapt valves distally blunt (*guarani* group) *Drosophila* sp. G4
- Costal index > 4; medium-sized brownish or yellowish flies 5
- 5 Brownish; first genal seta as long as vibrissa; thorax with longitudinal dark brown bands; both crossveins heavily clouded (Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, Venezuela) *D. griseolineata*
- First genal seta ca. half vibrissa length; smoked wings; yellowish thorax (*tripunctata* group) *Drosophila* sp. B3

4.2. Morfologia da *Drosophila* sp. I4 (em fase de descrição) e filogenia molecular preliminar com as duas novas espécies

No trabalho apresentado no item 4.1 descrevemos a *Drosophila calathea*, a espécie mais abundante entre os drosofilídeos que se criam em inflorescências de *Calathea monophylla* e *C. cylindrica* (família Marantaceae). A espécie codificada como *Drosophila* sp. I4 nas tabelas do manuscrito, que também se cria em inflorescências de *Calathea*, refere-se a outra espécie nova que pretendemos descrever sob o binômio *Drosophila asymmetrica* sp. nov.. Diferentemente de *D. calathea*, a *Drosophila* sp. I4 é pouco conspícua: não possui pintas nas asas, e é uniformemente acinzentada. Sua característica mais marcante é a forma e o tamanho das valvas do oviscapto. Elas são extremamente alongadas, como mostra o esquema da Figura 15. Dez machos e sete fêmeas dessa espécie foram selecionados para compor a série-tipo, cuja morfometria está relacionada no Anexo 7.3. Para a análise filogenética usamos segmentos de sequências de *kl-3* e *kl-5* obtidos para as espécies listadas na Tabela A1 (anexo 7.1). As árvores filogenéticas obtidas estão mostradas na Figura 16. *Drosophila calathea* pertence a uma radiação que engloba os grupos *bromeliae*, *nannoptera* e *caponei*. As semelhanças entre *D. calathea* e o grupo *bromeliae* estão discutidas em Vaz *et al.* (2014; seção 4.1). *Drosophila* sp. I4 se agrupa com o grupo *repleta*, formando um provável grupo de espécies especialistas em inflorescências de *Calathea* (substrato sobre o qual as espécies não identificadas “panama 1” e “panama 2” também foram coletadas).

Figura 15. Válvula esquerda do oviscapto de *Drosophila* sp. I4 (não descrita). Sua forma é particularmente muito alongada.

Figura 16. Filogenia com espécies do gênero *Drosophila* incluindo duas novas espécies: *D. calathea* (descrita em Vaz *et al.*, 2014, seção 4.1) e “*asymmetrica*”* (a ser descrita, codificada como *Drosophila* sp. I4). a) Árvore construída com sequências de 900 pb do gene *kl-3* do cromossomo Y. b) Árvore construída com sequências de 1500 pb do gene *kl-5* do cromossomo Y. O método de inferência foi o de máxima verossimilhança implementado no programa *Mega V*. A consistência das árvores (números nos nós) foi estimada com testes de *bootstrap* (n=1000). “panama1” e “panama2” são espécies não identificadas coletadas no Panamá em substrato semelhante ao usado por *Drosophila* I4 (inflorescências de espécies do gênero *Calathea*). Elas provavelmente pertencem a um grupo monofilético de espécies que se criam em flores.

4.3. “GC content dates gene gains in the *Drosophila* Y chromosome”

(Vaz & Carvalho, artigo em preparação)

(A análise da composição de bases de genes do cromossomo Y das espécies de *Drosophila* com genoma sequenciado, e o teste do conteúdo GC como ferramenta de datação de movimento de genes para o Y, resultaram no trabalho apresentado nesta seção)

GC Content Dates Gene Gains in the *Drosophila* Y Chromosome

Suzana C. Vaz^{1,2} and Antonio B. Carvalho²

¹ Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

² Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author: E-mail: vazsuz@gmail.com

Abstract

Heterochromatic genes are known to have AT-biased nucleotide composition. Half of the Y-linked genes of *Drosophila melanogaster* were acquired from autosomes (or the X) at different moments of *Drosophila* phylogenetic history since the divergence between the *Sophophora* and *Drosophila* subgenera (~63 mya). Thus the *Drosophila* genus represents a natural experiment to observe change in base composition of genes moving from a GC-biased to an AT-biased (non-recombining) environment. We estimate that an originally autosomal gene acquired by the Y chromosome in the *Sophophora* subgenus will have its GC content at synonymous third codon positions (GC3s) changing from ~75% to ~25% in ~60 million years due to a selectively constrained rate of ~0.27 substitutions / 100bp / million years. Frequency of optimal codons (FOP) can decrease ~ 30% after a gene moves to the Y, probably due to mutation in a non-recombining environment, where purifying selection is inefficient.

The proportion of GC relative to AT in DNA content varies between species and along genome compartment in the same species. Two basic evolutionary processes traditionally explain this variation: natural selection and mutation pressure (Mooers & Holmes 2000). Selection affects codon bias increasing translation efficiency and maximizing gene expression levels (Akashi 1994; Powell and Moriyama 1997). In 11 out of 12 *Drosophila* species with whole genome sequences all preferential codon ends in G ou C (*Drosophila* 12 genome consortium, 2007). Mutation affects base composition due to unequal base substitutions: there is a bias for AT relative to GC in *Drosophila* (Powell & Moriyama 1997; Bachtrog 2003; Keightley *et al.* 2009). The effects of selection and mutation on GC content depends on recombination. Purifying selection should be efficient in regions with sufficient recombination and thus no linkage between favorable and deleterious mutations (Hill-Robertson effect; reviewed in Charlesworth & Charlesworth, 2000). In fact, there is less codon bias in regions with less recombination such as the *Drosophila* “dot” chromosome (*F* element) where codon usage reflects mutation bias (Marais *et al.* 2003; Vicario *et al.*, 2007; Arguello *et al.*, 2010). Therefore, in *Drosophila*, we can expect a positive relationship between recombination rate, codon bias, and GC content (Hey & Kliman 2002; Marais *et al.* 2001; 2003), such as found for the human genome (Fullerton *et al.*, 2001; Meunier & Duret, 2004). An alternative ou complementary mechanism besides selection to explain the effect of recombination on GC content is biased gene conversion (BGC; Muyle *et al.* 2011; Marais *et al.* 2003; Meunier and Duret 2004). In BGC, repair of heteroduplex mismatch during recombination results in biased nucleotide substitution increasing G or C relative to A or T in repaired sites. As expected by selection and/or BGC effects, autossomes and X chromosomes have higher GC content than non-recombining heterochromatic Y chromosomes in mammals (Galtier *et al.* 2001). Mutation effects can be significant in human heterochromatic domains which are less acessible to DNA repair machinery (Schuster-Böckler & Lehner, 2012). We can expect heterochromatic regions in *Drosophila* genomes to contain less GC content due to significant biased mutation effect increasing AT but a slight or absent effect of selection or BGC. Genes in either autosomal or Y-chromosome heterochromatic regions of *Drosophila* in fact bear lower GC content (Yasuhara *et al.*, 2005; Díaz-Castillo & Golic 2007; Miskei *et al.* 2011; Campos *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014).

A Time-Scaled Scenario

There are 13 known Y-linked single-copy genes in *Drosophila melanogaster* about half of which was part of the ancestral Y of the *Drosophila* genus while the other half was acquired by this chromosome at different moments of the genus evolutionary history (Fig. 1A; adapted from Koerich *et al.* 2008). Therefore we have a natural time-scaled experiment to test the change in base composition of a gene that moves from a recombining autosomal environment to a non-recombining heterochromatic Y-chromosome. The gene *FDY*, for example, was translocated to the Y chromosome of *D.melanogaster* at most 5.4 mya when *D.melanogaster* and *D.simulans* lineages split (Fig. 1A; Tamura *et al.*, 2004). Genes *kl-2*, *kl-3*, *ORY*, *PRY*, *PprY* and *JYAlpha* are in the ancestral *Drosophila* Y-chromosome which dates to at least 63 mya. Genes *dipep*, *CG2964* and *CG11719* are ancestrally autosomal in *Drosophila* and were acquired by the Y chromosome in lineages of the *Drosophila* subgenus (Fig. 1A). The aim of this work is to compare the GC content of 12 genes located in *D. melanogaster* Y (*kl-2*, *kl-3*, *ORY*, *PRY*, *PprY*, *JYAlpha*, *ARY*, *WDY*, *kl-5*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* and *FDY*) plus 3 genes located in *D. virilis* Y (*dipep*, *CG2964* and *CG11719*) among 9 *Drosophila* species with available sequences.

Evolution of Base Composition and Codon Bias

Besides GC content we used GC3s (GC content of synonymous third codon positions) as a molecular signature. A strong correlation exists between the sequences base composition and their time length on the Y chromosome due to the gradual accumulation of AT-biased mutations on genes acquired by this chromosome (Fig. 1B, 1C). Y-linked genes (except very recent ones) are characterized by having GC3s < global GC (Fig. 2) probably due to mutation bias increasing AT at synonymous sites, while autosomal genes have GC3s > GC due to codon bias. Global GC content of Y-linked genes never reach 43% while that of autosomal genes are always above this boundary (Fig. 2). To verify if the 43% limiar is a reasonable GC content lowerbound of autosomal genes and not an artifact of genes with history in the Y-chromosome, we computed base composition in *Amyrel* sequences of 98 *Drosophila* (and close genera) species obtained by Da Lage *et al.* (2007). For every species GC content is $\geq 43\%$.

Codon bias for both autosomal and Y-linked sequences was measured by FOP (frequency of optimal codons) which was expectedly highly correlated to GC3s ($r=0.583$, $p=0.007$, $n=20$; not shown). Data for *D. willistoni* were not included in the analyses because of its particular outlying

base composition (AT-rich) which suggests a lineage-specific shift in codon usage (Vicario *et al.* 2007; *Drosophila* 12 genome consortium, 2007; Albu *et al.* 2009). The gene *CCY* was not analyzed because of its dubious evolution suggesting the existence of both autosomal and Y-linked copy in the *Drosophila* genus ancestral genome (supplementary Figure 8 in Koerich *et al.* 2008; Vicoso and Bachtrog 2013). We found a higher GC3s content for *Sophophora* subgenus (70.9%, n=17) relative to *Drosophila* subgenus (56.3%, n=13, $p < 0.0001$, Fig. 2) for autosomal sequences (ancestral autosomal genes in *Drosophila* genus, in blue in Fig. 1A) which is in agreement with more codon bias in the *Sophophora* subgenus (*Drosophila* 12 genome consortium, 2007). Reduced overall GC content and low codon bias of *Drosophila* Y-linked genes was also noted recently by Singh *et al.* (2014).

Selectively Constrained Sequence Evolution

At least three *Drosophila* Y-linked single copy genes (*kl-2*, *kl-3* and *kl-5*) are required for male fertility and others are probably essential (Gepner and Hays, 1993; Carvalho *et al.* 2000). When a selectively constrained autosomal gene moves to the Y-chromosome and becomes subjected to mutation bias we should expect a slower sequence evolution than that predicted by neutral substitutions. We estimated that, in average, an autosomal gene acquired by the Y chromosome of a *Sophophora* species will have its GC3s changing from ~75% to ~25% (Fig. 1B; and FOP: ~59% to 26%, not shown) and this will take at least 63 mya (common ancestral of *Drosophila* genus). This gives us an average change of ~8% in GC3s in 10 mya (FOP ~5% in 10 mya) which means 0.8 substitutions / 300bp per mya considering all sites, which equals to ~0.27 substitutions / 100bp / mya. Obbard *et al.* (2012, Table2) estimated third codon position substitution rates in Hawaiian *Drosophila* to be between 0.6 and 1.9 substitutions / 100bp / mya (based on neutral models considering 4-fold degenerate sites). So our estimate for Y-linked gene evolution is compatible with selectively constrained sequences. Another expectation is that sequence evolution is faster when a gene has recently moved (from autosome to the Y or vice-versa) but slows down to saturation after some time. In some species of the *testacea* group *kl-5* has duplicated to an autosome and the Y-copy has been lost (Dyer *et al.* 2010). *D.orientacea* has both functional autosomal and Y-linked copy of this gene and their available 2048bp sequences differ in 9 (all synonymous) sites in the third codon position. Since *D. neotestacea*, *D.testacea* and *D.orientacea* probably diverged within the last million years (Perlman and Jaenike 2003), we

can estimate a rate of ~0.44 substitutions / 100bp / ~1 mya. This value is expectedly lower than neutral evolution lower bound (0.6 in Obbard *et al.* 2012) and higher than our estimate of 0.27 averaged along ~63 mya. Singh *et al.* (2014) analyzed nonsynonymous sites and also found support for a selective constrained evolution of *Drosophila* Y-linked genes.

From Y Back to an Autosome: The *D. pseudoobscura* Case

The Y chromosome genes of *Drosophila* are all autosomal in the *affinis* and *pseudoobscura* subgroups of the *obscura* group due to a Y to autosome fusion in the common ancestral of these subgroups (Fig. 3A; Carvalho and Clark, 2005). *PRY* and *JYAlpha* are autosomal in the *obscura* subgroup also, so it moved out of the Y chromosome a little earlier in the common ancestral of the *obscura* group (Fig. 3). Are these events old enough to have changed GC content in these genes? How much do they differ in base composition from *kl-5*, for example, which is autosomal in the *obscura* group in synteny with *Anopheles gambiae* (*i.e.*, localized in the same region of the 2nd chromosome, implying that *kl-5* autosomal condition dates back to at least 250 mya; Yeates and Wiegmann 2005). We compared GC3s of these “once-in-the-Y” autosomal genes of *D.pseudoobscura* (Fig. 3B), the same way we compared the anteriorly discussed *D. melanogaster* “once-autosomal” Y- linked genes. The 12 tested genes of *D. pseudoobscura* can be classified in three groups: I) “recent autosomal” genes with %GC3s ranging from 23.7 to 35.2 including *kl-2*, *kl-3*, *ORY*, *PPrY* and *ARY* which were translocated from the Y as a block of genes to the *dot* chromosome of *D.pseudoobscura* before the divergence of the *affinis* and *pseudoobscura* subgroups and after the divergence of the *obscura* subgroup (*i.e.*, at most 18 mya, Carvalho and Clark 2005; Larracuente *et al.* 2010); II) “some time in autosome” genes with %GC3s ranging from 58.8 to 61.6 including *PRY* and *JYAlpha* which moved to the X chromosome before the divergence of the *obscura* group (*i.e.*, at least 18 mya), and III) “ancestrally autosomal” genes with %GC3s ranging from 67.3 to 80.5 including *WDY*, *kl-5*, *Pp1Y1* and *Pp1Y2* which are ancestrally autosomal in the *Drosophila* genus (and probably in the family Drosophilidae; Carvalho et al, unpublished). Mean FOP of recent *D. pseudoobscura* autosomal genes (28%, n=5) is about the same as that of *Sophophora* Y-linked genes (26%, n=19). It is worth noting that the low GC3s value for the recently autosomal genes in *D. pseudobscura* could be due to its transposition to the heterochromatic low-recombining dot chromosome where base composition is expected to be AT-biased (Larracuente *et al.*, 2010;

Powell *et al.*, 2011). There are some individual gene movements from Y to autosome (Table 1) that suggest a preference for Y-to-heterochromatin transpositions. *JYAlpha* transposed from the Y to the the dot (fourth) chromosome in the *melanogaster* group ancestral (Carvalho and Clark, 2013) but then moved to the third chromosome in *D. simulans* lineage (Masly *et al.* 2006). Base composition of *JYAlpha* in *D. melanogaster*, *D.yakuba* and *D.simulans* (Table 1) is compatible with sequences evolving mostly in a heterochromatic environment (Y or dot chromosomes). *PRY* transposed from Y to an autosome (or X) in the ancestral of the *repleta* radiation (Koerich *et al.* 2008). Its Y-like base composition (Fig. 1C and Fig. 2) is also compatible with a recent movement or a movement to an heterochromatic environment .

Table 1. Base composition and codon bias of Y-linked genes transposed to an autosome in *Drosophila*. * *JYAlpha* transposed from the Y to the dot (fourth) chromosome in the *melanogaster* group ancestor and moved to the third chromosome in *D.simulans*. Divergence times obtained from Tamura *et al.* (2004).

gene	species	%GC3s	%GC	FOP	autosome	time in myr
<i>JYAlpha</i>	<i>D.melanogaster</i>	23.2	37.4	18.9	4	13-44
<i>JYAlpha</i>	<i>D.yakuba</i>	19.6	35.1	14.1	4	13-44
<i>JYAlpha</i>	<i>D.simulans</i>	25.0	38.3	20.4	4 then 3*	13-44 then < 5.4
<i>PRY</i>	<i>D.mojavensis</i>	30.3	37.8	34.9	?	< 33

The Y Chromosome as a Gene Trap

Genes that are a long time on the Y chromosome of *Drosophila* tend to have low codon bias (FOP: x=27.4%, min=18%, max=39%, n=36) while genes recently acquired by the Y (such as *D.melanogaster FDY* gene with FOP=58.5%) have higher codon bias as a recent vestige of autosomal localization (FOP: x=51.9%, min=34.9%, max=68.7%, n=31, for “old” autosomal genes). The very low values we find for the FOP of “old” Y-chromosome genes suggest that mutation is the driving force in their sequence evolution. But could the excess of AT in *Drosophila* Y-linked genes be a consequence of less codon preference in genes with male-biased expression? At least two studies show that this is not the case. In *Drosophila*, genes that moved

from the Y chromosome to an autosome kept the male-biased expression but their FOP changed significantly (Singh *et al.*, 2014). Hambuch & Parsch (2005) compared FOP values for 7276 *D. melanogaster* genes classified in three classes of expression: with male-biased expression, with female biased expression and without sex-biased expression. FOP mean values varied from 0.51 (male-biased genes) to 0.55 (female-biased genes) showing that male-biased genes have a significant but small difference in codon bias. Thus, if codon bias is a general indication of the efficacy of purifying selection why have genes moved to the mutation biased *Drosophila* Y and not stationed in an autosome recombination-rich region? *Kl-2*, *kl-3* and *kl-5* express long chain dyneins of sperm flagella and thus are indispensable for male fertility. Most of the other *Drosophila* Y-linked genes might be essential for other male function. Male determining genes are expected to evolve in the Y chromosome if they are, for example, deleterious in females (Rice 1984; reviewed in Bachtrog 2013). Perhaps the dynamic nature of *Drosophila* Y genes popping in and out of that chromosome could be a reflect of antagonistic evolutionary forces that make it both advantageous (male-restricted expression) and non advantageous (linkage disequilibrium, mutation bias) to be a gene on the Y chromosome. The Y chromosome can be seen as a genetic trap after a cytogenetic accident: codon biased, well adapted, gene sequences move there and initially benefit from a male-limited transmission specially if they are counter-selected in females. Transition to heterochromatin is consistently associated to gene expansion due to the accumulation of transposable elements, to increased AT content (and thus low codon bias), and to acquisition of heterochromatin-dependent expression (Yasuhara *et al.* 2005). Adaptation to heterochromatin can then become a functional constraint for a transposition back to an euchromatic autosome region. The Y-linked genes of *D. pseudoobscura*, for example, were translocated as a block to the small heterochromatic dot chromosome (Larracuenta *et al.* 2010). Another support for this “Y-as-a-trap” hypothesis comes from the fact that the *Drosophila* Y chromosome is a mutation-biased degenerating chromosome (reviewed in Bachtrog 2013; Singh *et al.* 2014) that seems to be acquiring about 10 times more genes than losing them (Koerich *et al.* 2008; Carvalho and Clark 2013).

Fig. 1. Base composition as a molecular signature of Y-chromosome genes. (A) The *Drosophila* Y chromosome is a mosaic of independently acquired genes or gene clusters at different moment of the genus evolutionary history (adapted from Koerich et al. 2008). (B) *Sophophora* subgenus. (C) *Drosophila* subgenus. GC3s is GC content in the third codon position for synonymous sites. Divergence times obtained from Tamura et al. (2004).

Fig. 2. Base composition of Y-linked (red) and autosomal (blue) genes in *Drosophila*. GC3s is GC content in the third codon position for synonymous sites; GC is sequence global GC content. Data for 70 sequences for species with ancestral autosomal or Y-linked localization of *D.melanogaster* Y-linked genes (genes at the root of tree in Fig. 1A). “d” and “s” are separate coordinates average for autosomal genes in *Drosophila* and *Sophophora* subgenera, respectively.

Fig. 3. Evolution of *D. pseudoobscura* “once-in-the-Y” autosomal genes. (A) Y-to-autosome (or X) movements in the *D. pseudoobscura* lineage. (B) Base composition of recent, ancestral or “some time” autosomal (or X-linked) genes. % GC3s means the proportion of G or C in the third codon position of synonymous sites. Divergence times obtained from Tamura *et al.* (2004).

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); and National Institutes of Health (NIH; grant number GM64590). Flies were collected with authorization from IBAMA/SISBIO (license number 31434-1).

REFERENCES

- Akashi H. 1994. Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. *Genetics* 136: 927-935.
- Akashi H, Kliman R, Eyre-Walker A. 1998. Mutation pressure, natural selection, and the evolution of base composition in *Drosophila*. *Genetica* 102–103: 49–60.
- Albu M, Min XJ, Golding GB, Hickey D. 2009. Nucleotide substitution bias within the genus *Drosophila* affects the pattern of proteome evolution. *Genome Biol Evol.* 1: 288-293.
- Arguello JR, Zhang Y, Kado T, Fan C, Zhao R, Innan H, Wang W, Long M. 2010. Recombination yet inefficient selection along the *Drosophila melanogaster* subgroup's fourth chromosome. *Mol Biol Evol.* 27: 848-861.
- Bachtrog D. 2003. Protein evolution and codon usage bias on the neo-sex chromosomes of *Drosophila miranda*. *Genetics* 165: 1221-1232.
- Bachtrog D. 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews (Genetics)* 14: 113-124.
- Campos JL, Charlesworth B., Haddrill PR. 2012. Molecular evolution in nonrecombining regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol Evol.* 4: 278–288.
- Carvalho AB, Lazzaro BP, Clark AG. 2000. Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13239–13244.
- Carvalho AB, Clark AG. 2005. Y chromosome of *D.pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science* 307: 108–110.
- Charlesworth B, Charlesworth D. 2000. The degeneration of Y chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355, 1563–1572.
- Da Lage JL, Kergoat GJ, Maczkowiak F, Silvain JF. 2007. A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. *J Zool Syst Evol Res.* 45: 47–63.
- Diaz-Castillo C, Golic KG. 2007. Evolution of Gene Sequence in Response to Chromosomal Location. *Genetics* 177: 359-374.
- Drosophila* 12 Genomes Consortium. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203–218.
- Dyer KA, White BE, Bray MJ, Piqué DG, Betancourt AJ. 2010. Molecular evolution of a Y

- chromosome to autosome gene duplication in *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 28: 1293-306.
- Fullerton SM, Carvalho AB, Clark AG. 2001. Local rates of recombination are positively correlated with GC content in the human genome. *Mol Biol Evol.* 18: 1139-1142.
- Galtier N, Piganeau G, Mouchiroud D., and Duret L. 2001. GC-content evolution in mammalian genomes: the biased gene conversion hypothesis. *Genetics* 159: 907-911.
- Gepner J, Hays TS. 1993. A fertility region on the Y-chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11132–11136.
- Hambuch TM , Parsch J. 2005. Patterns of synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster* genes with sex-biased expression. *Genetics* 170: 1691-1700.
- Keightley PD, Trivedi U, Thomson M, Oliver F, Kumar S, Blaxter ML. 2009. Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines. *Genome Res.* 19: 1195-1201.
- Koerich LB, Wang X, Clark AG, Carvalho AB. 2008. Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature* 456: 949–951.
- Larracuente AM, Noor MA, Clark AG. 2010. Translocation of Y-linked genes to the dot chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol Biol Evol.* 27: 1612-20.
- Marais G. 2003. Biased gene conversion: implications for genome and sex evolution. *Trends Genet.* 19: 330-338.
- Marais G, Mouchiroud D, Duret L. 2001. Does recombination improve selection on codon usage? Lessons from nematode and fly complete genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5688-92.
- Marais G, Mouchiroud D, Duret, L. 2003. Neutral effect of recombination on base composition in *Drosophila*. *Genet. Res.* 81: 79–87.
- Matsuda M. 2002. Meiotic chromosome configurations of XY and "XO" type males from four species of the genus *Chymomyza* (Diptera, Drosophilidae) with a description of the karyotype of *C. rufithorax*. *Cytologia* 67: 383-388.
- Meunier J, Duret L. 2004. Recombination drives the evolution of GC-content in the human genome. *Mol Biol Evol.* 21: 984-990.
- Miskei M, Ádám C, Kovács L, Karányi Z., Dombrádi V. 2011. Molecular evolution of phosphoprotein phosphatases in *Drosophila*. *PLoS ONE* 6(7): e22218.
- Mooers AO, Holmes EC. 2000. The evolution of base composition and phylogenetic inference. *Trends in Ecol and Evol.* 15: 365-369.

- Muyle A, Serres-Giardi L, Ressayre A, Escobar J, Glémin S. 2011. GC-biased gene conversion and selection affect GC content in the *Oryza* genus (rice). *Mol Biol Evol.* 28: 2695-706.
- Perlman SJ, Jaenike J. 2003. Infection success in novel hosts: an experimental and phylogenetic study of *Drosophila* parasitic nematodes. *Evolution* 57: 544–557.
- Obbard DJ, MacLennan J, Kim K, Rambaut A, O’Grady PM, Jiggins FM. 2012. Estimating Divergence Dates and Substitution Rates in the *Drosophila* Phylogeny. *Mol Biol Evol.* 29: 3459-3473.
- Powell JR, Moriyama EN. 1997. Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 7784–7790.
- Powell JR, Dion K, Papaceit M, Aguadé M, Vicario S, Garrick R. 2011. Nonrecombining genes in a recombination environment: the *Drosophila* “dot” chromosome. *Mol Biol Evol.* 28: 825-833.
- Rice WR. 1984. Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* 38: 735-742.
- Schuster-Böckler B., Lehner B. 2012. Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. *Nature* 488: 504-7.
- Singh ND, Koerich LB, Carvalho AB, Clark AG. 2014. Positive and purifying selection on the *Drosophila* Y.
- Tamura K, Subramanian S, Kumar S. 2004. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. *Mol Biol Evol.* 21: 36–44.
- Vicario S, Moriyama EN, Powell JR. 2007. Codon usage in twelve species of *Drosophila*. *BMC Evol Biol.* 7: 226.
- Vicoso B, Bachtrog D. 2013. Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature* 499: 332-335.
- Watabe H. 1998. XO Type of sex determination in the genus *Chymomyza* (Diptera: Drosophilidae). *Ent Sci.* 1: 309-311.
- Yasuhara JC, DeCrease CH, Wakimoto BT. 2005. Evolution of heterochromatic genes of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10958-63.
- Yeates DK, Wiegmann BM. 2005. The Evolutionary Biology of Flies. Columbia Univ. Press, NY.

4.4. Localização e composição de bases de genes do cromossomo Y em outros drosofilídeos

A Tabela A2 (anexo 7.1) lista as espécies da família Drosophilidae que estudamos até o momento quanto à composição de bases de genes do cromossomo Y, usando como referência quatro genes do cromossomo Y de *D. melanogaster*: *kl-2*, *kl-3*, *kl-5*, e *WDY* e dois genes do cromossomo Y de *D. virilis*: *JYa* e *CG11719*.

Algumas conclusões relevantes, quanto à composição gênica do cromossomo Y (Tabela 4): I) há muita variação na localização dos genes, entre as espécies, sugerindo que cada gene tem uma história evolutiva particular; II) *kl-2* está no cromossomo Y da maioria das espécies testadas, inclusive em duas das quatro espécies da subfamília Steganinae. Em *Scatella tenuicosta* (família Ephydriidae) ele não está no Y. É possível que *kl-2* esteja no Y ancestral da família Drosophilidae; mais espécies da subfamília Steganinae e de outras famílias próximas a Drosophilidae teriam que ser testadas para confirmar esta hipótese; III) *kl-3* também está no cromossomo Y da maioria das espécies de Drosophilidae, mas é autossômico (ou está no X) nas espécies testadas da subfamília Steganinae. É possível que *kl-3* esteja no Y ancestral da subfamília Drosophilinae. Entretanto, ele pode ser ainda mais antigo no cromossomo Y, pois está neste cromossomo em duas espécies da família Canacidae (alternativamente, a localização no Y de Canacidae pode ser devida a dois eventos independentes de transferência para o Y, um na raiz de Drosophilinae e outro dentro de Canacidae); IV) *kl-5*, que tem duas transferências independentes para o cromossomo Y de *Drosophila* (ver Figura 4), deve ter outro movimento independente para um grupo de espécies do gênero *Scaptodrosophila*. Seria necessário conhecer a filogenia de Drosophilinae para propor hipóteses sobre a evolução de *kl-5*. De qualquer maneira este gene parece ser mais recente no Y de drosofilídeos do que *kl-2* e *kl-3*, pois não está no Y de espécies testadas da subfamília Steganinae, nem de outras famílias (e.g., Ephydriidae); V) o gene *CG11719*, que está presente no cromossomo Y de algumas espécies de *Drosophila* (vide Figura 4), também aparenta ter se movimentado independentemente em outros momentos da história evolutiva de Drosophilidae: ele também está no cromossomo Y de espécies do gênero *Neotanygastrella* e em algumas espécies de *Scaptodrosophila*; VI) o gene *JYa* não está no cromossomo Y de nenhuma espécie de gêneros que não *Drosophila*. Provavelmente este gene está no Y ancestral de *Drosophila* e sua localização ancestral na família é autossômica; VII) o gene *WDY*, que está no cromossomo Y no grupo *melanogaster* (vide Figura 4), também teve pelo menos mais um movimento para o cromossomo Y num grupo de espécies de *Scaptodrosophila*.

Tabela 4. Ligação ao Y e conteúdo GC (em%) na terceira posição de códons sinônimos (GC3s) de 6 genes em Drosophilidae. Vermelho significa localização no Y, azul significa localização autossômica e branco é ausência de informação. *Em *D.pseudoobscura* o cromossomo Y foi translocado para o autossomo 4 (também chamado de elemento Muller F, ou dot).

Espécies	Genes					
	<i>kl-2</i>	<i>kl-3</i>	<i>kl-5</i>	<i>CG11719</i>	<i>JYa</i>	<i>WDY</i>
<i>Drosophila melanogaster</i>	26,4	26,8	34,4	61,7	23,2	38,8
<i>D. busckii</i>	24,0	23,8			16,9	
<i>D. mojavensis</i>	23,2	26,8	24,2	28,7	25,5	57,5
<i>D. pseudoobscura</i> *	21,8	25,6	73,7	69,4	61,1	63,7
<i>D. virilis</i>	28,8	25,8	29,7	36,5	32,8	62,3
<i>D. willistoni</i>	25,0	24,0	46,5	53,9	29,8	38,8
<i>D. grimshawi</i>	27,1	27,7	32,4	55,3	30,2	59,5
<i>Neotanygastrella chymomyzoides</i>	25,7	20,7	31,2		36,1	
<i>Neotanygastrella T58W6</i>	30,1	25,5	31,7		35,8	
<i>Chymomyza amoena</i>	30,0	26,3			47,2	
<i>C. bicoloripes</i>	23,9		38,8		36,4	
<i>C. caudatula</i>	30,0	34,5	44,4		46,9	
<i>C. costata</i>	29,7	26,7	47,4	36,8	43,8	
<i>C. distincta</i>	28,2	26,1	48,7			
<i>C. fuscimana</i>	29,0	26,1	46,4			
<i>C. procnemis</i>	30,0	29,2	41,5		36,1	
<i>Chymomyza</i> sp1	32,4	29,4	48,1		45,0	
<i>Chymomyza</i> T1	29,7	30,6	53,7	38,3	40,8	
<i>Chymomyza</i> T21X1	28,3	31,1	48,2		37,6	
<i>Chymomyza</i> T58W2	31,2	29,8	51,3		47,7	

Tabela 4, continuação.

Espécies	Genes					
	<i>kl-2</i>	<i>kl-3</i>	<i>kl-5</i>	<i>CG11719</i>	<i>JYa</i>	<i>WDY</i>
<i>Scaptodrosophila brunneipennis</i>	27,0	26,8	29,6		41,5	
<i>S. altera</i>	21,7	19,3			32,9	
<i>S. hibisci</i>	19,2		26,4			
<i>S. lativittata</i>	20,3	22,9			75,7	
<i>S. dorsocentralis</i>	20,7	18,3	20,0		46,4	
<i>S. cultello</i>	21,2	19,3				
<i>S. zophera</i>	28,0	21,6	24,5		41,5	
<i>S. coracina</i>	24,9		27,0		43,2	
<i>S. bryani</i>	19,8	17,6	21,0		36,4	
<i>S. latifascieformis</i>	21,8	19,6	20,9	41,8	34,3	
<i>S. rufifrons</i>	27,1	29,8	57,0		56,4	
<i>S. deflexa</i>	27,1	29,8	57,0		57,0	
<i>S. lebanonensis</i>	27,5		56,1		55,0	
<i>S. stonei</i>	27,9	28,2	55,5		55,3	
<i>S. pattersoni</i>	27,5	28,2	56,1		55,1	
<i>S. inornata</i>	38,7		59,1		68,2	
<i>S. fuscithorax</i>	52,2	46,6	54,6			
<i>S. collessi</i>	27,9		53,8		52,4	
<i>S. subtilis</i>	36,9		58,8		75,6	
<i>S. fumida</i>	31,9					
<i>Colocasiomyia alocasiae</i>	23,7	61,0	65,0			
<i>C. xenalocasiae</i>	24,9	67,0	58,2			
<i>Gitona bivisualis</i>	49,6	49,7	44,3			
<i>Phortica tropicalis</i>	27,7	48,2	42,4	39,1		
<i>Rhinoleucophenga brasiliensis</i>	41,9	46,6	39,0			
<i>Amiota basdeni</i>	27,3					
<i>Scatella tenuicosta</i>	44,7	45,9	46,8			
Canacidae T50X3						
Canacidae T50X4						
Ephydriidae T50X1						
Ephydriidae T50F4						
Ephydriidae T50F1						
Sphaeroceridae T50F2						
Sphaeroceridae T5F1						
Chloropidae T53W1						
Sepsidae T5X1						
Otitidae T58W1						
<i>Ceratitis capitata</i>						
<i>Glossina</i> sp.				33,8		

O resultado representado numericamente na Tabela 4 (para cada espécie) é mostrado graficamente na Figura 17 (para *kl-2*, *kl-3* e *kl-5*). A Figura 17 mostra que todas as sequências de genes que não estão no cromossomo Y (isto é, estão presentes em machos e fêmeas) têm conteúdo GC maior ou igual a 43% (pontos em azul). Para verificar se este limiar é artefato de genes com histórico no Y, o gene *Amyrel* foi usado como gene autossômico de referência: para 98 espécies de drosofilídeos o conteúdo GC mínimo foi 43% (Fig. 17). Genes do cromossomo Y (pontos em vermelho) têm conteúdo GC menor que 43%, com exceção de sequências recém-translocadas para outro lugar do genoma: em *D. pseudoobscura*, cujo cromossomo Y translocou-se todo para o cromossomo *dot*, e em espécies de *Chymomyza* que são X0, provavelmente pela mesma razão. O conteúdo GC na terceira posição de códons sinônimos (GC3s) têm mais variação do que o conteúdo GC médio de toda a sequência, e, como previsto, deve servir melhor como uma assinatura molecular de localização genômica dos genes.

Figura 17. Conteúdo GC de 3 genes (*kl-2*, *kl-3* e *kl-5*) em espécies de drosofilídeos. Circulo = conteúdo GC global; “X” = conteúdo GC na terceira posição de códons sinônimos. Cada dupla de pontos (GC e GC3s) no eixo x representa uma das espécies listadas na Tabela 4, aqui ordenadas por GC3s. Vermelho = genes localizados no cromossomo Y; azul = outra localização, e preto = localização desconhecida. Os segmentos de sequência analisados tem entre 850 e 1800 pb. *Amyrel* é gene autossômico e as sequências analisadas de drosofilídeos (~1500 pb, Da Lage *et al.*, 2007) foram obtidas do *Genebank* (não são as mesmas espécies estudadas para *kl-2*, *kl-3* e *kl-5*). A seta verde aponta para o valor GC = 0,43, acima do qual todos os genes são autossômicos. Genes do cromossomo Y tem GC < 0,43. Alguns genes autossômicos aparecem abaixo desse limiar (para *kl-2* e *kl-3*), e correspondem a espécies com recente perda do cromossomo Y (translocação para um autossomo em *D.pseudoobscura* e algumas espécies de *Chymomyza* com machos de cariótipo X0).

4.5. Conteúdo gênico do cromossomo Y em espécies de *Drosophila* e gêneros próximos

No trabalho “*A survey of 400 Drosophila species for individual gene losses and Y-chromosome replacements*” (Dupim *et al.*, em preparação) vamos apresentar o resultado de uma varredura do conteúdo gênico do cromossomo Y em ~400 espécies de *Drosophila* e de gêneros próximos. Minha participação principal nesse trabalho foi coletar e identificar diversas espécies ausentes de centros de manutenção de estoques (“*stock centers*”), verificar a identificação de moscas enviadas por outros pesquisadores, ou oriundas de “*stock centers*” (onde eventualmente ocorre contaminação), e criar algumas espécies por pelo menos uma geração em laboratório. Em especial, coletei e identifiquei diversas espécies de *Drosophila*, *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* sobre fungos e substratos vegetais listados na Tabela 5. Alguns exemplos de identificação a partir da preparação da terminalia estão no anexo 7.4.

Tabela 5. Espécies de drosofilídeos coletadas na mata atlântica (RJ e SP) para estudo do conteúdo gênico do cromossomo Y. Espécies para as quais conseguimos obter ao menos uma geração em laboratório estão marcadas com um asterisco quando a linhagem é multifêmea, e dois asteriscos para linhagens isofêmeas. Quanto às espécies de *Drosophila*, listamos apenas aquelas “incomuns” (ausentes de *Stock Centers*, ou espécies novas como *Drosophila calathea*, que descrevemos em Vaz *et al.*, 2014, seção 4.1 e *Drosophila* sp. I4, a ser descrita sob o binômio “*Drosophila asymmetrica*”). # espécies coletadas em outra região que não mata atlântica.

Espécie	Grupo	Substrato / local de coleta
<i>Drosophila bromelioides</i> ** Sturtevant, 1921	<i>bromeliae</i>	flor de <i>Datura</i> sp. / Nova Friburgo, RJ
<i>Drosophila calathea</i> ** Vaz, Vilela, Krsticevic & Carvalho, 2014	?	inflorescências de <i>Calathea</i> spp. (Marantaceae) / RJ e SP
<i>Drosophila davidgrimaldi</i> Vilela and Bächli, 1990	<i>canalineae</i>	tronco cortado / Ubatumirim, SP
<i>Drosophila coffeata</i> * Williston, 1896	<i>coffeata</i>	tronco cortado / Ubatumirim, SP
<i>Drosophila</i> sp. T58W3	<i>dreyfusi</i>	raiz cortada / Ilha Grande, RJ
<i>Drosophila</i> sp. G4 **	<i>guarani</i>	inflorescências de <i>Calathea cylindrica</i> (Marantaceae) / Rio de Janeiro, RJ
<i>Drosophila</i> sp. T21W2	<i>mesophragmatica</i>	tronco cortado / Petrópolis, RJ
<i>Drosophila morelia</i> Vilela and Bächli, 2004	<i>morelia</i>	inflorescência de <i>Geonoma</i> sp. / Bananal, SP
<i>Drosophila</i> sp. T53W7	<i>morelia</i>	inflorescência de <i>Geonoma</i> sp. / Bananal, SP
<i>Drosophila ellisoni</i> Vilela, 1983	<i>repleta</i>	inflorescência de <i>Heliconia bihai</i> / Ilha Grande, RJ
<i>Drosophila rosinae</i> Vilela, 1983	<i>repleta</i>	inflorescência de <i>Heliconia bihai</i> / Ilha Grande, RJ
<i>Drosophila xanthopallescens</i> # Pipkin, 1964 (<i>Drosophila</i> sp. panama1)	<i>xanthopallescens</i>	inflorescência de <i>Calathea lutea</i> / Cidade do Panamá, Panamá
<i>Drosophila</i> sp. panama2 #	<i>xanthopallescens</i>	inflorescência de <i>Calathea lutea</i> / Cidade do Panamá, Panamá
<i>Drosophila (Siphodora) flexa</i> Loew, 1866	-	inflorescências masculinas de <i>Zea mays</i> (milho; Poaceae) / Vassouras, RJ
<i>Drosophila</i> sp. I4 * (“ <i>Drosophila asymmetrica</i> ” sp. nov.)	?	inflorescência de <i>Heliconia bihai</i> / Rio de Janeiro, RJ
<i>Drosophila</i> sp. T54F3 **	?	fungo ordem Agaricales / Ilha Grande, RJ
<i>Drosophila</i> sp. T58W4	?	emergida de fezes de mamífero / Ilha Grande, RJ

Tabela 5. continuação

Espécie	Grupo	Substrato / local de coleta
<i>Hirtodrosophila morgani</i> ** Mourão, Gallo & Bicudo, 1967	<i>hirticornis</i>	fungo, ordem Auriculariales / Ilha Grande, RJ
<i>Hirtodrosophila subgilva</i> Burla, 1956	<i>hirticornis</i>	<i>idem</i>
<i>Hirtodrosophila</i> sp. msp5	<i>hirticornis</i>	fungo, ordem Auriculariales / Ilha Grande, RJ
<i>Hirtodrosophila</i> sp. T17W1B	<i>hirticornis</i>	fungo / Ubatumirim, SP
<i>Hirtodrosophila</i> sp. T21W1A	<i>hirticornis</i>	fungo, ordem Auriculariales / Petrópolis, RJ
<i>Hirtodrosophila thoracis</i> ** Williston, 1896	<i>thoracis</i>	fungo, ordem Aphyllophorales / Ilha Grande, RJ
<i>Hirtodrosophila</i> sp. T60W1	<i>thoracis</i>	fungo / Ilha Grande, RJ
<i>Hirtodrosophila ramulosa</i> Burla, 1956	-	fungo, ordem Auriculariales / Ilha Grande, RJ
<i>Hirtodrosophila subflavohalterata</i> Burla, 1956	-	fungo / Ilha Grande, RJ
<i>Mycodrosophila projectans</i> Sturtevant, 1916	-	fungo, ordem Aphyllophorales / Ilha Grande, RJ
<i>Zygothrica atriangula</i> ** Duda, 1927	<i>atriangula</i>	fungo, ordem Auriculariales / Ilha Grande, RJ
<i>Zygothrica poeyi</i> Sturtevant, 1921	<i>atriangula</i>	fungo, ordem Agaricales / Ilha Grande, RJ
<i>Zygothrica microeristes</i> Grimaldi, 1987	<i>dispar</i>	<i>idem</i>
<i>Zygothrica nigropleura</i> Grimaldi, 1987	<i>dispar</i>	<i>idem</i>
<i>Zygothrica</i> sp. T17W1C	<i>dispar</i>	<i>idem</i>
<i>Zygothrica orbitalis</i> Burla, 1956	<i>orbitalis</i>	fungo, ordem Aphyllophorales / Ilha Grande, RJ
<i>Zygothrica vitticlara</i> Burla, 1956	<i>vittimaculosa</i>	fungo, ordem Cantharellales / Muriqui, RJ
<i>Zygothrica vittinubila</i> Burla, 1956	<i>vittimaculosa</i>	<i>idem</i>
<i>Zygothrica sectipoeyi</i> Burla, 1956	<i>vittimaculosa</i>	fungo / Rio de Janeiro, RJ
<i>Zygothrica pallidipoeyi</i> Burla, 1956	-	fungo Agaricales / Muriqui, RJ

5. Conclusões, Discussão Geral & Perspectivas

Sítios de desenvolvimento, espécies novas e criação em laboratório. Durante a execução do presente projeto, coletamos e identificamos várias espécies de drosofilídeos com o intuito de analisar o conteúdo gênico do cromossomo Y. Duas dessas espécies são *Drosophila calatheae* (que descrevemos no artigo da seção 4.1), e *Drosophila* sp. I4 a ser descrita futuramente sob o binômio “*Drosophila asymmetrica*”. Essas duas espécies tem como sítio de desenvolvimento larval inflorescências do gênero *Calathea*. Esta descoberta sugere que existe uma considerável diversidade de espécies não descritas de *Drosophila* associadas a substratos pouco estudados da mata atlântica, como fungos e flores e outros substratos vegetais. Outra conclusão relevante é que embora a manutenção em laboratório de espécies associadas a flor ou fungo não seja trivial, pudemos estabelecer culturas com algumas espécies, como, p.e., *D. calatheae* que foi criada por mais de cinco anos em meio a base de flor após uma série de ajustes na receita (descrito em Vaz *et al.*, 2014). Isso permitiu a obtenção de larvas para a análise de cromossomos mitóticos e politênicos apresentados junto à descrição da espécie no artigo citado. Porém, não tivemos o mesmo sucesso com a maioria das espécies coletadas. Com exceção de *Hirtodrosophila thoracis* que foi criada por algumas gerações e cujas larvas serviram para a observação de cromossomos mitóticos (e confirmação do cariótipo X0 de machos), espécies de *Hirtodrosophila* e *Zygothrica* são normalmente muito sensíveis à variação de temperatura (morrendo durante o transporte para o laboratório) e à anestesia por éter (por vezes não despertando mais, após observação ao estereomicroscópio). Além disso, quando houve sucesso na oviposição e emergência em laboratório, as moscas jovens raramente sobrevivem por muitos dias (provavelmente porque o meio de cultura não as nutre suficientemente), e assim não se obtém uma segunda geração de imagos. Moscas jovens podem ser usadas para extração de DNA mas normalmente não são úteis para a preparação da terminália porque esta não está suficientemente esclerotinizada. Este foi o caso com algumas espécies do grupo *hirticornis* do gênero *Hirtodrosophila* que não conseguimos identificar (Tabela 5).

Conteúdo gênico do cromossomo Y. Os resultados a serem apresentados no artigo “*A survey of 400 Drosophila species for individual gene losses and Y-chromosome replacements*” (Dupim *et al.*, em preparação) confirmam a natureza dinâmica de aquisição e perdas de genes do cromossomo Y em espécies de *Drosophila* e gêneros próximos sugerida por Koerich *et al.* (2008). Porém, em apenas poucos casos ocorre um movimento de todo o cromossomo (por exemplo, fusão do Y a um autossomo, como o provavelmente ocorrido em *D. pseudoobscura*). Encontramos dois eventos de incorporação do cromossomo Y ao genoma autossômico. O primeiro representa o caso de algumas espécies de *Hirtodrosophila* cujo cariótipo se tornou X0/XX. Cinco das sete espécies do gênero *Hirtodrosophila* com estudos citológicos são X0 (Clayton, 1998) o que sugere ser esta a condição ancestral do gênero. Porém este grupo carece de uma revisão taxonômica e filogenética. Infelizmente não conseguimos verificar o cariótipo de outras espécies de *Hirtodrosophila* além de *H. thoracis* por causa das dificuldades discutidas na seção anterior. O segundo evento de movimento

de todo o cromossomo Y afeta as espécies de *Drosophila* do subgrupo *montium* do grupo *melanogaster*: o Y ancestral sobrevive como um Y livre, assim como o Y incorporado no genoma autossômico e, na maioria das espécies, a maior parte dos genes do Y livre foram perdidos. Este caso pareceu bem similar ao observado antes em *D. pseudoobscura* e, de fato, uma reinvestigação com espécies próximas revelou um fenômeno equivalente. Portanto houve ao menos três casos de incorporação do Y na família Drosophilidae, um resultando em cariótipos X0/XX (*Hirtodrosophila*), e dois resultando em cariótipos XY/XX, sendo o Y um cromossomo praticamente sem genes (nas linhagens de *montium* e *pseudoobscura*). Se isto estiver correto, o Y de *D. pseudoobscura* não é um novo construto como sugerido por Carvalho & Clark (2005) mas sim um Y ancestral de *Drosophila*, “esgotado” de genes.

Filogenia molecular. *Drosophila calathea* e *Drosophila* sp. I4 possuem características morfológicas particulares e não puderam ser incluídas em nenhum dos grupos de espécies conhecidos. Uma filogenia preliminar com dois genes do Y (*kl-3* and *kl-5*; figura 16) sugere que elas pertençam à radiação *virilis-repleta* e *D. calathea* tem relações (morfológicas e moleculares) com o grupo *bromeliae*. A observação da terminália masculina de “*panama I*” sugere que ela pertença à espécie *D. xanthopallescens* ou a um táxon muito próximo.

D. xanthopallescens pertence ao grupo *xanthopallescens* definido por Pipkin (1964) para algumas espécies amarelo-pálidas que também se criam em inflorescência do gênero *Calathea* ou *Heliconia*. Se esta filogenia estiver correta, *D. calathea* não pertence ao grupo *xanthopallescens*. Aparentemente também não pode ser incluída no grupo *bromeliae*.

O estudo filogenético, porém, precisa ser completado. É necessário I) obter as sequências de espécies que não constam numa filogenia ou na outra (Figura 16 a e b); II) analisar a árvore filogenética com os dois genes concatenados; III) escolher outro marcador não ligado ao cromossomo Y (*i.e.*, autossômico ou mitocondrial).

Conteúdo GC como assinatura molecular. A análise do conteúdo GC de genes no cromossomo Y sugere que este conteúdo pode servir como ferramenta no estudo da evolução deste cromossomo. Genes no Y são enriquecidos em AT em relação a genes autossômicos, e esta diferença na composição de bases é proporcional ao tempo que um gene está presente no Y (Fig. 1 do artigo da seção 4.3). Ou seja, o conteúdo GC pode servir como ferramenta de datação de movimentos de genes. Em espécies que adquiriram a determinação sexual X0/XX recentemente, como algumas do gênero *Chymomyza* (Watabe & Shimba, 1991; Clayton, 1998; Watabe, 1998; Matsuda, 2002), o conteúdo GC de genes do ex-cromossomo Y, que agora faz parte do conjunto autossômico, ainda é um conteúdo de gene no Y (pontos em “O” azul abaixo do limiar 43% na Figura 17). Para espécies que não se criam em laboratório e, portanto, não têm sua configuração cromossômica conhecida (como os grupos discutidos a seguir), o conteúdo GC pode ser útil como assinatura “molecular”: se machos e fêmeas de uma espécie possuem o gene *kl-3*, por exemplo, e a sequência deste tem baixo conteúdo CG, isso pode significar que ele esteve no Y e agora é autossômico. O sentido inverso, ganho de genes, é evento importante na evolução do cromossomo Y de *Drosophila* e o conteúdo GC

pode ajudar a datar esses movimentos. Por exemplo, *kl-3* tem conteúdo GC = 18,3% em *Scaptodrosophila dorsocentralis* e 29,8% em *S. deflexa* (Tabela 4). É possível que a aquisição de *kl-3* pelo Y de *S. dorsocentralis* seja independente e mais antiga que a aquisição em *S. deflexa*. Infelizmente pouco se conhece sobre a filogenia desses grupos externos a *Drosophila*, o que dificulta conclusões referentes à evolução do cromossomo Y.

6. Referências Bibliográficas

- Akashi, H., Kliman, R. & Eyre-Walker, A. 1998. Mutation pressure, natural selection, and the evolution of base composition in *Drosophila*. **Genetica** **102–103**: 49–60.
- Bächli, G.; C. R. Vilela; S. A. Escher & A. Saura. 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. **Fauna Entomologica Scandinavica**, v. 39. Leiden, Brill, 362p.
- Bachtrog, D. 2003. Protein evolution and codon usage bias on the neo-sex chromosomes of *Drosophila miranda*. **Genetics** **165**: 1221-1232.
- Bachtrog, D. & Charlesworth, B. 2002. Reduced adaptation of a non-recombining neo-Y chromosome. **Nature** **416**: 323-326.
- Brake, I. & G. Bächli. 2008. **Drosophilidae (Diptera)**. In: **World catalogue of Insects**. Volume 9. Apollo Books, Stenstrup, 412 pp.
- Bridges, C. B. 1916. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. **Genetics** **1**: 1–52.
- Brncic, D. J. 1983. Ecology of flower-breeding *Drosophila*, pg 333-377. In: M. Ashburner; H.L. Carson & J.N. Thompson, J.R. (Eds). **Genetics and Biology of Drosophila**, v. 3d, London, Academic Press, xxxiv+382 p.
- Brosseau, G.E. 1960 Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **45**: 257–274
- Bull, J.J., 1983. **Evolution of Sex Determining Mechanisms**. Benjamin/Cummings Pub. Co., Advanced Book Program.
- Burla, H. 1956. Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre Beziehung zur *Drosophila*-Untergattung *Hirtodrosophila*. **Mitt. zool. Mus. Berl.** **32**: 189-321.
- Camacho, J.P.M., T.F. Sharbel & L.W. Beukeboom. 2000. B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** **355**: 1394163-178
- Campos, J.L., B. Charlesworth & P.R. Haddrill. 2012. Molecular evolution in nonrecombining regions of the *Drosophila melanogaster* genome. **Genome Biol. Evol.** **4**: 278–288.
- Carvalho, A.B. 2002. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **12**: 664-668.
- Carvalho, A. B., B. A. Dobo, M. D. Vibrationovski & A. G. Clark, 2001. Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **98**: 13225–13230.
- Carvalho, A. B., B. P. Lazzaro & A. G. Clark, 2000. Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **97**: 13239–13244.
- Carvalho, A. B., M. D. Vibrationovski, J.W. Carlson, S. E. Celniker, R. A. Hoskins *et al.*, 2003. Y chromosome and other heterochromatic sequences of the *Drosophila melanogaster* genome: How far can we go? **Genetica** **117**: 227–237.
- Carvalho, A. B. & Clark A. G. 2003. Birth of a new gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. Abstracts of the 44th Annual *Drosophila* Research Conference, Chicago.

- Carvalho, A.B. & Clark, A.G. 2005. Y chromosome of *D.pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. **Science** **307**: 108–110.
- Carvalho, A.B. & Clark, A.G. 2013. Efficient identification of Y-chromosome sequences in the human and *Drosophila* genomes. **Genome Res.** **23**: 1894-1907
- Carvalho, A.B., Koerich, L.B. & A.G. Clark. 2009. Origin and evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. **Trends in Genetics** **25**: 270-277.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D., 2000. The degeneration of Y chromosomes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** **355**, 1563–1572.
- Clayton, F.E. 1998. Published karyotypes of the Drosophilidae. **Dros. Inf. Ser.** **81**: 5-125.
- Cohen, P. 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. **Trends Biochem. Sci.** **22**: 245–251.
- Da Lage, J.L., Kergoat, G.J, Maczkowiak, F., Silvain, J.F. *et al.* 2007. A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. **J. Zool. Syst. Evol. Res.** **45**: 47–63.
- DeSalle, R. & D. Grimaldi. 1991. Morphological and molecular systematics of the Drosophilidae. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, **22**: 447–475.
- Diaz-Castillo, C. & Golic, K.G. 2007. Evolution of Gene Sequence in Response to Chromosomal Location. **Genetics** **177**: 359-374.
- Dieffenbach, C. W. & Dveksler, G. S. 2003. *PCR Primer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 520 p.
- Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007 Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. **Nature** **450**: 203–218.
- Duda, O. 1927. Die sudamerikanischen Drosophiliden (Dipteren) unter Berücksichtigung auch der anderen neotropischen sowie der nearktischen Arten. **Arch. Naturgesch.** **91(A)11/12**: 1-228.
- Dupim, E.G. 2012. Evolução dos cromossomos Y: Estudo da ligação de genes ao cromossomo Y em 300 espécies de *Drosophila*. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Biologia/Genética.
- Dyer, K. A., B.E. White, M.J. Bray, D.G. Piqué & A.J. Betancourt. 2010. Molecular evolution of a Y chromosome to autosome gene duplication in *Drosophila*. **Mol Biol Evol** **28**: 1293-306.
- Fisher, R. A. 1931. The evolution of dominance. **Biological Reviews** **6**.
- Fullerton, S.M., Carvalho, A.B. & Clark, A.G. 2001. Local rates of recombination are positively correlated with GC content in the human genome. **Mol. Biol. Evol.** **18**: 39-42.
- Galtier, N., G. Piganeau, D. Mouchiroud & L. Duret. 2001. GC-content evolution in mammalian genomes: the biased gene conversion hypothesis. **Genetics** **159**: 907-911.
- Gepner, J., & T. S. Hays, 1993 A fertility region on the Y-chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**: 11132–11136.
- Goldstein, L. B., Hardy W & Lindsley, D.L. 1982 Structural genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**: 7405–7409.

- Graves, J.A.M & Shetty, S. 2001. Sex from w to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **J. Exp. Zool.** **290**: 449-462.
- Grimaldi, D.A. 1987. Phylogenetics and Taxonomy of *Zygothrica* (Diptera, Drosophilidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** **186**: 103-268.
- Grimaldi, D.A. 1990. A phylogenetic, revised classification of the genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** **197**: 1-139.
- Hackstein, J.H., Hochstenbach R., Hauschteck-Jungen, E. & Beukeboom, L.W. 1996. Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? **Bioessays** **18**: 317–323.
- Hardy, R.W., K.T. Tokuyasu & D.L. Lindsley, 1981. Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes. **Chromosoma** **83**: 593–617.
- Kaiser, V. & Bachtrog, D. 2010. Evolution of sex chromosomes in insects. **Ann. Rev. Genet.** **44**: 91-112.
- Keightley, P.D. *et al.* 2009. Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines. **Genome Research** **19**: 1195-1201.
- Kennison, J.A., 1981. The genetic and cytological organization of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **98**: 529–548.
- Koerich, L.B., Wang, X, Clark, A.G. & Carvalho, A.B. 2008. Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. **Nature** **456**: 949–951.
- Lahn, B.T. & Page, D.C. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. **Science** **278**: 675–680.
- Larracuente, A. M., Noor, M. A. & Clark, A. G. 2010. Translocation of Y-linked genes to the dot chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. **Mol Biol Evol** **27**: 1612-20.
- Loew, H. 1866. Diptera Americae septentrionalis indigena. Centuria sexta. **Berl. ent. Z.** **9**: 127-186.
- Marais, G. 2003. Biased gene conversion: implications for genome and sex evolution. **Trends Genet.** **19**: 330-338.
- Marais, G., Mouchiroud D. & Duret, L. 2001. Does recombination improve selection on codon usage? Lessons from nematode and fly complete genomes. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** **98**: 5688-92.
- Marais, G., Mouchiroud D. & Duret, L. 2003. Neutral effect of recombination on base composition in *Drosophila*. **Genet. Res.** **81**: 79–87.
- Markow, T. & O’Grady, P.M. 2006. ***Drosophila: A Guide to Species Identification and Use.*** Academic Press, London.
- Matsuda, M. 2002. Meiotic chromosome configurations of XY and “XO” type males from four species of the genus *Chymomyza* (Diptera, Drosophilidae) with a description of the karyotype of *C. rufithorax*. **Cytologia** **67**: 383-388.
- Matsunaga, S. 2006. Sex chromosome-linked genes in plants. **Genes Genet. Syst.** **81**: 219-226.
- Meunier J. & Duret, L. 2004. Recombination drives the evolution of GC-content in the human genome. **Mol. Biol. Evol.** **21**: 984-990.
- Mitchison, T.J. & Mitchison, H.M. 2010. Cell biology: How cilia beat. **Nature** **463**: 308-309.
- Mooers, A.O. & Holmes, E.C. 2000. The evolution of base composition and phylogenetic inference. **Trends in Ecol. and Evol.** **15**: 365-369.

- Mourão, C.A., Gallo, A.J., & de Campos Bicudo, H.E.M. 1967. *Drosophila morgani*, nova espécie brasileira (Drosophilidae, Diptera). **Pap. Avul. Dep. Zool. Sec. Agric. 20**: 159-164.
- Muyle *et al.* 2011. GC-biased gene conversion and selection affect GC content in the *Oryza* genus (rice). **Mol. Biol. Evol.** **28**: 2695-706.
- Nichols, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. **Trends Ecol. Evol.** **16**: 358-364.
- Nokkala, S., Kuznetsova, V.V. & Maryanska-Nadachowska. 2000. Achiasmate segregation of a B chromosome from the X chromosome in two species of psyllids (Psylloidea, Homoptera). **Genetica 108**: 181-189.
- Nokkala, S. *et al.* 2003. The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). **Genetica 119**: 327-332.
- Obbard, D.J. *et al.* 2012. Estimating divergence dates and substitution rates in the *Drosophila* phylogeny. **Mol. Biol. Evol.** **29**: 3459-73.
- Pipkin, S.B. 1964. New flower breeding species of *Drosophila*. **Proc. Ent. Soc. Wash.** **66**: 217-245.
- Powell J.R., & Moriyama E.N. 1997. Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **94**: 7784-7790.
- Prigent, S.R. 2008. Comments on the proposed conservation of usage of *Drosophila* Fallén, 1823 (Insecta, Diptera). **Bull. of Zool. Nomen.** **65**: 137-150.
- Ratcov, V. 2002. Drosophilideos (Diptera) na reserva ecológica da CUASO, São Paulo, SP, atraídos por isca de banana em fermentação. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Biologia/Genética.
- Reiss, T.A, A.M. Maer, E. Koundakjian, A. Polyanovsky *et al.* 2004. Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. **Cell 117**: 527-539.
- Remsen, J., & O'Grady, P. 2002. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. **Mol. Phyloge. and Evol.** **24**: 249-264.
- Rice, W.R. (1996) Evolution of the Y sex chromosome in animals. **Bioscience 46**: 331-343.
- Roldan, E.R. & Gomendio, M. 1999. The Y chromosome as a battle ground for sexual selection. **Trends in Ecology and Evolution 14**: 58-62.
- Ross, M.T. *et al.* 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature 434**: 325-337.
- Russo, C. A. M., Takezaki, N. & Nei, M. 1995. Molecular Phylogeny and Divergence Times of Drosophilid Species. **Molecular Biology and Evolution 12**: 391-404.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.2.
- Santos, R.O. & Vilela, C.R. 2005. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera): IV. living and fallen flowers of *Sessea brasiliensis* and *Cestrum* spp. (Solanaceae). **Rev. Bras. Entomol. [online]. 49**: 544-551.
- Schuster-Böckler, B. & Lehner, B. 2012. Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. **Nature 488**: 504-7.
- Skaletsky, H. *et al.*, 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature 423**: 825-837.

- Stern, C. 1929. Untersuchungen über Aberrationen des Y Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. **Z. Indukt. Abstamm. Vererbungs** **51**: 253-353.
- Sturtevant, A.H. 1916. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. **Ann. ent. Soc. Am.** **9**: 323-343.
- Sturtevant, A.H. 1921. The North American species of *Drosophila*. **Publs Carnegie Instn** **301**:1-150.
- Sullivan, W., Hawley, R.S. & Ashburner M. (Editors). 2000. ***Drosophila* Protocols**. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. xiv + 697.
- Tamura, K., Subramanian, S. & Kumar, S. 2004. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. **Mol. Biol. Evol.** **21**: 36–44.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher G., Nei, M., & Kumar, S. 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.** **10**: 2731-9.
- Throckmorton, L.H., 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King, R.C. (Ed.), **Handbook of Genetics**, v.3. Plenum Press, New York, pp.421-469.
- Val, F.C. 1982. The male genitalia of some Neotropical *Drosophila*: Notes and illustrations. **Pap. Avul. Dep. Zool. Sec. Agric.** **34**: 309-347.
- Van der Linde, K., Bächli, G., Toda, M.J., Zhang, W., Katoh, T., Hu, Y., Spicer, G.S. 2007. *Drosophila* Fallén, 1823 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage. **Bull. of Zool. Nomen.** **64**: 238-242.
- Van der Linde, K., *et al.* 2010. A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. **Genetics Research** **92**: 25-38.
- Vaz, S.C., Vilela, C.R., Krsticevic, F.J. & Carvalho, A.B. 2014. Developmental sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). V. Inflorescences of *Calathea monophylla* and *C. cylindrica* (Zingiberales: Marantaceae). **Annals of the Entomol. Soc. of America.** **107**: 607-620.
- Vibranovski, M.D., Koerich, L.B. & Carvalho, A.B. 2008. Two new Y-linked genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **179**: 2325–2327.
- Vilela C.R. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). **Rev Bras Entomol** **27**: 1-114.
- Vilela, C.R. & Bächli, G. 1990. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). **Mitt. schweiz. ent. Ges.** **63(Suppl.)**: 1-332.
- Vilela, C.R. & Bächli, G. 2000. Morphological and ecological notes on the two species of *Drosophila* belonging to the subgenus *Siphlodora* Patterson & Mainland, 1944 (Diptera, Drosophilidae). **Bull. Soc. Entom. Suisse** **73**: 23-47.
- Vilela, C.R. & Bächli, G. 2004. On the identities of nine Neotropical species of *Hirtodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Bull. Soc. Entom. Suisse** **77**: 161-195.
- Voelker, R. A. e Kojima, K., -I. Fertility and Fitness of XO Males in *Drosophila* I. Qualitative Study. **Evolution** **25**: 119-128. 1971.
- Wang W, Thornton K, Berry A, Long M, 2002. Nucleotide variation along the *Drosophila melanogaster* fourth chromosome. **Science** **295**: 134–137.

- Watabe, H. & Shimba, F. 1991. A Chromosomal Study on the Genus *Chymomyza* (Diptera: Drosophilidae) from Northern Japan. *Zoological Science* 8: 973-974.
- Watabe, H. 1998. XO Type of sex determination in the genus *Chymomyza* (Diptera: Drosophilidae). **Ent. Sci.** 1: 309-311.
- Williston, S.W. 1896. On the Diptera of St. Vincent (West Indies). **Trans. Ent. Soc. Lond.**: 253-446.
- Yasuhara, J.C., DeCrease, C.H. & Wakimoto, B.T. 2005. Evolution of heterochromatic genes of *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 102: 10958-63.
- Zurovcova, M. & W.F. Eanes, 1999. Lack of nucleotide polymorphism in the Y-linked sperm flagellar dynein gene *Dhc-Yh3* of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **Genetics** 153: 1709–1715

7. Anexos

7.1. Lista de espécies usadas para sequenciamento	94
7.2. Exemplo de sequenciamento e alinhamento	98
7.3. Morfometria (dados brutos) de <i>Drosophila</i> sp. I4 (em fase de descrição)	104
7.4. Exemplos de preparação de terminália masculina para identificação de espécie	116

Anexo 7.1. Lista de espécies usadas para sequenciamento

Tabela A1: Lista de espécies estudadas para as filogenias da figura 16: informações sobre procedência (incluindo coleta na natureza), quantidade de indivíduos usados na extração de *DNA* (origem do *DNA*) para teste de ligação ao Y, e sequências obtidas e a se obter (de *kl-5* e *kl-3*) para análise filogenética. *stock center* = *Tucson Stock Center* ou *San Diego Stock Center*; m = tórax de macho, f = tórax de fêmea, *DNA* extraído separadamente; “00”, “01”, S e G = códigos das sequências que obtemos do macho e/ou fêmea; *gb* = sequência obtida no *GenBank* (NCBI); *kl-5* = sequência de ~1500pb do gene *kl-5*; *kl-3* = sequência de ~900pb do gene *kl-3* (detalhes no texto).

Espécie	Grupo / subgrupo	Procedência	Origem do DNA	<i>kl-5</i>	<i>kl-3</i>
Gênero <i>Drosophila</i> , subgênero <i>Drosophila</i>					
<i>limensis</i>	<i>repleta</i> / <i>repleta</i>	<i>stock center</i>	15m / 20f	G10	00
<i>mercatorum</i>	<i>repleta</i> / <i>mercatorum</i>	“		-	S176
<i>wheeleri</i>	<i>repleta</i> / <i>mulleri</i>	<i>stock center</i> , linhagem genômica	1m / 1f	G3	01
<i>buzzatii</i>	“	<i>stock center</i>	3m / 6f	S68	S171
<i>meridiana</i>	“	“	3m / 4f	S71	S172
<i>mojavensis</i>	“	“		-	<i>gb</i>
<i>anceps</i>	“	“		-	S175
<i>eremophila</i>	<i>repleta</i> / <i>eremophila</i>	“	3m / 4f	S69	S173
“ <i>asymmetrica</i> ”*	não determinado	flores de <i>Calathea</i> e <i>Heliconia</i> , São Paulo e Rio de Janeiro	1m / 1f	S62	S36
“ <i>panama1</i> ”	“	Flores de <i>Calathea</i> , Panamá	1m / 1f	S64	S48
“ <i>panama2</i> ”	“	“	1m / 1f	S65	-
<i>hydei</i>	<i>repleta</i> / <i>hydei</i>	“	1m / 2f	<i>gb</i>	<i>gb</i>
<i>ellisoni</i>	<i>repleta</i> / <i>fasciola</i>	“	2m / 4f	S67	S174
<i>gaucha</i>	<i>mesophragmatica</i>	“	2m / 4f	S72	S44
<i>pavani</i>	“	“	2m / 4f	S66	S179
<i>dreyfusi</i>	<i>dreyfusi</i>	L.B Klaczko, São Paulo	2m / 4f	S59	S43
<i>aracataca</i>	<i>annulimana</i>	<i>stock center</i>	1m / 2f	S58	S39
<i>annulimana</i>	“	“			S180
<i>calathea</i> “SP”	desconhecido	flores de <i>Calathea monophylla</i> , São Paulo, SP	2m / 3f	S57	S6
<i>calathea</i> “RJ”	“	flores de <i>Calathea cylindrica</i> , Rio de Janeiro, RJ	2m / 2f	G13	S5
<i>nannoptera</i>	<i>nannoptera</i>	<i>stock center</i>	2m / 4f	S60	S181
<i>wassermani</i>	“	“		-	S183
<i>acanthoptera</i>	“	“		-	S187
<i>bromelioides</i>	<i>bromeliae</i>	flor de abóbora, Ilha Grande, RJ, linhagem isofêmea em laboratório	2m / 3f	S54	S34 e S35
<i>bromeliae</i>	“	<i>stock center</i>	3m / 6f	S16	S41
<i>caponei</i>	não determinado	C.R. Vilela (São Paulo)	2m / 3f	S12	S42
<i>canalineae</i>	<i>canalineae</i>	<i>stock center</i>	2m / 4f	S19	S185
<i>incompta</i>	<i>flavopilosa</i>	A. Ludwig (Rio Grande do Sul)	2m / 3f	S17	S186
<i>virilis</i>	<i>virilis</i>	<i>stock center</i> , linhagem genômica	20m / 30f	<i>gb</i>	<i>gb</i>
<i>carbonaria</i>	<i>carbonaria</i>	<i>stock center</i>		G9	S178
<i>melanica</i>	<i>melanica</i>	<i>stock center</i>		S73	S177

Tabela A1. Continuação.

Espécie	Grupo / subgrupo	Procedência	Origem do DNA	kl-5	kl-3
Clados <i>Zygothrica</i> e <i>Hirtodrosophila</i>					
<i>Z. atriangula</i>		fungo, Ilha Grande, RJ	1m / 2f	S74	-
<i>H. confusa</i>		M.L. Cariou & J. R. David (França)	2m / 4f	S75	-
<i>H. ramulosa</i>		fungo, Ilha Grande, RJ	1m / 1f	-	S189
<i>H. subgilva</i>		fungo, Ilha Grande, RJ	1m / 1f	-	S80
Clado <i>immigrans-tripunctata</i>					
<i>D. tripunctata</i>		<i>stock center</i>	2m / 4f	<i>gb</i>	-
<i>D. putrida</i>		“	2m / 4f	“	-
<i>D. testacea</i>		M.L. Cariou & J. R. David (França)	2m / 4f	“	-
Subgênero <i>Sophophora</i>					
<i>D. melanogaster</i>	<i>melanogaster</i>	<i>stock center</i>	30m / 40f	<i>gb</i>	<i>gb</i>
<i>D. erecta</i>	“	“	2m / 4f	“	“
<i>D. ananassae</i>	“	“		-	<i>gb</i>
<i>D. tani</i>	“	“		-	<i>gb</i>
<i>D. pseudoobscura</i>	<i>obscura</i>	“	5m / 10f	“	-
<i>D. willistoni</i>	<i>willistoni</i>	“			
<i>Drosophila</i> “Havaianas” (gênero <i>Idiomyia</i>)					
<i>I. grimshawi</i>		<i>stock center</i>	1m / 2f	<i>gb</i>	<i>gb</i>
Subgênero <i>Dettopsomyia</i>					
<i>D. nigrovittata</i>		C.R. Vilela (São Paulo)	2m / 3f	G18	-
gênero <i>Scaptodrosophila</i>					
<i>S. dorsocentralis</i>		<i>stock center</i>	1m / 2f	S135	-
<i>S. brunneipennis</i>		M. Polak (EUA)	1m / 1f	FB92	-

Tabela A2: Lista de espécies usadas para as seções 4.3) e 4.4) : informações sobre procedência (incluindo coleta na natureza), quantidade de indivíduos usados na extração de *DNA* (*origem do DNA*), e sequências obtidas e a se obter (de *kl-5* e *kl-3*) para análise filogenética. *stock center* = *Tucson Stock Center* ou *San Diego Stock Center*; m = tórax de macho, f = tórax de fêmea, *DNA* extraído separadamente; S, G, FB e J = códigos das sequências que obtemos do macho e/ou fêmea; *gbank* = sequência obtida no *GenBank* (NCBI); *kl-2*, *kl-3*, *kl-5* e *JYa* = sequências dos respectivos genes (detalhes dos *primers* usados e tamanho da sequência amplificada na Tabela 2).

Espécie	Procedência	Origem do DNA	<i>kl-2</i>	<i>kl-3</i>	<i>kl-5</i>	<i>JYa</i>
Subfamília Drosophilinae						
<i>Drosophila</i>						
<i>busckii</i>	<i>stock center</i>	3m / 4f			FB98	JY2
<i>grimshawi</i>	“	1m / 2f	<i>gbank</i>	<i>gbank</i>	<i>gbank</i>	<i>gbank</i>
<i>melanogaster</i>	“	30m / 40f	“	“	“	“
<i>mojavensis</i>	“	3m / 4f	“	“	“	“
<i>pseudoobscura</i>	“	5m / 10f	“	“	“	“
<i>virilis</i>	“	20m / 30f	“	“	“	“
<i>willistoni</i>	“	3m / 6f	“	“	“	“
outros gêneros						
<i>Neotanygastrella T58W5</i>	sobre açazeiro cortado, Paraty, RJ	1m / 1f	S206	S256	FB101	JY32
<i>Neotanygastrella T20W6</i>	“	1m / 1f	S205 S251	S222	S136	JY33
<i>Neotanygastrella T58W6</i>	“	1m / 1f	S207	S108	FB102	JY36
<i>Scaptodrosophila altera</i>	M. Polak (EUA)	2m / 2f	S153	FB13	FB78	JY9
<i>S. brunneipennis</i>	“	1m / 1f	S154	FB41	FB92	JY35
<i>S. bryani</i>	“	1m / 1f	S223		FB85	JY10
<i>S. collessi</i>	“	1m / 1f	S158	FB11	FB77	JY11
<i>S. coracina</i>	“	2m / 2f	S160	FB61	FB88	JY12
<i>S. cultello</i>	“	1m / 1f	S138	FB14		
<i>S. deflexa</i>	“	2m / 4f	S139	FB35	S133	JY14
<i>S. dorsocentralis</i>	“	8m / 12f	S208	FB44	S135	JY15
<i>S. fumida</i>	“	1m / 1f	S169	FB40		S234
<i>S. fuscithorax</i>	“	1m / 1f	S209	FB38	FB90	
<i>S. hibisci</i>	J. Baker (Austrália)	3m / 5f	S141	FB36	FB95	
<i>S. inornata</i>	M. Polak (EUA)	5m / 7f	S143	FB2	FB79	JY4
<i>S. latifascieformis</i>	<i>stock center</i>	3m / 6f	S211	FB43	S243	JY19
<i>S. lativittata</i>	M. Polak (EUA)	5m / 7f	S144	FB1		JY20
<i>S. lebanonensis</i>	<i>stock center</i>	3m / 4f	S224		FB100	JY21
<i>S. pattersoni</i>	“	3m / 5f	S146	S225	FB93	JY22
<i>S. rufifrons</i>	M. Polak (EUA)	12m / 9f	S212	FB42	FB94 S239	JY23
<i>S. stonei</i>	<i>stock center</i>	3m / 6f	S147	F32	FB83	JY5
<i>S. subtilis</i>	M. Polak (EUA)	2m / 2f	S148	FB72	FB87	JY24
<i>S. zophera</i>	“	5m / 7f	S149	FB6	FB86 S241	JY25

Tabela A2. Continuação.

Espécie	Procedência	Origem do DNA	kl-2	kl-3	kl-5	JYa
<i>Chymomyza amoena</i>	<i>stock center</i>	2m / 2f	S248	S104	FB96	JY6
<i>C. bicoloripes</i>	sobre tronco cortado, Ubatuba, SP	1m / 1f	S166	FB51	FB97	JY7
<i>C. caudatula</i>	M. Matsuda (Japão)	1m / 1f	S215	S221	S238	S231
<i>C. costata</i>	“	1m / 1f	S198 S250	S110	S121	JY_B13
<i>C. distincta</i>	“	1m / 1f	S214	S220	S237	S230
<i>C. fuscimana</i>	“	1m / 1f	S213 S249	S228	S236	S229
<i>C. procnemis</i>	<i>stock center</i>	3m / 6f	S163	S103	S125	S244
<i>Chymomyza</i> sp1	sobre tronco cortado, Itatiaia, RJ	1m / 1f	S199	S112	S124	JY28
<i>Chymomyza</i> T1	sobre tronco cortado, Itatiaia, RJ	1m / 1f	S252	S111	S123	JY29
<i>Chymomyza</i> T21X1	sobre tronco cortado, Itaipava, RJ	1m / 1f	S170	S107	S130	JY30
<i>Chymomyza</i> T58W2	sobre tronco cortado, Ubatuba, SP	1m / 1f	S201	S253		JY31
<i>Colocasiomyia alocasiae</i>	<i>stock center</i>	1m / 1f	S157	S113	FB103	
<i>Colocasiomyia xenalocasiae</i>	“	1m / 1f	S150		FB104	
subfamília Steganinae						
<i>Gitona bivisualis</i>	R. Tidon (Goiás)	1m / 1f	S203	FB65	FB105	genoma
<i>Phortica tropicalis</i>	J. R. David (França)	1m / 2f	S227		FB107	S232
<i>Rhinoleucophenga brasiliensis</i>	C.R. Vilela (São Paulo)	1m / 2f	S216	S116	S131	
família Ephydriidae						
<i>Scatella tenuicosta</i>	J. Sanderson (EUA)	1m / 2f		S115	S1	

Anexo 7.2. Exemplo de sequenciamento e alinhamento

[O sequenciamento de regiões gênicas que amplificamos foi realizado pela empresa Macrogen, e o alinhamento de aminoácidos do gene *kl-5* foi realizado no programa Mega V para análise filogenética. O código S67 se refere à sequência da espécie *Drosophila ellisoni* (ver Tabela A1 do Anexo 7.1)]

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
C C A A A C T T C T A C T T T A C C A A T T T T G A A G A A A C G G A A C A T A T T C T T C T T A G C C A C C A T T C C T C C T G C T T G T A C C A G C T A T T A A A T T A A G T T T G C C G A C G A A T

750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
C A T A T A A T T T G G T C A A A T G A C G C G A T A C C A T T G C A G G A C T A T T A C C A T T G G A C A A T A T A T C T A A T A A G T C C G C T G A T G A A A C A A A A T A A A A C C G A G A C G T T T A G T C T C C A A A T A G

880 890 900 910 920 930 940 950
T C A T T A G A G C T T T C T C A C A T A A T A A A A G C A T T T T G A G C A A C G T T T C C A A G T G T C G T A T A G C T T A C T A C N I A G A T C G A T

630 GTAGTAAGCTATACGAACACTTGGAAACGTGCTCAAAATGCTTTTATATGTGAGAAAGCTCTTAATGACTATTTGGAGACTAAACGCTCTAAGTTACCCTCGGTTTATTTTGTTCATCAGCG
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740

750 GACTTTATTAGATATATTGTCAAATGGTAATAGTCCCTGCAATGGTATCGCTCATTTGACCAAA TTATATGATTCCGTC GGC AAAC TT AA TTT AATAGCTGTAC A GAC A GCA G A GGAATGGTG
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870

880 GCTAA GATTAGAGATATGTTCCGTTTCTTCAAA TGTGATTGCAGTGTAAGTAGAGTTTGCTAAATCGCGTACGATAAA
890
900
910
920
930
940
950

103

Anexo 7.3. Morfometria (dados brutos) de *Drosophila* sp. I4 (em fase de descrição)

[Abreviações definidas por Baechli *et al.* (2004)]

numero	fr.length	fr.width	fr.index	width inn.	width rat.	oce.length	oce.triang	orb_plate	orb.plate_inx
1	15	13	1,15	20	1,54	6	0,40	11	0,73
2	14	13	1,08	19	1,46	6	0,43	10	0,71
3	14	14	1,00	22	1,57	5	0,36	11	0,79
4	15	13	1,15	shrunk		6	0,40	10	0,67
5	16	14	1,14	21	1,50	6	0,38	12	0,75
6	15	14	1,07	21	1,50	6	0,40	10	0,67
7	shrunk	shrunk		shrunk		6		shrunk	
8	16	13	1,23	22	1,69	5	0,31	11	0,69
9	15	14	1,07	22	1,57	6	0,40	11	0,73
17	16	14	1,14	23	1,64	6	0,38	11	0,69
	15,11	13,56	1,12	21,25	1,56	5,80	0,38	10,78	0,71
	16,00	14,00	1,23	23,00	1,69	6,00	0,43	12,00	0,79
	14,00	13,00	1,00	19,00	1,46	5,00	0,31	10,00	0,67
fr.length	fr.width	fr.index	width inn.	width rat.	oce.length	oce.triang	orb_plate	orb.plate_inx	
in mm:	in mm:		in mm:			in mm:			
	0,37	0,33		0,52	0,04	0,14	0,01	0,26	0,02
	0,39	0,34	0,03	0,56	0,04	0,15	0,01	0,29	0,02
	0,34	0,32	0,02	0,46	0,04	0,12	0,01	0,24	0,02

acima MACHOS (9+1) abaixo FEMEAS (5+2)

numero	fr.length	fr.width	fr.index	width inn.	width rat.	oce.length	oce.triang	orb_plate	orb.plate_inx
10	17	14	1,21	25	1,79	6	0,35	12	0,71
11	16	15	1,07	22	1,47	6	0,38	12	0,75
12	17	16	1,06	26	1,63	6	0,35	13	0,76
13	15	15	1,00	23	1,53	6	0,40	12	0,80
14	17	15	1,13	25	1,67	6	0,35	13	0,76
15	17	14	1,21	24	1,71	6	0,35	12	0,71
16	15	13	1,15	23	1,77	6	0,40	11	0,73
	16,29	14,57	1,12	24,00	1,65	6,00	0,37	12,14	0,75
	17,00	16,00	1,21	26,00	1,79	6,00	0,40	13,00	0,80
	15,00	13,00	1,00	22,00	1,47	6,00	0,35	11,00	0,71
fr.length	fr.width	fr.index	width inn.	width rat.	oce.length	oce.triang	orb_plate	orb.plate_inx	
in mm:	in mm:		in mm:			in mm:			
	0,40	0,36	0,03	0,59	0,04	0,15	0,01	0,30	0,02
	0,41	0,39	0,03	0,63	0,04	0,15	0,01	0,32	0,02
	0,37	0,32	0,02	0,54	0,04	0,15	0,01	0,27	0,02

orb3_orb1	orb3_med_vert	indice_orb3	orb1	orb3	orb1/orb3	orb2	orb2/orb1	postocel
5	6	0,83	9	9	1,00	4	0,44	8
4	5	0,80	8	9	0,89	4	0,50	8
4	5	0,80	11	9	1,22	4	0,36	8
4	6	0,67	8	8	1,00	4	0,50	8
4	6	0,67	7	8	0,88	5	0,71	8
4	5	0,80	8	9	0,89	4	0,50	8
shrunk	shrunk		7	9	0,78	4	0,57	8
4	5	0,80	9	9	1,00	4	0,44	8
4	5	0,80	8	10	0,80	4	0,50	9
4	6	0,67	9	9	1,00	4	0,44	9
4,11	5,44	0,76	8,40	8,90	0,95	4,10	0,50	8,20
5,00	6,00	0,83	11,00	10,00	1,22	5,00	0,71	9,00
4,00	5,00	0,67	7,00	8,00	0,78	4,00	0,36	8,00

orb3_orb1	orb3_med_vert	indice_orb3	orb1	orb3	orb1/orb3	orb2	orb2/orb1	postocel
in mm:			in mm:		in mm:			
0,10	0,13	0,02	0,20	0,22	0,02	0,10	0,01	0,20
0,12	0,15	0,02	0,27	0,24	0,03	0,12	0,02	0,22
0,10	0,12	0,02	0,17	0,20	0,02	0,10	0,01	0,20

6	6	1,00	9	11	0,82	5	0,56	9
5	5	1,00	10	12	0,83	6	0,60	10
6	6	1,00	10	11	0,91	6	0,60	10
5	6	0,83	9	10	0,90	5	0,56	10
5	6	0,83	10	11	0,91	5	0,50	10
4	6	0,67	9	10	0,90	4	0,44	11
4	5	0,80	9	10	0,90	4	0,44	10
5,00	5,71	0,88	9,43	10,71	0,88	5,00	0,53	10,00
6,00	6,00	1,00	10,00	12,00	0,91	6,00	0,60	11,00
4,00	5,00	0,67	9,00	10,00	0,82	4,00	0,44	9,00

orb3_orb1	orb3_med_vert	indice_orb3	orb1	orb3	orb1/orb3	orb2	orb2/orb1	postocel
in mm:			in mm:		in mm:			
0,12	0,14	0,02	0,23	0,26	0,02	0,12	0,01	0,24
0,15	0,15	0,02	0,24	0,29	0,02	0,15	0,01	0,27
0,10	0,12	0,02	0,22	0,24	0,02	0,10	0,01	0,22

p.ocel rat.	oc.setae	oc.se.rat	med.vert.	later.vert.	vt.indx	2nd oral	1st oral	vibr.indx	gena
0,53	11	0,73	12	9	1,33	1,5	11	0,14	3
0,57	10	0,71	11	10	1,10	4	10	0,40	3
0,57	10	0,71	10	10	1,00	3	10	0,30	3
0,53	11	0,73	12	9	1,33	4	10	0,40	3
0,50	9	0,56	11	10	1,10	2	12	0,17	3
0,53	10	0,67	11	11	1,00	2	9	0,22	3
	9		12	11	1,09	4	10	0,40	3
0,50	10	0,63	12	11	1,09	2	10	0,20	4
0,60	11	0,73	13	11	1,18	3	10	0,30	4
0,56	11	0,69	11	11	1,00	3	12	0,25	4
0,55	10,20	0,69	11,50	10,30	1,12	2,85	10,40	0,28	3,30
0,60	11,00	0,73	13,00	11,00	1,33	4,00	12,00	0,40	4,00
0,50	9,00	0,56	10,00	9,00	1,00	1,50	9,00	0,14	3,00

p.ocel rat.	oc.setae	oc.se.rat	med.vert.	later.vert.	vt.indx	2nd oral	1st oral	vibr.indx	gena
in mm:			in mm:			in mm:			
0,01	0,25	0,02	0,28	0,25	0,03	0,07	0,25	0,01	0,08
0,01	0,27	0,02	0,32	0,27	0,03	0,10	0,29	0,01	0,10
0,01	0,22	0,01	0,24	0,22	0,02	0,04	0,22	0,00	0,07

0,53	12	0,71	14	12	1,17	3	12	0,25	4
0,63	13	0,81	13	13	1,00	5	12	0,42	4
0,59	12	0,71	12	12	1,00	4	13	0,31	4
0,67	11	0,73	14	14	1,00	3	12	0,25	3
0,59	13	0,76	15	13	1,15	3	14	0,21	4
0,65	13	0,76	12	12	1,00	4	13	0,31	4
0,67	11	0,73	13	11	1,18	4	11	0,36	4
0,62	12,14	0,75	13,29	12,43	1,07	3,71	12,43	0,30	3,86
0,67	13,00	0,81	15,00	14,00	1,18	5,00	14,00	0,42	4,00
0,53	11,00	0,71	12,00	11,00	1,00	3,00	11,00	0,21	3,00

p.ocel rat.	oc.setae	oc.se.rat	med.vert.	later.vert.	vt.indx	2nd oral	1st oral	vibr.indx	gena
in mm:			in mm:			in mm:			
0,02	0,30	0,02	0,32	0,30	0,03	0,09	0,30	0,01	0,09
0,02	0,32	0,02	0,37	0,34	0,03	0,12	0,34	0,01	0,10
0,01	0,27	0,02	0,29	0,27	0,02	0,07	0,27	0,01	0,07

eye.big	cheek.inx	machos M18	M18=aspirados de C.monophylla
24	8,00	1	18/XII
23	7,67	2	18/XII
21	7,00	3	22/XII
22	7,33	4	28/XII
22	7,33	5	28/XII
21	7,00	6	28/XII
22	7,33	7	28/XII
22	5,50	8	28/XII
24	6,00	9	28/XII
25	6,25	17	18/XII
22,60	6,94 media		Filme 260 holótipo?
25,00	8,00 max		
21,00	5,50 min		

eye.big	cheek.inx
	in mm:
	0,17 media
	0,20 max
	0,13 min

		femeas M18
25	6,25	10 18/XII
25	6,25	11 18/XII
27	6,75	12 22/XII
25	8,33	13 28/XII
28	7,00	14 28/XII
25	6,25	15 18/XII
23	5,75	16 26/XII
25,43	6,65 media	
28,00	8,33 max	
23,00	5,75 min	

eye.big	cheek.inx
	in mm:
0,62	0,16 media
0,68	0,20 max
0,56	0,14 min

eye.big	eye small	eye index	lenght fla	width flag	1st flagel_index	arist.up	arist.low	arist.inn
24	20	1,2	6	4	1,5	3	2	3
23	18	1,28	6	5	1,20	3	2	3
21	19	1,11	7	4	1,75	3	2	4
22	16	1,38	7	4	1,75	3	2	3
22	20	1,10	6	4	1,50	3	2	3
21	15	1,40	6	4	1,50	3	1	4
22	18	1,22	8	5	1,60	3	2	3
22	20	1,10	7	4	1,75	3	2	4
24	20	1,20	7	5	1,40	3	2	3
25	22	1,14	8	4	2,00	broken	broken	4
22,60	18,80	1,21	6,80	4,30	1,60	3,00	1,89	3,40
25,00	22,00	1,40	8,00	5,00	2,00	3,00	2,00	4,00
21,00	15,00	1,10	6,00	4,00	1,20	3,00	1,00	3,00
eye.big	eye small	eye index	lenght fla	width flag	1st flagel	arist.up	arist.low	arist.inn

acima MACHOS (9+1) abaixo FEMEAS (5+2)

eye.big	eye small	eye index	lenght fla	width flag	1st flagel_index	arist.up	arist.low	arist.inn
25	21	1,19	7	5	1,40	3	2	5
25	21	1,19	7	5	1,40	broken	broken	broken
27	19	1,42	8	4	2,00	3	2	5
25	22	1,14	7	5	1,40	3	2	4
28	21	1,33	9	5	1,80	3	2	4
25	22	1,14	8	5	1,60	3	2	2
23	20	1,15	8	4	2,00	3	2	3
25,43	20,86	1,22	7,71	4,71	1,66	3,00	2,00	3,83
28,00	22,00	1,42	9,00	5,00	2,00	3,00	2,00	5,00
23,00	19,00	1,14	7,00	4,00	1,40	3,00	2,00	2,00

thrax leng	acrost	up.humer	low.hum	h index	dc transv	dc long	dc dist	rat	dc ant	dc post
45	8	9	5	1,8	16	8	2,00		12	17
43	8	9	7	1,29	15	6	2,50		12	17
46	8	9	7	1,29	15	7	2,14		10	17
46	8	10	8	1,25	16	7	2,29		13	18
45	8	9	7	1,29	16	6	2,67		11	18
41	8	10	7	1,43	14	5	2,80		9	14
49	8	10	9	1,11	14	6	2,33		12	17
45	8	10	8	1,25	15	5	3,00	broken		17
47	8	10	8	1,25	16	6	2,67		11	19
50	8	10	8	1,25	16	6	2,67		11	17
45,70	8,00	9,60	7,40	1,32	15,30	6,20	2,51		11,22	17,10
50,00	8,00	10,00	9,00	1,80	16,00	8,00	3,00		13,00	19,00
41,00	8,00	9,00	5,00	1,11	14,00	5,00	2,00		9,00	14,00
thrax leng	acrost	up.humer	low.hum	h index	dc transv	dc long	dc dist	rat	dc ant	dc post

thrax leng	acrost	up.humer	low.hum	h index	dc transv	dc long	dc dist	rat	dc ant	dc post
53	8	11	9	1,22	18	8	2,25		12	19
52	8	10	8	1,25	18	6	3,00		13	19
57	8	12	9	1,33	19	8	2,38		14	19
49	8	10	9	1,11	16	6	2,67		11	19
51	8	11	9	1,22	20	9	2,22		14	20
51	8	10	8	1,25	17	8	2,13		12	18
51	8	9	6	1,50	16	7	2,29		11	18
52,00	8,00	10,43	8,29	1,27	17,71	7,43	2,42		12,43	18,86
57,00	8,00	12,00	9,00	1,50	20,00	9,00	3,00		14,00	20,00
49,00	8,00	9,00	6,00	1,11	16,00	6,00	2,13		11,00	18,00

dc index	api dist	ap.bas.dis	sc pos inx	bas.scut	api. Scut	sc index	ster ant	ster post	stern inx
0,71	6	9	0,67	15	22	0,68	14	17	0,82
0,71	5	8	0,63	16	20	0,80	10	14	0,71
0,59	6	8	0,75	15	20	0,75	12	15	0,80
0,72	5	8	0,63	17	20	0,85	13	18	0,72
0,61	6	8	0,75	16	21	0,76	12	15	0,80
0,64	6	7	0,86	16	18	0,89	12	14	0,86
0,71	6	9	0,67	16	18	0,89	11	13	0,85
	6	7	0,86	17 broken			12	16	0,75
0,58	6	9	0,67	18	21	0,86	10	17	0,59
0,65	6	9	0,67	16	19	0,84	15	17	0,88
0,66	5,80	8,20	0,71	16,20	19,89	0,81	12,10	15,60	0,78
0,72	6,00	9,00	0,86	18,00	22,00	0,89	15,00	18,00	0,88
0,58	5,00	7,00	0,63	15,00	18,00	0,68	10,00	13,00	0,59
dc index	api dist	ap.bas.dis	sc pos inx	bas.scut	api. Scut	sc index	ster ant	ster post	stern inx

dc index	api dist	ap.bas.dis	sc pos inx	bas.scut	api. Scut	sc index	ster ant	ster post	stern inx
0,63	7	8	0,88	19	21	0,90	13 broken		
0,68	7	9	0,78	17	21	0,81	15	18	0,83
0,74	8	10	0,80	17	20	0,85	15	19	0,79
0,58	7	9	0,78	18	21	0,86	14 broken		
0,70	8	10	0,80	18	22	0,82	14	19	0,74
0,67	7	9	0,78	17	20	0,85	14	17	0,82
0,61	6	9	0,67	16	19	0,84	13 broken		
0,66	7,14	9,14	0,78	17,43	20,57	0,85	14,00	18,25	0,80
0,74	8,00	10,00	0,88	19,00	22,00	0,90	15,00	19,00	0,83
0,58	6,00	8,00	0,67	16,00	19,00	0,81	13,00	17,00	0,74

ster mid	katerpist
3	0,21
4	0,40
3	0,25
4	0,31
4	0,33
4	0,33
4	0,36
4	0,33
3	0,30
2	0,13
3,50	0,30 média
4,00	0,40 max
2,00	0,13 min

ster mid katerpist

ster mid	katerpist
4	0,31
5	0,33
5	0,33
3	0,21
4	0,29
3	0,21
3	0,23
3,86	0,27
5,00	0,33
3,00	0,21

w.length	w.width	w.ratio	C-II	C-III	c.index	C-IV	ac.index	C-III hb	C-III hb+	
93	45	2,07		56	22	2,55	9	2,44	11	23
84	39	2,15		54	19	2,84	7	2,71	8	19
85	42	2,02		53	19	2,79	8	2,38	8	20
81	38	2,13		49	19	2,58	7	2,71	9	19
85	44	1,93		59	21	2,81	9	2,33	11	21
73	37	1,97		43	22	1,95	9	2,44	12	23
84	38	2,21		51	20	2,55	8	2,50	9	20
83	40	2,08		49	19	2,58	9	2,11	12	19
87	44	1,98		56	20	2,80	8	2,50	8	19
88	42	2,10		52	20	2,60	8	2,50	10	20
84,30	40,90	2,06		52,20	20,10	2,60	8,20	2,46	9,80	20,30
93,00	45,00	2,21		59,00	22,00	2,84	9,00	2,71	12,00	23,00
73,00	37,00	1,93		43,00	19,00	1,95	7,00	2,11	8,00	19,00
w.length	w.width	w.ratio	C-II	C-III	c.index	C-IV	ac.index	C-III hb	C-III hb+	
2.0560976	0.997561									

acima MACHOS (9+1) abaixo FEMEAS (5+2)

			d1	d2				d7	d7+d8	
w.length	w.width	w.ratio	C-II	C-III	c.index	C-IV	ac.index	C-III hb	C-III hb+	
95	46	2,07		61	23	2,65	10	2,30	12	24
99	47	2,11		63	22	2,86	9	2,44	14	23
104	50	2,08		65	22	2,95	10	2,20	11	23
94	45	2,09		58	24	2,42	9	2,67	14	25
97	48	2,02		62	25	2,48	10	2,50	14	26
93	45	2,07		58	21	2,76	9	2,33	11	23
90	42	2,14		55	20	2,75	8	2,50	8	20
96,00	46,14	2,08		60,29	22,43	2,70	9,29	2,42	12,00	23,43
104,00	50,00	2,14		65,00	25,00	2,95	10,00	2,67	14,00	26,00
90,00	42,00	2,02		55,00	20,00	2,42	8,00	2,20	8,00	20,00

hb_index	4c index	M-IV	M-III	4v index	CuA	dM-Cu	5x index	M index	b4+5
0,50	0,92	37	24	1,54	14	8	1,75	0,58	15
0,42	0,86	38	22	1,73	12	7	1,71	0,55	14
0,42	0,83	38	23	1,65	12	7	1,71	0,52	12
0,47	0,79	36	24	1,50	11	6	1,83	0,46	13
0,52	0,95	42	22	1,91	12	7	1,71	0,55	14
0,55	1,16	34	19	1,79	10	6	1,67	0,53	12
0,45	0,91	37	22	1,68 dobrada	dobrada				15
0,63	0,86	37	22	1,68	12	7	1,71	0,55	12
0,40	0,83	40	24	1,67	14	8	1,75	0,58	14
0,50	0,87	40	23	1,74	13	7	1,86	0,57	12
0,49	0,90	37,90	22,50	1,69	12,22	7,00	1,75	0,54	13,30
0,63	1,16	42,00	24,00	1,91	14,00	8,00	1,86	0,58	15,00
0,40	0,79	34,00	19,00	1,50	10,00	6,00	1,67	0,46	12,00
h.brist	4c index	M-IV	M-III	4v index	CuA	dM-Cu	5x index	M index	b4+5

		d3	d4		d5	d6			
hb_index	4c index	M-IV	M-III	4v index	CuA	dM-Cu	5x index	M index	b4+5
0,52	1,00	45	23	1,96	14	9	1,56	0,61	14
0,64	0,79	44	28	1,57	14	8	1,75	0,50	16
0,50	0,81	41	27	1,52	15	10	1,50	0,56	16
0,58	0,96	40	25	1,60	13	8	1,63	0,52	14
0,56	0,96	45	26	1,73	14	10	1,40	0,54	15
0,52	0,88	41	24	1,71	12	9	1,33	0,50	15
0,40	0,80	38	25	1,52	11	8	1,38	0,44	13
0,53	0,89	42,00	25,43	1,66	13,29	8,86	1,51	0,52	14,71
0,64	1,00	45,00	28,00	1,96	15,00	10,00	1,75	0,61	16,00
0,40	0,79	38,00	23,00	1,52	11,00	8,00	1,33	0,44	13,00

prox. X	ab.length
0,63	45
0,64	44
0,52	52
0,54	45
0,64	47
0,63	46
0,68	41
0,55	45
0,58	52
0,52	55
0,59	47,20 média
0,68	55,00 max
0,52	41,00 min

prox. X ab.length

prox. X	ab.length
0,61	59
0,57	54
0,59	60
0,56	50
0,58	54
0,63	51
0,52	50
0,58	54,00
0,63	60,00
0,52	50,00

Anexo 7.4. Exemplos de preparação de terminália masculina para identificação de espécie

Drosophila bromelioides (flor de *Passionaria* sp., Itatiaia, RJ)

(lab)

(Val, 1982, fig.1)

Drosophila coffeata (tronco cortado, Ubatumirim, SP)

(<http://marte.museu-goeldi.br/zoologia/zooppbio/exemplar.php?id=250>)

(Vilela, 1983)

Drosophila ellisoni ? (inflorescência de *Heliconia bihai* / Ilha Grande, RJ)

(lab)

(lab)

(Vilela, 1983)

Drosophila morelia (inflorescência de *Geonoma* sp., Bananal, SP)

2,5 mm

0,5 mm

(lab)

C

0.1 mm

D

(Vilela & Bachli, 2004, figs 31, 32 e 34)

Hirtodrosophila morgani (fungo, ordem Auriculariales, Ilha Grande, RJ)

(lab)

(lab)

B

Vilela & Bachli, 2004 (pgs. 173-174)

(lab)

D

E

Hirtodrosophila ramulosa (fungo, ordem Auriculariales / Ilha Grande, RJ)

(lab)

(lab)

(lab)

(Burla, 1956)

Drosophila rosinae (inflorescências de *Heliconia bihai*, Ilha Grande, RJ)

(lab)

(lab)

(lab)

(Vilela, 1983, fig.18)

8. Índice de figuras e tabelas

Figura	pág.
1	11
2	12
3	13
4	15
5	18
6	21
7	23
8	28
9	28
10	30
11	31
12	32
13	34
14	39
15	59
16	60
17	81

Tabela	pág.
1	14
2	36
3	37
4	78
5	82
A1 (anexo 7.1)	94
A2 (anexo 7.1)	96