ROSÂNGELA SANTA BRÍGIDA COSTA



ROSÂNGELA SANTA BRÍGIDA COSTA

FATORES DETERMINANTES DA REDE DE INTERAÇÃO DE DROSOPHILIDAE E

FUNGOS MACROSCÓPICOS

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho Co-orientadora: Prof. Dra. Isabela Galarda Varassin (UFPR)

Universidade Federal do Paraná Sistema de Bibliotecas (Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

> Costa, Rosângela Santa Brígida Fatores determinantes da rede de interação de Drosophilidae e fungos macroscópicos. / Rosângela Santa Brígida Costa. – Curitiba, 2019. 120 p.: il.

Orientador: Claudio José Barros de Carvalho Coorientadora: Isabela Galarda Varassin

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

1. Mosca-das-frutas. 2. Fungos. I. Título. II. Carvalho, Claudio José Barros de, 1951-. III. Varassin, Isabela Galarda. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

CDD (22. ed.) 595.774



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIENCIAS BIOLOGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) - 40001016005P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ROSANGELA SANTA BRIGIDA COSTA intitulada: Fatores determinantes da rede de interação de Drosophilidae e fungos macroscópicos, sob orientação do Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ BARROS DE CARVALHO, que após após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Julho de 2019.

CLAUDIO JOSÉ BARROS DE CARVALHO Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

GUSTAVO GRACIOLLI Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL)

MARCO SILVA GOTTSCHALK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS)

MAURICIO OSVALDO MOURA Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho as minhas queridas avós Eugênia Costa e Inácia Costa,

exemplos de guerreiras nas nossas famílias.

Durante os quatros anos do doutorado tive a oportunidade conhecer, conviver com pessoas que me ajudaram direta e indiretamente no desenvolvimento desta tese. E são a elas que agradeço e agradecerei sempre:

Professor Claudio, obrigada pela orientação, confiança, suporte psicológico e intelectual apoio ao meu trabalho.

Professora Isabela, obrigada pelos ensinamentos sobre pesquisa, pela sua paciência em ensinar a estruturar, escrever os manuscritos desta tese, por me mostrar como fazer ciência e me mostrar o mundo das redes de interações, pelo carinho e humildade que admiro e referenciarei, com certeza.

Ana Raquel, obrigada por me ajudar na coleta e identificação das leveduras com a biologia molecular.

Mariana Costa e Viviane Gonçalves, obrigada por me ensinarem a identificação dos cogumelos com a biologia molecular.

Henrique Gouveia, obrigada pela oportunidade de aprender a ensinar. Embora tenha sido curto o tempo que te ensinei um pouco dos Drosophilidae, mas foi o suficiente para eu aprender que temos que passar nosso conhecimento.

Laboratório de Biodiversidade e Biogeografia de Diptera, obrigada pela conversar cheia de alegrias que vocês me proporcionaram ao longo desse trabalho.

Laboratório de Interações & Biologia Reprodutiva, obrigada por me mostrarem o mundo das redes de interações nas reuniões semanais.

Ao Laboratório de Ecologia de Insetos pela estrutura para manutenção do material coletado para esta tese.

Aos membros do Laboratório de Biodiversidade e Taxonomia de Fungos, obrigada a todos que me ajudaram, ensinaram a teoria e prática de biologia molecular.

Obrigada ao Museu Paraense Emilio Goeldi, Estação Científica Ferreira Penna pelo apoio logístico em campo.

Camila Souza, obrigada pela ajuda com as análises de redes, eu aprendi muito com você.

Carlos Dias, obrigada por disponibilizar os dados meteorológicos da Estação Científica Ferreira Penna.

Vinicius Richardi e Professor Mário Navarro, obrigada pela contribuição com as fotos tiradas no Laboratório de morfologia e fisiologia de Culicidae e Chironimidae.

Marcos Fialho, obrigada pelas correções e sugestões para a melhoria do trabalho.

Leonardo Trevelin, obrigada pela ajuda com a 'linguagem' do R.

Lucas Gomes, obrigada pelas pranchas confeccionada para o capítulo 1.

Obrigada aos "irmãos" do Laboratório de Diptera com os quais tive o privilégio de conviver durante o mestrado e doutorado: Maíra Xavier, Diana Grisales, Lucas Gomes, João Fogaça, Victor Alves, Gustavo Ferro, Ândrio Zafalon-Silva, Gabriela Feola, Luana Santos, Tatiana Sepulveda, Danilo Amant, André Silva, Kirstern Lica Haseyama e Ana Caroline Vasconcelos.

Obrigada aos professores da Pós-Graduação em Entomologia por proporcionar as oportunidades de aprendizados sobre os insetos.

Obrigada a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de doutorado recebida e ao programa PELD pelos financiamentos para a coleta de dados. Enfim, contei com a ajuda de muitas pessoas para desenvolver esta tese, e serei sempre grata a todos.

"To do Science is to search for repeated patterns no simply to accumulate facts"

MacArthur R. H. (1972). Geographical Ecology. Princeton University Press, Princeton.

RESUMO

Drosophilidae é uma família de Diptera com seus membros normalmente conhecidos como "moscas-das-frutas" ou "moscas-do-vinagre". Entretanto, os membros desta família apresentam uma diversidade de nichos ecológicos muito mais ampla do que denotam seus nomes vulgares. Dentre esses, os drosofilídeos micófagos que estabelecem múltiplas interações com diversas espécies de fungos macroscópicos, são o foco desta tese. No capítulo 1, investigamos se os atributos morfológicos das espécies para o sucesso da oviposição dos Drosophilidae estão relacionados com a morfologia (tenacidade) dos fungos. Utilizamos para isso, dados de criação dos Drosophilidae em corpos de frutificação, onde a frequência da interação foram as ocorrências com sucesso na oviposição, nos corpos de frutificação. No capítulo 2, compreendemos a estrutura da rede formado pelas interações para alimentação e oviposição dos Drosophilidae em fungos macroscópicos. Para isso, usamos uma rede de multicamadas para testar se as redes formadas são modulares e aninhadas e descrever as espécies chaves nas diferentes camadas por medidas de centralidades. A rede analisada (capítulo 1), composta por 17 espécies de Drosophilidae e 38 espécies de fungos, apresentou baixa relação de oviposição nos fungos. A rede era levemente modular, com 59% das espécies comuns a guatro módulos. As espécies de Drosophilidae tem baixa preferência pelas espécies morfológicas de fungos correspondentes à oviposição, apoiando estudos (ver Capítulo 1). As redes analisadas (capítulo 2), compreendendo 17 espécies de Drosophilidae e 38 espécies de fungos para oviposição, 17 e 36 para alimentação e 23 e 47 para multicamadas, exibiram uma estrutura aninhada e levemente modular para as redes de alimentação e multicamadas, e uma estrutura não modular e aninhado para a rede de oviposição. As espécies que apresentaram valores elevados de centralidade, demonstraram importantes papéis para a alimentação e oviposição, com espécies pontes que conectam os dois tipos de interações com os fungos, levando a uma rede de multicamada generalizada.

Palavra-chave: Aninhamento. Centralidade. Corpos de frutificação. Modularidade. Oviposição. Multicamada. Tenacidade.

Drosophilidae is a family of Diptera with its members commonly known as "fruit flies" or "vinegar flies". However, this group presents a diversity of ecological niches much more extensive than their vulgar names denote. Among these, the mycophagous drosofilids that establish multiple interactions with several species of macroscopic fungi, are the focus of this thesis. In a broad way, the aim of this thesis is to contribute to the knowledge of the determinants of the interactions between Drosophilidae and macroscopic fungi. In chapter 1, we investigated if the morphological attributes of the ovopositor of the species of Drosophilidae are related to the morphology (tenacity) of the fungi. We used data obtained from the creation of Drosophilidae in fruiting bodies, where the frequency of interaction was the successful occurrence of oviposition in the fruiting bodies. In chapter 2, we understood the structure of the network composed by the interactions for feeding and oviposition of Drosophilidae with macroscopic fungi. For this, we used a multilayer network to test whether the observed networks are modular and nested; and to describe the key species in the different layers by measures of centralities. The analyzed network (Chapter 1), comprising 17 Drosophilidae species and 38 fungi species, exhibited a low relation for oviposition in the fungi. The network was slightly modular, with 59% of the species common to four modules. Drosophilidae species to have low preference for morphological corresponding fungi species to oviposition, supporting previous studies (see chapter 1). The analyzed networks (Chapter 2), comprising 17 Drosophilidae species and 38 fungi species for oviposition, 17 and 36 for feeding and 23 and 47 for multilayer, exhibited a nested struture and slightly modular for the feeding and multilayer networks, and a not modular struture and nested for the oviposition network. The species that presented high values of centrality demonstrated their important roles for feeding and oviposition, with species bridges that connect the two types of interactions with the fungi, leading to a generalized multilayer network.

Keywords: Centrality. Fruit bodies. Modularity. Oviposition. Multilayer. Tenacity

CAPÍTULO 1

FIGURE 3 - Sampling completeness measured from rarefaction of unique interactions and interaction events for the Drosophilidae-Fungi interaction network in FLONA of

Caxiuanã, Brazil. Rarefaction curve showing Chao 1 estimate of asymptotic richness of interactions (dashed black lines) with 95% confidence intervals (dashed gray lines).

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Rede de multicamada formada por interações entre Drosophilidae e fungos que fornecem recursos para as moscas. Os círculos representam espécies de Drosophilidae e os quadrados representam espécies de fungos. As linhas representam interações para alimentação (vermelha) e oviposição (azul). As cores dos símbolos representam os módulos da rede multicamada. Veja os nomes das espécies de fungos e Drosophilidae no Tabela S1.

CAPÍTULO 2.

TABELA 1 - Valores das métricas para as camadas da rede Drosophil	idae-Fungi e os
números de módulos formados	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS	
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUCTION	
2 MATERIAL AND METHODS	
2.1 SAMPLING DESIGN	
2.2 SPECIES IDENTIFICATION	
2.3 MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE GROUPS	
2.4 DROSOPHILIDAE-FUNGI INTERACTION NETWORK	
2.5 RELATION BETWEEN OVIPOSITOR MORPHOLOGIES AND TENACITY OF FRUITING	G BODIES31
3 RESULTS	
4 DISCUSSION	
REFERENCES	
SUPPLEMENTARY INFORMATION	
TABLE S1	53
TABLE S2	55
TABLE S3	57
TABLE S4	61
TABLE S5	63
CAPÍTULO 2	
INTRODUÇÃO	
MATERIAL E MÉTODOS	71
ÁREA DE ESTUDO	71
COLETA DOS DADOS DAS INTERAÇÕES ENTRE DROSOPHILIDAE E FUNGOS	71
IDENTIFICAÇÃO DOS DROSOPHILIDAE, LEVEDURAS E FUNGOS MACROSCÓPICOS	73
ANÁLISES DAS REDES	75
RESULTADOS	77
ESPÉCIES E SUAS INTERAÇÕES	77
DISCUSSÃO	

REFERÊNCIAS	
MATERIAL SUPLEMENTAR	91
TABELA S1	
TABELA S2	
TABELA S3	
TABELA S4	
REFERÊNCIAS	

As comunidades ecológicas possuem interações variadas que podem ser antagônicas, envolvendo predação, herbivoria e parasitismo, mutualistas como polinizadores ou dispersores de sementes, ou mesmo interações ainda não definidas, como por exemplo, os frugívoros ou visitantes florais (Lewinsohn et al. 2006). Essas interações são comuns entre as espécies e, na grande maioria das vezes são interconectadas, formando redes ecológicas complexas, que contribuem para a biodiversidade (Olesen et al. 2007). A biodiversidade abrange não apenas as espécies, mas também as interações entre as espécies, pois sua história evolutiva é influência pela história das interações entre as espécies (Thompson 2014). Para compreender como elas ocorrem no ambiente, é necessário o entendimento de como a seleção natural funciona nos ambientes perturbados e complexos da natureza. Portanto, compreender a arquitetura das interações das espécies pode ajudar a prever como as comunidades biológicas respondem às mudanças antrópicas.

Drosophilidae é uma família de Diptera cujo seus membros são comumente conhecidos como "moscas-das-frutas" ou "moscas-do-vinagre". Entretanto, os membros da família apresentam uma diversidade de nichos ecológicos muito mais ampla do que indicam os seus nomes vulgares. Os drosofilídeos são caracterizados como consumidores primários de microrganismos, leveduras e bactérias, associados a estágios iniciais de decomposição de diferentes tipos de substratos (vegetais, fungos e animais), utilizando-os como sítios de alimentação, reprodução e para acasalamento, ou até mesmo como predadores de outros animais (Carson 1971; Ashburner 1981; Grimaldi 1987; Vidal et al. 2016).

Sturtevant (1921) já observava que muitas espécies de Drosophilidae usavam os fungos para a reprodução. Desde então, estudos descreveram que espécies de Drosophilidae micófagos usam os fungos não apenas para reproduzir, mas também para alimentação. Os adultos se alimentam de microrganismos presentes nos corpos de frutificações (Courtney et al. 1990; Powell 1997) e as larvas das hifas e de microrganismos (Kimura 1976; Martin 1979; Lacy 1984; Hosaka & Uno 2012). Também utilizam esse substrato para acasalamento (Grimaldi 1987).

A micofagia nos drosofilídeos evolui de hábitos alimentares de espécies detritívoras, e ao longo da sua evolução os membros da família se especializaram em substratos que fermentavam, mas, especificamente, em microrganismos associados a fermentação, como por exemplo, bactérias e leveduras (Throckmorton 1975). Tal especialização permitiu o grupo explorar diferentes substratos em diferentes habitats. O hábito de se alimentar de substratos que fermentavam, como folhas e cascas de árvores caídas, possivelmente não supriam as necessidades nutricionais das moscas, desta forma, as espécies começaram a explorar outros recursos, como os fungos carnosos, que possuíam mais carboidratos. Assim, as moscas completavam suas dietas (Powell 1997). Por consequência, a micofagia no grupo parece ter evoluído de forma independente, várias vezes dentro da família, diversificando em várias linhagens, corroborando com hipóteses de que seus ancestrais eram detritívoros (Throckmorton 1975; Powell 1997).

A generalização quanto ao uso dos fungos pelas moscas é comum (Hanski 1989), mas algumas espécies apresentam um grau de especialização. A especialização em Drosophilidae micófago sempre foi discutida como improvável de acontecer (Courtney et al. 1990), pois os fungos são imprevisíveis na natureza e as espécies não diferem quanto sua composição nutricional (Jaenike 1978; Lacy 1984; Hanski 1989). A composição dos Drosophilidae micófagos para as regiões temperadas e tropicais é diferente (Courtney et al. 1990; Valer et al. 2016, Santa-Brígida et al. 2019). Para a região neotropical foi observado que as espécies são mais especializadas quanto ao uso de seus hospedeiros para a oviposição (Valer et al. (2016), em contrastes com a espécies de regiões temperadas que são mais generalistas (Courtey et al. 1990).

Courtney et al. (1990) reuniram a maioria das informações existente na literatura sobre a ecologia dos Drosophilidae micófagos. No estudo, enfatizaram, questionaram e hipotetizaram a natureza ideal da interação para investigações ecológicas e evolutivas dos grupos, que até a década de 1990 muito se sabia, mas a literatura estava fragmentada e muitas vezes difícil de compreender. Desde então, raros trabalhos exploraram os Drosophilidae micófagos, mas o foco que Courtney et al. (1990) esperavam ainda não foi satisfatório para a compreensão da dinâmica da comunidade micófaga de Drosophilidae. No trabalho, os autores discutem que os verdadeiros Drosophilidae micófagos, *Mycodrosophila* e *Hirtodrosophila* ainda não tiveram suas associações com os fungos estudadas profundamente. Isso ocorre em parte, porque os estudos focam em associações de espécies facultativas. Dessa forma, originou uma gama de trabalhos sem conclusões precisas quanto a verdadeira interação do grupo.

Na rede de interação Drosophildiae-Fungi existem mecanismos que estruturam a interação dos grupos, por exemplo, os processos baseados em seus nichos, como os atributos que estão relacionados às histórias de vida das espécies, e que podem condicionar as interações (Vàzquez et al. 2009). Neste sentido, esta tese pretende avançar no entendimento das interações dos grupos, através do conhecimento dos fatores que determinam as interações da rede Drosophilidae-Fungo. Especificamente, no capítulo 1 investigamos a frequência da interação dada pela correspondência morfológica entre as espécies de Drosophilidae e seus hospedeiros para a oviposição nos corpos de frutificação. Os Drosophilidae usam uma variedade de corpos de frutificação de fungos macroscópicos para ovipositar (Toda et al. 1999; van Klinken & Walter 2001). Esses fungos diferem em tipos de texturas (tenacidade), que pode influenciar na oviposição pelos Drosophilidae nas diferentes espécies de fungos. Dessa forma, espera-se que cada espécie de mosca teria um ovipositor relacionado para se adequar ao atributo da espécie de fungo para colocar seus ovos. Usando um conjunto de dados coletados durante o período chuvoso da região amazônica, na Floresta Nacional de Caxiuanã, no estado do Pará, testamos se as características morfológicas influenciam as frequências de interação entre as espécies dos grupos.

Além da correspondência dos atributos para a interação, nós também investigamos a estrutura da rede formada por Drosophilidae e fungos macroscópicos que hospedam leveduras que são fontes de alimento para os Drosophilidae ou fornecem local para deposição de seus ovos para reprodução (Capítulo 2) (Courtey et al. 1990). Portanto, consideramos dois tipos de interação; alimentação e oviposição. Neste capítulo, utilizamos uma rede de multicamadas para testar se as interações do sistema são organizadas em módulos, ou se sobrepõem, devido às diferentes finalidades para o uso das espécies de fungos, e se espécies-chaves nas diferentes redes interligam diferentes tipos de interação. Por fim, os resultados obtidos nos capítulos desta tese, contribuíram para o melhor conhecimento da interação dos Drosophilidae e fungos macroscópicos.

- Ashburner M. 1981. Entomophagous & other bizarre Drosophilidae. Em: Ashburner M,
 Carson HL, Thompson, Jr. JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol.
 3a, Academic Press, London, pp. 395–429.
- Carson H.L. 1971. *The ecology of Drosophila breeding sites*. University of Hawaii Honolulu.
- Courtney S.P., Kibota T.T., Singleton T.A. 1990. Ecology of mushroom-feeding Drosophilidae. *Advances in Ecological Research*, 20: 225–274.
- Grimaldi D.A. 1987. Phylogenetics and taxonomy of Zygothrica (Diptera: Drosophilidae). Bulletin of the American Museum of Natural History, 186: 103– 268.
- Hanski I. 1989. Fungivory: fungi, insects and ecology. In: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JB (eds) *Insect-fungus interaction*. Academic Press, London, pp. 25–68.
- Hosaka K., Uno, K. 2012. A preliminary Survey on Larval Diversity in Mushroom Fruit Bodies. *Bulletin* of the *National Museum of Nature* and *Science Series B* (*Botany*), 38: 77–85.

Jaenike J. 1978. Host selection by mycophagous Drosophila. Ecology, 59: 1286–1288

- Kimura M.T. 1976. Drosophila survey of Hokkaido, XXXII. A field survey of fungus preferences of Drosophilid flies in Sapporo. Journal of the Faculty of Science Hokkaido University, 20: 288–298.
- Lacy R.C. 1984. Predictability, toxicity, and trophic niche breadth in fungus-feeding Drosophilidae (Diptera). *Ecological Entomology*, 9: 43–54.

- Lewinsohn T.M., Loyola, R.D, Prado P.I. 2006. Matrizes, redes e ordenações: a detecção de estrutura em comunidades interativas. *Oecologia Brasiliensis*, 10: 90–104.
- Martin M.M. 1979. Biochemical implications of insect mycophagy. *Biological Reviews*, 54: 1–21.
- Olesen J.M., Bascompte J., Dupont Y.L., Jordano P. 2007. The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 19891–19896.
- Powell J.R. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: the Drosophila model. Oxford University Press, New York.
- Santa-Brígida R., Wartchow F., Medeiros R.S., Gottschalk M.S., Martins M.B. & de Carvalho C.J.B. 2019. Mycophagous Drosophilidae (Diptera) guild and their hosts in the Brazilian Amazon. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 59: 1–10.
- Sturtevant, A.H. 1921. The North American species of *Drosophila*. *Carnegie Institution of Washington Publication*, 301: 1–150.
- Toda M.J., Kimura M.T., Tuno N. 1999. Coexistence mechanisms of mycophagous drosophilids on multispecies fungal hosts: Aggregation and resource partitioning. *Journal of Animal Ecology*, 68: 794–803.
- Thompson J.N. 2014. Natural Selection, Coevolution, and the Web of Life. *American Society of Naturalists*, 183:ivv.
- Throckmorton L.H. 1975. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. Em: King, R.C. (Ed.). *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, USA, pp. 421– 469.

- Valer F.B, Bernardi E., Mendes M.F., Blauth M.L., Gottschalk M.S. 2016. Diversity and associations between Drosophilidae (Diptera) species and Basidiomycetes in a Neotropical forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88: 1–14.
- van Klinken R. D., Walter G.H. 2001. Larval hosts of Australian Drosophilidae (Diptera): A field survey in subtropical and tropical Australia. *Australian Journal of Entomology*, 40: 163–179.
- Vazquez D.P., Chacoff N.P., Cagnolo L. 2009. Evaluating multiple determinants of the structure of plant-animal mutualistic networks. *Ecology*, 90: 2039–2046.
- Vidal M.C., Sendoya S.F., Oliveira P. 2016. Mutualism exploitation: predatory drosophilid larvae sugar-trap ants and jeopardize facultative ant-plant mutualism. *Ecology*, 97: 1650–1657.

Morphological characteristics for oviposition in Drosophilidae (Diptera) determine interactions with macrofungi? *

*Capítulo formatado de acordo com as normas da Biotropica

Morphological characteristics for oviposition in Drosophilidae (Diptera) determine interactions with macrofungi?

Rosângela Santa-Brígida¹, Marlúcia B. Martins², Priscila M. Sanjuan³, Carlos A. Rosa⁴, Felipe Wartchow⁵, Luiz H. Rosa⁴, Claudio J. B. de Carvalho¹, Isabela G. Varassin⁶

¹Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 81531– 980, Brazil

²Departamento de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, Brazil

³Instituto Tecnológico Vale, Desenvolvimento Sustentável. Belém, PA, Brazil.

⁴Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁶Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Correspondence

Rosângela Santa-Brígida, Laboratório de Biodiversidade e Biogeografia de Diptera, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil. E-mail: rosangela_brigida@yahoo.com.br

Abstract

Mycophagous Drosophilidae have interactions with a diverse range of macrofungi for reproduction. In many kinds of interactions between species, such as seed predation and dispersal or pollination, the success of the interaction generally depends on the corresponding morphologies. Here, we studied relationships among the morphological characteristics of drosophilid oviposition in macrofungi during the rainy season in the Caxiuanã National Forest Reserve in the Brazilian Amazonia. We sampled the interactions during a six-month period in the rainy season of the region. We characterized the tenacity of the fungi as factors that could influence drosophilid oviposition in fungal species. The fungi species were grouped at toughness level. We summarized the variation of the morphology related to the presence of protuberant teeth in the Drosophilidae with a principal component analysis (PCA). To evaluate whether the specialization of the species is related to morphology, we compared the specialization index of the species with the first axis of the PCA. To evaluate whether morphology generates subgroups of interactions between the species, we calculated the network modularity and the roles of the species in each module. The specializations of the species were not related to morphology. The analyzed network, comprising 17 Drosophilidae species and 38 fungi species, exhibited a low relation for oviposition in the fungi. The network was slightly modular, with 59% of the species common to four modules. The fungal species Agaricales sp.1, Lentinula raphanica and Rigidoporus biokoensis connected modules, increased the network cohesivity. This study contributes to our understanding of the mycophagous Drosophilidae and the macrofungi in the Brazilian Amazon. Using a great sampling effort during the rainy season in the region, we found a slightly modular network, with the Drosophilidae species sharing all four network modules, reflecting low relationship between morphological characteristics for oviposition on macrofungi.

KEYWORDS

Fruiting bodies, functional roles, modularity, ovipositor structure, toughness.

1 INTRODUCTION

Species interactions among different ecological processes, such as predation, seed dispersal and pollination, generally depend on corresponding morphologies for the success of their relationship (Dehling et al., 2014; Maglianesi et al., 2014). A small number of characteristics is sufficient for predicting the interactions among species (Eköf et al., 2013). Thus, trait correspondence is an important mechanism for the structuring of ecological communities in mutualistic systems (Dehling et al., 2014; Olito & Fox, 2014).

A variety of insects deposit their eggs in macrofungal fruit bodies. Among them, the Diptera order (flies) and the Coleoptera order (beetles) are the most diverse invertebrates found (Bruns, 1984; Yamashita & Hijii, 2003; Epps & Arnold, 2010). Among the *Drosophila* genus, preferences for substrates for oviposition depend on the microbiota found on the sites, but the habitat and the degree of decomposition of the sites are key factors for host choice (Oakeshott et al., 1989; Gander, 2006).

Associations between fungal ephemerality, generality and specificity have been observed in communities of mycophagous Diptera (Lacy, 1984; Hanski, 1989; Toda et al., 1999). Abiotic factors such as temperature and precipitation can also contribute to the interactions between drosophilids and fungi. During wet periods, it was observed that interactions between drosophilids and fungi are more frequent than those during dry periods (Hanski, 1989; Yamashita & Hijii, 2007), while in temperate regions, the species interact less often at low temperatures (Kimura et al., 1978; Charlesworth & Shorrocks, 1980). This condition is due to fungal seasonality: high temperatures and rainfall are favorable to fruit body development (Laganà et al., 2002; Yamashita & Hijii, 2004). In this case, the abundance of fruit bodies increases, and they become softer, facilitating the egg deposition of the flies.

The mycophagous Drosophilidae use a high diversity of macroscopic fungi for reproduction, including members of the orders Agaricales, Auriculariales, Boletales, Cantharellales, Cornales, Phallales, Geastrales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales, Stereales, Tremellales and Xylariales (Shorrocks & Charlesworth, 1980; Lacy, 1984; Hanski, 1989; Courtney et al., 1990; Toda et al., 1990; Burla et al., 1991; Toda et al., 1999; Wertheim et al., 2000; van Klinken & Walter, 2001; Roque et al. 2006; Yamashida & Hijii, 2007; Roháček & Ševčík, 2013; Valer et al., 2016). These fungi present a tenacity level of fruit body rigidness (Figure 1); therefore, the Drosophilidae species that deposit their eggs in these types of fruit bodies must have ovipositor characteristics that allow for the exploration of fruit bodies corresponding to fungus rigidness. In a laboratory study of Agaricus bisporus (J.E. Lange) Imbach (1946), a species with soft tenacity, Rouquette & Daves (2003) observed that there was no association between the ovipositor morphology and the toughness of the fruit bodies. However, despite this evidence, the relation between ovipositor morphology and fruit body toughness with different interacting species pairs has not yet been investigated.

Here, we studied the relation between the morphologic characteristics of Drosophilidae oviposition on macrofungi during the rainy season in the Caxiuanã National Forest Reserve (FLONA of Caxiuanã). First, we selected probable characteristics corresponding to drosophilid ovipositors and fungal species and tested whether these characteristics induced the frequency of interactions between species. We hypothesized that the combination of the morphological characteristics of the ovipositors of the drosophilid species and the tenacity of the macrofungi would influence the choice of fruit bodies by the mycophagous drosophilids for egg deposition. We hypothesized that the most important characteristic in Drosophilidae for oviposition success in tougher fruit bodies is large, strong teeth with sharp tips (Figure 2). This structure permits easy laceration of the fruit bodies, while species with less protuberant teeth use softer fungi for depositing eggs. Therefore, species that have ovipositors with good characteristics for lacerating fungi with tougher textures for depositing eggs interact with fungal species that have more rigid fruit bodies, while species that have ovipositors with non-protuberant teeth interact with fungal species that have softer fruit bodies. To investigate these hypotheses, we used two metrics for studies in the interaction network: specialization of the species (d') and modularity (M). The specialization (d') of the species was used to investigate the selectivity of the interactions of the drosophilids and is associated with the ovipositor attributes. Modularity was used to test the existence of interaction modules in the network, according to the preference for depositing eggs in fungi with differents toughness, as well as to identify the generalist species, hub or modular connectors, and peripheral specielist species.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Sampling design

We sampled in the Caxiuanã National Forest Reserve in the eastern Amazon (1°43'S, 51°27'W) in a portion of the Amazon biome located in the municipalities of Melgaço and Portel in Pará State, Brazil. Six Caxiuanã National Forest Reserve sampling expeditions were performed during the wet season of 2016 (January to June) (Table 1). This area has high rainfall and humidity during the rainy season, from December/January to June/July (Rowland et al., 2018). Data were collected during the rainy season because ecological studies of fungi (Grainger, 1946; Shorrocks & Charlesworth, 1980) emphasized the importance of water availability in the

determination of time and quantity of fruit bodies (abundance) for many fungal species. Because previous work has reported that fungal abundance and richness are related to the richness of mycophagous Drosophilidae (Santa-Brígida et al., 2019), we chose the rainy season to perform our sampling.

In this study, we defined a sample as the whole fruit body of one fungal species. We collected the samples by actively searching for fungal fruiting bodies with the presence of Drosophilidae in existing trails in the Reserve. During each expedition, we collected samples on five or six consecutive days between 8 am and noon (4 h per day), for a total of 20 or 24 h per expedition. The total sampling time was 136 h. We collected potential drosophilid hosts and transported them to the laboratory in paper bags to await adult emergence. In the laboratory, we transferred the fruiting bodies to containers containing previously sterilized sand. To prevent dehydration, we added distilled water to the sand. We maintained the samples between 20 and 25 °C for four or five weeks, and during this period, the emerging insects were aspirated daily and fixed in 99% ethanol.

2.2 Species identification

We identified the flies based on external morphology and, when possible, by male and female terminalia based on the literature (Hendel, 1936; Frota-Pessoa, 1945; Burla, 1956; Wheeler & Takada, 1963; Grimaldi, 1987; 1990; Vilela & Bächli, 1990; 2004; 2007). We deposited the material in the Emílio Goeldi Museum (Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG) Entomological Collection in the city of Belém, Pará, and in the Padre Jesus Santiago Moure Entomological Collection of the Zoology Department, Universidade Federal do Paraná (DZUP) in the city of Curitiba, Paraná State, Brazil.

We identified the fungal species by molecular biology and taxonomy based on morphology. We used classical taxonomy to identify any samples from which we were unable to extract DNA. For identification by molecular biology, we followed the protocol for DNA extraction described by Rosa et al. (2009). The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the universal primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). Amplification of the ITS region was performed as described by Rosa et al. (2009). For identification by classical taxonomy, the fungal fruiting bodies were sampled according to the documentation and preservation methods cited by Fidalgo & Bononi (1989). We performed macroscopic and microscopic analyses, and we analyzed the microstructure using sample sections mounted between a slide and coverslip with a solution of 3% KOH, 1% phloxine and Melzer's reagent (Teixeira, 1995). We identified the species and/or confirmed it based on specialized literature (e.g., Ryvarden & Johansen, 1980; Furtado, 1981; Ryvarden, 1991; 2004). We followed the mycological nomenclature and classification of Kirk et al. (2008).

2.3 Morphological characteristics of the groups

For all species of Drosophilidae and fungi reported in the interaction network, we sampled the morphological characteristics (attributes) of the hosts that are potentially relevant for the establishment of interactions. For the Drosophilidae, we characterized four potentially important characteristics that may determine the capacity of the ovipositors to penetrate into the fruit bodies: height (H) and width (W) of the ovipositor tip, total length (L) and protuberant teeth (PT). The measurements were performed in up to five individuals for each species with more than five females in abundance. Hence, we performed a principal component analysis (PCA) on the four ovipositor traits

of the Drosophilidae species to summarize the overall ovipositor morphology. We then used the first principal component as a descriptor of ovipositor morphology.

We also categorized the fungal species into four groups according to the fruiting body toughness: (A1) coriaceous texture, resistant; (A2) fibrous, less tough and breaks more easily than that of group 1; (A3) soft texture, easy to lacerate; and (A4) soft, fragile (Figure 1) (Table S5). These characteristics were always related to resistance to perforation of the fungus during oviposition. To quantify the level of fungal resistance and the texture, we follow generic or species descriptions in the literature, along with photos and field observations.

2.4 Drosophilidae-fungi interaction network

Interaction frequencies were measured as the total number samples (fruiting bodies) that a Drosophilidae species emerged from the fungal species (Table S2). We used an accumulation curve to estimate the sampling completeness of interactions based on the number of unique interactions (richness) that accumulated with increased sampling effort (Chacoff et al., 2012). The analysis used the rarefaction method, based on samples used for species richness (Gotelli & Colwell, 2010) applied to the interaction network (Devoto et al., 2012).

2.5 Relation between ovipositor morphologies and tenacity of fruiting bodies

To evaluate whether the morphological attributes of the ovipositors determine the species specialization (d'), the scores on axis 1 of the PCA of the morphological attributes of the ovipositors were correlated with the specializations of the Drosophilidae species (d') by Pearson's correlation. The species specialization metric (d') is an index that quantifies how exclusive are the interactions of one species in

relation to partner availability inside the network (Blüthgen et al., 2006). We calculated *d*' using the function *species level ()* in *bipartite* (Dormann et al., 2008) in R (R Core Team, 2016).

Quantitative modularity (Q) was calculated to test the existence of interaction modules in the network, according to the preference for depositing eggs in fungi with differents toughness. The modularity metric characterizes the network structure and quantifies the prevalence of interactions inside the modules in relation to interactions between the modules. Modularity values near zero indicate the absence of modules, while high values indicate a strongly modular network. We estimated the modularity with the function *computeModules()* in the pack *bipartite* (Dormann et al., 2008) with 10⁷ defined phases and the functional pattern option through the QuanBiMod algorithm (Dormann & Strauss, 2014). The significance of these modularity values was evaluated by comparing the observed value after generating the null model. We used the Patefield null model (Patefield, 1981) to estimate the metric significances and the expected network with the function nullmodel() and the method r2dtable in the bipartite pack (Dormann et al., 2008) with 1000 models generated. To classify the species' roles within and between the modules, we follow the model proposed by Guimerá et al. (2005) and Olesen et al. (2007) with the cz-parameter, where c is a measure of the distribution uniformity of the links between the modules and z is a measure of the standardized degree (k) within the modules. We used the null models described in Dormann et al. (2014) to calculate recommended thresholds for participation coefficients and within-module degree for each network level, based on 95% confidence intervals.

To test whether the modules were related to the categories of fungal toughness levels, we use the Mantel correlation test (Legendre & Legendre, 2012) with 10,000

randomizations. The correlation was calculated between a weighted matrix (interactions made in the module) of the drosophilids within their respective modules, generated by the QuantBiMod algorithm, and a weighted matrix (interactions made in the in the categories) of the drosohilids in the morphological categories of Fungi. The weighted matrices were constructed using the total number samples (fruiting bodies) that a Drosophilidae species emerged from the fungal species.

3 RESULTS

In this study, 149 fruit bodies were collected. Drosophilidae emerged from 68 of them (Table S1). We recorded 38 species of fungi used for oviposition by 17 Drosophilidae species in the study site (Table S2), with 1343 emergences registered.

The rarefaction curve showed that the network was well sampled, with the number of interacting species pairs approaching the expected value (observed= 108, expected = 137) (Figure 3).

Drosophilidae specialization (*d'*) was not correlated with overall ovipositor morphology, which was summarized in the first principal component (PC1) (ρ = 0.28, p = 0.27), which retained much of the information provided by the attributes (46%) (Figure S1).

The network showed low modularity (observed = 0.22). The observed value was significantly larger than expected in a random network (P > 0.22), with ten Drosophilidae species (59%) attributed to four modules. However, 41% of the Drosophilidae species were found only in specific modules on the fungal categories (Figure 4); these drosophilids tended to be the species with the lowest number of individuals. The majority of the species had peripheral roles in the network, that is, they tended to establish more specialized interactions, although three stood out as

generalists (Figure 5). The species Agaricales sp. 1, *Lentinula raphanica* and *Rigidoporus biokoensis*, with both high values for *z* and *c*, were highly connected and interacted with many species inside their own modules, being categorized as network hubs (Figure 5). Among all species observed, 94% had the majority of their interactions inside the modules and were categorized as 'peripheral species'. Among them, 43% presented *c* = 0, i.e., any interaction outside their own module.

We found a positive Mantel correlation between the module formation by Drosophilidae and the morphological categorization the fungi (r = 0.32, P = 0.001).

4 DISCUSSION

Our results showed that few species of Drosophilidae do have morphologically corresponding fungal species for oviposition. Consistent with this result, the modularity and the Mantel correlation highlighted selectively associated interactions with morphological characteristics for oviposition.

The lack of exclusive modules indicates a high degree of generality with interactions among modules that connect generalist species. The fungal species Agaricales sp.1, *Lentinula raphanica* and *Rigidoporus biokoensis* connected modules, thereby increasing the network cohesivity. *Lentinula raphanica* was the second species that most interacted in the network and the third in abundance, with 4 samples used by Drosophilidae. *Rigidoporus biokoensis* was the second most abundant species and with five records of interaction with Drosophilidae. Therefore, the species that connect the modules were, in general, the most abundant species.

The lack of few specialized relation with the morphological attributes of Drosophilidae is probably due to the fact that inside each module, the interactions overlap in the same frequency; there are not exclusive modules for one or few species
pairs. Species interacted with few species of fungi, and these interactions were more common with more abundant and frequent fungi, namely, *Favolus teinuculus*, *Rigidoporus biokoensis* and *Lentinula raphanica*. We observed that *F. teinuculus* was recorded in four of the six sampling expeditions carried out and *Rigidoporus biokoensis* and *Lentinula raphanica* recorded in three (Table S1). Consequently, these were the most abundant species in the network, interacting with the largest number of Drosophilidae species. In these fungi, individuals are characterized by the development of numerous fruiting bodies. And it stands out that *F. teinuculus* has honeycomb-shaped pores in its lower structure, and *Lentinula raphanica* has lamellae in the lower part of the fruiting body. These morphological characteristics that facilitate the laying of eggs (Rouquette & Davis 2003), combined with abundance, frequency and biomass (Vale et al. 2016), possibly explain the intensity of interaction for oviposition observed. In fact, abundance plays a central role in many kinds of network interactions (Vázquez et al., 2007; Verdú & Valiente-Banuet, 2008).

Our results differ from those found by Rouquette & Davis (2003) regarding *Drosophila* species that oviposit in fruit bodies. They observed that the species did not have a prefer for ovipositing in a specific part of the fungus. Different factors can contribute to the lack of correspondence between the ovipositor morphology and the fruit body tenacity during the interaction. The flies might not insert their eggs in the fruit bodies, but the females might deposit their eggs on the fruit bodies. The Drosophilidae species that have not adapted their ovipositors to deposit eggs in tougher fungi benefit from excavating the substrates with their ovipositors to deposit their eggs, as observed in the genus *Drosophila* (Rouquette & Davis, 2003). Thus, low relationship observed here, we conclude that the tenacity of the fungus is not a limiting factor for interactions

between species during oviposition. The Drosophilidae species explore as many fungal species as possible to have reproductive success.

Although the rarefaction curve indicates that the observed interactions were close to expected, low emergence of Drosophilidae individuals might have occurred. For example, the larval stress of some species has interrupted their development cycle when they suffer abiotic or biotic disturbances, prejudicing their development to the adult phase (Grimaldi & Jaenike, 1984; Worthen et al., 1995). A recent study registered 55 species that visit fruit bodies in the study area (Santa-Brígida et al., 2019). The mycophagous genera *Zygothrica* and *Hirtodrosophila* were well represented, with 26 and 19 species, respectively. Here, these genera had low representation. Most likely, many collected insect samples did not emerge as adults due to stresses from being withdrawn from their natural habitats. Valer et al. (2016) also reported low emergence of *Zygothrica* and *Hirtodrosophila*, with eight for *Hirtodrosophila* and three for *Zygothrica*. On the other hand, the low representation of *Zygothrica* species is because some species use the fungi only for mating (Parsons, 1977; Grimaldi, 1987) and use other substrates for depositing their eggs.

Therefore, our study contributes to the understanding of the interactions of mycophagous Drosophilidae with macrofungi in the Brazilian Amazon. After a great sampling effort, we found a somewhat modular network, with the Drosophilidae species sharing all four network modules, reflecting generalization in the selection of fungal species for oviposition. Drosophilidae species preferred fewer rigid fungi. This conclusion is strongly supported by the number of interactions that A3 and A4 modules had on the network.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Cleumar Lopez and Robson Carvalho for assistance during the field work; Camila Silveira Souza for his help with the analysis; Ana Raquel dos Santos, Mariana Costa and Vivian Gonçalves for assistance in the laboratory; Lucas Gomes for his help with the figures; and Marcos de S. Fialho for suggestions and comments that helped us to improve this manuscript. Thanks are due to the laboratory groups of Dr. Carlos A. Rosa and Dr. Luiz H. Rosa (Universidade Federal de Minas Gerais) and Dr. Marlúcia B. Martins (Museu Paraense Emílio Goeldi). Scholarships, permission to collect specimens and logistical support were provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (RSB, #40001016005P5; CJBC, #309873/2016-9; IGV, #313801/2017-7), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (permit #52267-1), Programa de Pos-graduação de Entomologia da Universidade Federal do Paraná, Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (#441224/2016–4), Estação Científica Ferreira Penna and Museu Paraense Emílio Goeldi. Wiley Editing Services revised English writing.

REFERENCES

- Blüthgen, N., Menzel, F., & Blüthgen, N. (2006). Measuring specialization in species interaction networks. *BMC Ecology*, 6, 1015012.
- Bruns, T. D. (1984). Insect mycophagy in the Boletales: Fungivore diversity and the mushroom habitat. *In* Wheeler Q. & Blackwell M. (eds): Fungus-Insect Relationships, Perspectives in Ecology and Evolution, pp. 91–129. Columbia University Press, New York, New York.

- Burla, H. (1956). Die Drosophilidengattung Zygothrica und ihre beziehung zur Drosophila–untergattung Hirtodrosophila. Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum, 32, 189–321
- Burla, H., Bächli, G., & Huber, H. (1991). Drosophila reared from the stinkhorn, Phallus impudicus, near Zurich, Switzerland. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 29, 97–107.
- Costa, R. S. B. (2015) *Estrutura da interação dos Drosophilidae micófagos na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil.* MSc Dissertation. 94 pp., Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- Chacoff, N. P., Vázquez, D. P., Lomáscolo, S. B., Stevani, E. L., Dorado, J., & Padrón,
 B. (2012). Evaluating sampling completeness in a desert plant-pollinator network. *Journal of Animal Ecology*, 81, 190–200.
- Charlesworth, P., & Shorrocks, B. (1980). The reproductive biology and diapause of the British fungal-breeding *Drosophila*, *Ecological Entomology*, 5, 315–326.
- Courtney, S. P., Kibota, T. T., & Singleton, T. A. (1990). Ecology of mushroom-feeding Drosophilidae. *Advances in Ecological Research*, 20, 225–274.
- Dehling, D. M., Töpfer, T., Schaefer, H. M., Jordano, P., Böhning-Gaese, K., & Schleuning, M. (2014). Functional relationships beyond species richness patterns: trait matching in plant–bird mutualisms across scales. *Global Ecology and Biogeography*, 23, 1085–1093. https://doi:10.1111/geb.12193
- Dehling, D. M., Jordano, P., Schaefer, H. M., Böhning-Gaese, K., & Schleuning, M. (2016). Morphology predicts species' functional roles and their degree of specialization in plant–frugivore interactions. *Proceedings Royal Socciety B*, 283, 20152444.http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.2444

- Devoto, M., Bailey, Craze, P., & Memmott, J. (2012). Understanding and planning ecological restoration of plant-pollinator networks. *Ecology Letter*, 15, 319–328.
- Dormann, C. F., Gruber, B., & Fruend, J. (2008). Introducing the bipartite package: analyzing ecological networks. *R News*,8, 8–11.
- Dormann, C. F., & Strauss, R. (2014). A method for detecting modules in quantitative bipartite networks. *Methods in Ecology and Evolution*, *5*, 90–98.
- Epps, M. J., & Arnold, A. E. (2010). Diversity, abundance and community network structure in sporocarp-associated beetle communities of the central Appalachian Mountains. *Mycologia*, 102, 785–50802.
- Fidalgo, O., & Bononi, V. L. R. (1989). Guia de coleta, preservação e herborização de material botânico. Manual no. 4, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.
- Frota-Pessoa, O. (1945). Sobre o subgênero "*Hirtodrosophila*", com descrição de uma nova espécie (Diptera, Drosophilidae, *Drosophila*). *Revista Brasileira de Biologia*, 5, 469–483.
- Furtado, J. S. (1981). Taxonomy of *Amauroderma* (Basidiomycetes, Polyporaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden,* 34, 1–109.
- Ganter, P. F. (2006). Yeast and Invertebrate Associations. *In* Rosa, C. & Péter G. (Eds). The Yeast Handbook. p 303–370. Springer Verlag, New York, New York
- Gotelli, N. J. & Colwell, R. K. (2010). Estimating species richness. *In* Magurran, A. E.
 & McGill, B. J. (Eds). Biological diversity: Frontiers in measurement and assessment, pp. 39–54. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Guimerà, R. & Amaral, L. A. N. (2005). Cartography of complex networks: modules and universal roles. Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment. http://dx.doi. org/10.1088/1742-5468/2005/02/P02001

- Grainger, J. (1946). Ecology of the larval fungi. *Transactions of the British Mycological Socciety*, 29, 52-63.
- Grimaldi, D.A. (1987). Phylogenetics and taxonomy of Zygothrica (Diptera: Drosophilidae). Bulletin of the American Museum of Natural History, 186, 103– 268.
- Grimaldi, D. A. (1990). A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 197, 1–139.
- Grimaldi, D. & Jaenike, J. (1984). Competition in natural populations of mycophagous Drosophila. *Ecology*, 64, 1113–1120.
- Hendel, F. (1936). Ergebnisse einer zoologischen Sammelreise nach Brazilien insbesondere in das Amazonasgebiet, ausgefuhrt von Dr. H. Zerny. X. Teil. Diptera. Muscidae acalyptratae (excl. Chloropidae). Annalen des Kaiserlichkoniglichen Naturhistorischen, 47, 61–106.
- Hanski, I. (1989). Fungivory: fungi, insects and ecology. *In:* Collins, N.M. Hammond,
 P.M. Webber, J.B. (Eds.). *Insect-Fungus Interaction*. Wilding. *Insect-Fungus Interaction*. Academic Press, London, pp. 25–68.
- Kimura, M. T., Beppu, K., Ichijo, N. & Toda, M. J. (1978). Bionomics of Drosophilidae (Diptera) in Hokkaido. II. *Drosophila testacea. Kontyû*, 46, 585–595.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; David, J. C.; Minter, D. W. & Stalpers, J. A. 2008. *Ainsworth* & *Bisby's Dictionary of the Fungi.* 8th ed. CAB International, Wallingford.
- Lacy, R. C. (1984). Ecological and genetic responses to mycophagy in Drosophilidae (Diptera). *In*: Wheeler, Q. D., Blackwell, M. (Eds). *Fungus-insect relationships: perspectives in ecology and evolution*. Columbia Univ Press, New York, pp. 286– 301.

- Laganà, A., Angiolini, C., Loppi, S., Salerni, E., Perini, C., Barluzzi, C. & De Dominicis,
 V. (2002). Periodicity, fluctuations and successions of macrofungi in fir forest (*Abies alba* Miller) in Tuscany, Italy. *Forest Ecology and Management*, 169, 187– 202.
- Legendre, P., & Legendre, L. (2012). *Numerical ecology. Developments in Environmental Modelling*, 3rd ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 990 p.
- Maglianesi, M. A., Blüthgen, N., Böhning-Gaese, K. & Schleuning, M. (2014). Morphological traits determine specialization and resource use in plant– hummingbird networks in the Neotropics. *Ecology*, 95, 3325–3334. https://doi:10.1890/13-2261.1
- Oakeshott, J. G., Vacek, D.C. & Anderson, P. R. (1989). Effects of microbial floras on the distributions of 5 domestic Drosophila species across fruit resources. *Oecologia*, 78, 533–541.
- Olesen, J. M., Bascompte J, Dupont, Y. L., Jordano, P. (2007). The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19891–19896.
- Olito, C. & Fox, J. W. (2014). Species traits and abundances predict metrics of plant pollinator network structure, but not pairwise interactions. *Biotropica*, 000, 001–009.
- Parsons, P. (1977). Lek behaviour in *Drosophila (Hirtodrosophila) polypori* Malloch an Australian rainforest species. *Evolution,* 31, 223–225.
- Patefield, W. M. (1981). Algorithm AS 159: An efficient method of generating random
 R x C tables with given row and column totals. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 30, 91–97.

- R Core Team, (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. URL. https//www.Rproject.org/https://doi.org/10. 1016/B978-0-12-381308-4.00001-7.
- Roque, F., Figueiredo, R. & Tidon, R. (2006). Nine new records of drosophilids in the Brazilian savanna. *Drosophila Information Service*, 89, 14-17.
- Rosa, L. H., Vaz, A. B. M., Caligiorne, R. B., Campolina, S. & Rosa, C. A. (2009).
 Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia* Antarctica
 Desv. (Poaceae). *Polar Biology*, 32, 161–167.
- Roháček, J. & Ševčík, J. (2013). Diptera associated with sporocarps of *Meripilus giganteus* in an urban habitat. *Central European Journal of Biology*, 8, 143–167. https://doi.org/10.2478/s11535-013-0119-z
- Rouquette, J. & Davis, A.J. (2003). Drosophila species (Diptera: Drosophilidae) oviposition patterns on fungi: The effect of allospecifics, substrate toughness, ovipositor structure and degree of specialization. *European Journal of Entomology*, 100, 351–355. <u>https://doi.org/10.14411/eje.2003.056</u>
- Rowland, L., da Costa, A. C. L., Oliveira, A. A. R., Almeida, S. S., Ferreira, L. V., Malhi,
 Y., Metcalfe, D. B., Mencuccini, M., Grace, J. & Meir, P. (2018). Shock and stabilisation following long-term drought in tropical forest from 15 years of litterfall dynamics. *Journal of Ecology*, 106, 1673–1682. <u>https://doi.org/10.1111/1365-2745.12931</u>
- Ryvarden, L. (1991). *Genera of Polypores: nomenclature and taxonomy. Synopsis Fungorum,* 5, 1–373.
- Ryvarden, L. (2004). Neotropical Polypores. Part 1. Synopsis Fungorum, 19, 1–227.
- Ryvarden, L. & Johansen, I. (1980). A preliminary Polypore Flora of East Africa. Fungiflora, Oslo.

- Santa-Brígida, R., Wartchow, F., Medeiros, P. S., Gottschalk, M. S., Martins, M. B. & de Carvalho, C. J. B. (2019). Mycophagous Drosophilidae (Diptera) guild and their hosts in the Brazilian Amazon. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 59, 1–10.
- Shorrocks, B. & Charlesworth, P. (1980). The distribution and abundance of the British fungal- breeding *Drosophila*. *Ecological Entomology*, 5, 61–78.
- Teixeira, A. R. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual no. 6, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.
- Toda, M. J., Kimura, M. T. & Tuno, N. (1999). Coexistence mechanisms of mycophagous drosophilids on multispecies fungal hosts: Aggregation and resource partitioning. *Journal of Tropical Ecology*, 68, 794–803.
- Tuno, N. (1999). Insect feeding on spores of a bracket fungus, Elfvingia applanata (Pers.) Karst. (Ganodermataceae, Aphyllophorales). *Ecological Research*, 14, 97–103.
- Valer, F. B, Bernardi, E., Mendes, M. F., Blauth, M. L. & Gottschalk, M. S. (2016). Diversity and associations between Drosophilidae (Diptera) species and Basidiomycetes in a Neotropical forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 1–14.
- van Klinken, R. D. & Walter, G.H. (2001). Larval hosts of Australian Drosophilidae (Diptera): A field survey in subtropical and tropical Australia. *Australian Journal of Entomology*, 40, 163–179.
- Verdú, M. & Valiente-Banuet, A. (2011). The relative contribution of abundance and phylogeny to the structure of plant facilitation networks. *Oikos*, 120, 1351–1356.
- Vázquez, D. P., Chacoff, N. P. & Cagnolo, L. (2009) Evaluating multiple determinants of the structure of plant-animal mutualistic networks. *Ecology*, 90, 2039–2046.

- Vilela, C. R. & Bächli, G. (1990). Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft*,63, 1–332.
- Vilela, C.R. & Bächli, G. (2004). On the identities of nine Neotropical species of *Hirtodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft*, 77, 161–195.
- Vilela, C. R. & Bächli, G. (2007). Revision of the Neotropical genus Paraliodrosophila (Diptera, Drosophilidae). Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft, 80, 291–317.
- Wertheim, B., Sevenster, J.G., Eijs, I.E.M. & Van Alphen, J.J.M. (2000). Species diversity in a mycophagous insect community: The case of spatial aggregation vs. resource partitioning. *Journal of Tropical Ecology*, 69, 335–351. https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2000.00396.x
- Wheeler, M. R. & Takada, H. (1963). A Revision of the American Species of Mycodrosphila (Diptera; Drosophilidae). Annals of the Entomological Society of America, 36, 391–399.
- Worthen, W.B., Bloodworth, B.R., Hobbs, M.B. (1995). Habitat variability in the effects of predation and microclimate on mycophagous fly communities. *Ecography*, 18, 248–258.
- White, T.J., Bruns, T.D. & Lee, S.B. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (eds): *PCR Protocols:* A Guide to Methods and Applications, pp. 315–322. vol. 18. Academic Press, San Diego, CA, USA.

- Yamashita, S. & Hijii, N. (2003). Effects of mushroom size on the structure of a mycophagous arthropod community: Comparison between infracommunities with different types of resource utilization. *Ecological Research*, 18, 131–143.
- Yamashita, S. & Hijii, N. (2004). Relationships between seasonal appearance and longevity of fruitbodies of Agaricales and meteorological factors in a Japanese red pine forest. *Journal of Forest Research*, 9, 165–171.
- Yamashita, S. & Hijii, N. (2007). The role of fungal taxa and developmental stage of mushrooms in determining the composition of the mycophagous insect community in a Japanese forest. *European Journal of Entomology*, 104, 225– 233.

Figures



FIGURE 1. Species of fungi registered in the FLONA of Caxiuanã categorized according to the tenacity of their fruiting bodies. A1 (A, B and C) - resistant coriaceous textured fruiting bodies; A2 (D, E and F) - fibrous, texture less resistant than that of group 1; A3 (G, H and I) - soft texture, easy to tear; and A4 (J, K and L) - soft, brittle. A- *Trametes* sp. 2, B- *Rigidoporus biokoensis*, C- *Trametes* sp.1, D- *Auricularia polytricha*, E- *Favolus tenuiculus*, F- *Panus* sp.1, G- *Pseudofavolus cucullatus*, H- *Lentinula raphanica*, I- *Polyporus septosporus*, J- *Marasmielus volvatus*, K- *Hydropus* sp. 2, L- *Lactocollybia* sp.



FIGURE 2. Diversity of ovipositors morphology species of Drosophilidae recorded in
FLONA of Caxiuanã. A- *Hirtodrosophila morgani*, B- *H.* (SB13010), C- *Zygothrica virgatinigra*, D- *Zigothrica virgatalba*, E- *Hirtodrosophila* (SB13011), F- *P. antennata*,
G- *Drosophila canalinea*, H- *D.* (SB13009), I- *Micodrosophila elegans*, J- *M. pseudoprojectans*, K- *Leucophenga* (SB16009), L- *Hirtodrosophila* (SB14002).



FIGURE 3. Sampling completeness measured from rarefaction of unique interactions and interaction events for the Drosophilidae-Fungi interaction network in FLONA of Caxiuanã, Brazil. Rarefaction curve showing Chao 1 estimate of asymptotic richness of interactions (dashed black lines) with 95% confidence intervals (dashed gray lines).



FIGURE 4. Modules of the Drosophilidae according to affinity with the fungal categories that use to oviposit. Ecological network illustrating the four modules which represent fungal categories (A1, A2, A3 and A4) used by species drosophilid. The vertices of the network (Drosophilidae) are presented in colored circles named with code (Table S3) of the species. Colors represent the number of modules assigned to the species. Purple indicates species that occur in four modules; blue color, species occurring in three modules; green color, species occurring in two modules; and yellow, species occur in only one module. The thickness of the lines represents the

interaction/emergence frequency of Drosophilidae in each module. Species names are provided in Table S3 in Supplementary information.



FIGURE 5. Distribution of Drosophilidae and fungi species according to the role in the network. Each point represents a species. Black dashed lines indicate the threshold values for the network data.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Figure S1. Code: Drosophila SB13009 (D.SB13009), Hirtodrosophila SB13010 (H.SB13010), Hirtodrosophila SB13011 (H.SB13011), Hirtodrosophila SB13011 (H.SB14002), Hirtodrosophila SB14007 (H.SB14007), Hirtodrosophila SB16007 (H.SB16007), Hirtodrosophila morgani (H.morgani), Hirtodrosophila subflavohalterata (H.subflavohalterata), Hirtodrosophila subgilva (H.subgilva), Leucophenga SB16009 (L.SB16009), Mycodrosophila neoprojectans (M.neoprojectans), Mycodrosophila projectans (M.projectans), Mycodrosophila pseudoprojectans (M.pseudoprojectans), Paraliodrosophila antennata (P.antennata), Zygothrica poeyi (Z.poeyi), Zygothrica subcandens (Z.subcandens), Zygothrica virgatalba (Z.virgatalba). Code of the morphological attributes of the ovipositors: height (H), width (W), total length (L) and the presence of apical protuberant teeth (PT).



Table S1

Table S1. List of 22 fungi species (68 individuals),collected in six months (January -Jan, February - Feb, March - Mar, April - Apr, May – May and June – Jun), followed by the number of fruiting bodies (No), total number of interaction (degree k), and richness and abundance of Drosophilidae species present in each fungi species.

	Months	Ν	Degree	Drosophilidae	Drosophilidae
Species	collected	0	(k)	abundance	richness
Agaricales sp.1	Mar and Jan	3	4	12	4
Agaricales sp.2	May	1	2	14	2
Agaricales sp.3	Jan	1	6	67	6
Agaricales sp.4	May	1	1	2	1
Auricularia polytricha	Feb and Mar	2	2	27	2
<i>Auricularia</i> sp.2	Feb	1	2	21	2
	Feb, Mar, Apr	1			
Favolus tenuiculus	and May	0	8	339	9
Gerronema sp.1	May	1	3	4	2
Gerronema sp.2	Mar	1	5	17	5
Gerronema sp.3	Jan	1	4	128	5
<i>Gymnopus</i> sp.	Jan	1	1	2	1
<i>Gymnopus</i> sp.1	Jan	1	2	27	2
<i>Gymnopus</i> sp.3	Apr	1	5	73	5
<i>Gymnopus</i> sp.4	Apr	1	2	8	2
<i>Hemimycena</i> sp.1	Mar	1	2	3	2
Hydropus aff.					
caespitosus	Apr	1	2	2	2
<i>Hydropus</i> sp.1	Mar	1	1	2	1
Hydropus sp.2	Apr and May	2	5	89	5
<i>Hydropus</i> sp.3	Apr	1	1	9	1

Lactocollybia cf.					
angiospermarum	May	1	2	13	2
<i>Lactocollybia</i> sp.	Jun	1	4	59	4
	Mar, May and				
Lentinularaphanica	Jun	4	8	166	8
Marasmiellusaff.					
volvatus	Mar	1	2	2	2
Marasmiellus volvatus	Jan and Apr	2	4	21	4
<i>Marasmius</i> sp.3	Jun	1	1	1	1
Panus sp.1	Jun	2	1	8	1
Perenniporia stipitata	Apr	1	2	3	2
Polyporus guianensis	Jan and May	2	2	3	2
Polyporus sp.1	May	3	5	99	5
Polyporus sp.2	Fev	1	1	1	1
Pseudofavolus					
cucullatus	Apr	1	1	1	1
Rigidoporus biokoensis	Jan, Feb and Apr	6	5	36	5
Rigidoporus lineatus	Jan and Apr	3	2	10	2
Rigidoporus microporus	Jan	1	1	1	
<i>Rigidoporus</i> sp.1	Fev	1	1	2	
Trametes lactnea	Mar	1	3	5	
Trametes membranacea	Mar	1	1	2	1
Tricholomopsis aurea	Jan and May	3	3	64	3

S2	
Φ	
0	
g	

Table S2. List of 17 Drosophilidae species, their interactions with each fungi species. Code of the species of fungi present in the columns: (1) Aga_sp1 (Agaricales sp.1); (2) Aga_sp2 (Agaricales sp.1); (3) Aga_sp3 (Agaricales sp.3); (4) Aga_sp4 (Agaricales sp.4), (5) Aur_pol (Auricularia polytricha); (6) Aur_sp2 (Auricularia sp.2); (7) Fav_ten (Favolus tenuiculus); (8) Ger_sp1 (Gerronema sp.1); (9) Ger_sp2 (Gerronema sp.2); (10) Ger_sp3 (Gerronema sp.3); (11) Gym_sp (Gymnopus sp.); (12) Gym_sp1 (Gymnopus sp.1); (13) Gym_sp3 (*Gymnopus* sp.3); (14) Gym_sp4 (*Gymnopus* sp.4); (15) Hem_sp1 (*Hemimycena* sp.1); (16) Hyd_cae (Hydropus aff. caespitosus); (17) Hyd_sp1 (Hydropus sp.1); (18) Hyd_sp2 (Hydropus sp.2); (19) Hyd_sp3 (Hydropus sp.3); (20) (Panus sp.1); (27) Per_sti (Perenniporia stipitata); (28) Pol_gui (Polyporus guianensis); (29) Poly_sp1 (Polyporus sp.1); (30) (Rigidoporus lineatus); (34) Rig_mic (Rigidoporus microporus); (35) Rig_sp1 (Rigidoporus sp.1); (36) Tra_lac (Trametes lactnea); Lac_cf_ang (Lactocollybia cf. angiospermarum); (21) Lac_sp (Lactocollybia sp.); (22) Len_rap (Lentinula raphanica); (23) Poly_sp2 (Polyporus sp.2); (31) Pse_cuc (Pseudofavolus cucullatus); (32) Rig_bio (Rigidoporus biokoensis); (33) Rig_lin Mas_aff_vol (Marasmiellus aff. volvatus); (24) Mar_vol (Marasmiellus volvatus); (25) Mas_sp3 (Marasmius sp.3); (26) Pan_sp1 (37) Tra_mem (*Trametes membranacea*); (38) Tri_aur (*Tricholomopsis aurea*)

	Code	Dro_sp1	Hir_sp1
	Drosophilidae/Fungi	Drosophila (SB13009)	Hirtodrosophila (SB13010)
	123456789	00100100	1000000000
.	0	0	0
.	~ · ·	0	0
-	3	1	0
_	4	_	0
-	5	0	0
~	9	0	~
~	2	0	0
-	œ	~	0
.	6	0	0
2	0	0	0
2		~	0
2	8	, N	-
2	м М		0
2	22	0	0
2	9	0	0
2	7	0	0
2	ø	0	0
2	6	0	0
ო	0	0	0
ო	~	0	0
ო	2	~	0
ო	e	0	0
ო	4	0	0
с С	ы	0	0
ო 	~	0	0
ო	œ	0	0

																		1
-	0	0	0	0		0	0	0		с	0		0	~	0	0	0	
0	0	~	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		-	-		0	~	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		0	~		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		~	0		0	0	0	0	0	
0	0	~	0	0		0	0	0		0	2		0	0	0	0	0	
~	2	~	0	0		0	0	0		0	с		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		0	-		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		. 	0		0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0		0	0	0		2			с	2	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0			~		0	0	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		0	~		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
_	0	0	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
~	-	-	-	-		0	-	-		-	0		-	0	-	-	0	
2	0	0	0	0		~	0	0		0	0		0	~	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0		0	~	0		З	~		~	З	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		0	-		0	~	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		-	0		0	0	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0		0	0	0		~	0		0	~	0	~	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		-	0		0	0	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
0	0		0	0		0	0	0			0		0	0	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
~	0	0	0	0		~	0	0		~	0		~	0	0	0	0	
-	0	0	0	0		0	0	0		-	0		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0		0	0	0		-	0		0	0	0	0	0	
_	0	0	0	0		_	0	0		`	0		0	0	0	_	0	
~	0	0	0	0		-	0	0		~	0		0	0	0	~	0	
-	0	0	0	0		0	0	0		-	0		0	-	0	0	0	
9	0	0	0	0		~	0	0		2	0		ŝ	2	0		с	
0	0	0	-	0		~	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
0	0	0	0	-		0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	
	0	0	0	0		-	0	0		-	0		0	-	-	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	0		~	0		0	0	0	0	0	
~	0	0	0	0		0	0	~		2	0		0	0	0	0	0	
Hirtodrosophila (SB13011)	Hirtodrosophila (SB14002)	Hirtodrosophila (SB14007)	Hirtodrosophila (SB16007)	Hirtodrosophila morgani	Hirtodrosophila	subflavohalterata	Hirtodrosophila subgilva	Leucophenga (SB16009)	Mycodrosophila	neoprojectans	Mycodrosophila projectans	Mycodrosophila	pseudoprojectans	Paraliodrosophila antennata	Zygothrica aff. subcandens	Zygothrica poeyi	Zygothrica virgatalba	
Hir_sp2	Hir_sp3	Hir_sp4	Hir_sp5	Hir_morg		Hir_sub	Hir_subg	Leu_sp1		Myc_neo	Myc_pro		Myc_pse	Par_ant	Zyg_sub	Zyg_poe	Zyg_vir	

Table S3

Table S3. List of 55 speccies of Drosophilidae and fungi, followed by values of cz, its role in the interaction network Drosophilidae-

Fungi.

)					
Taxon	Code	Species	\$c	\$z	Species role
Fungi	Aga_sp1	Agaricales sp.1	0.02243426	0.70710678	Module hubs
Fungi	Aga_sp2	Agaricales sp.2	0.09291151	-0.25688810	Peripheral
Fungi	Aga_sp3	Agaricales sp.3	0.56898919	0.70322750	Peripheral
Fungi	Aga_sp4	Agaricales sp.4	0.00000000	-0.73276532	Peripheral
Fungi	Aur_pol	Auricularia polytricha	0.00000000	NA	Peripheral
Fungi	Aur_sp2	<i>Auricularia</i> sp.2	0.04345679	NA	Peripheral
Fungi	Fav_ten	Favolus tenuiculus	0.35975118	0.70710678	Peripheral
Fungi	Ger_sp1	<i>Gerronema</i> sp.1	0.29776834	-0.34838250	Peripheral
Fungi	Ger_sp2	<i>Gerronema</i> sp.2	0.29404800	-0.27549196	Peripheral
Fungi	Ger_sp3	<i>Gerronema</i> sp.3	0.60624443	0.98724506	Peripheral
Fungi	Gym_sp	<i>Gymnopus</i> sp.	0.00000000	-0.35753194	Peripheral
Fungi	Gym_sp1	Gymnopus sp.1	0.14216908	-0.15624427	Peripheral

Fungi	Gym_sp3	Gymnopus sp.3	0.39616968	1.14596371	Connector
Fungi	Gym_sp4	<i>Gymnopus</i> sp.4	0.49441967	-0.67823395	Peripheral
Fungi	Hem_sp1	Hemimycena sp.1	0.09867194	-0.35753194	Peripheral
Fungi	Hyd_cae	Hydropus aff. caespitosus	0.03534209	-0.70710678	Peripheral
Fungi	Hyd_sp1	Hydropus sp.1	0.00000000	-0.35753194	Peripheral
Fungi	Hyd_sp2	Hydropus sp.2	0.28519040	1.76886141	Peripheral
Fungi	Hyd_sp3	Hydropus sp.3	0.00000000	-0.63733542	Peripheral
Fungi	Lac_cf_ang	Lactocollybia cf. angiospermarum	0.49226777	-0.66460111	Peripheral
Fungi	Lac_sp	Lactocollybia sp.	0.45859707	0.02536498	Peripheral
Fungi	Len_rah	Lentinula raphanica	0.27460111	3.29431426	Module hubs
Fungi	Mar_aff_vol	Marasmiellusaff. volvatus	0.33453927	-0.69576368	Peripheral
Fungi	Mar_vol	Marasmiellus volvatus	0.63672788	-0.45020003	Peripheral
Fungi	Mar_sp3	<i>Marasmius</i> sp.3	0.00000000	-0.74639817	Peripheral
Fungi	Pan_sp1	Panus sp.1	0.00000000	-0.30263530	Peripheral
Fungi	Per_sti	Perenniporia stipitata	0.10088921	-0.58339460	Peripheral
Fungi	Pol_gui	Polyporus guianensis	0.14342286	-0.58339460	Peripheral

Fungi	Poly_sp1	Polyporus sp.1	0.60810454	-0.70710678	Peripheral
Fungi	Poly_sp2	Polyporus sp.2	0.0000000	-0.36668137	Peripheral
Fungi	Pse_cuc	Pseudofavolus cucullatus	0.0000000.0	-0.63412457	Peripheral
Fungi	Rig_bio	Rigidoporus biokoensis	0.10365718	2.3589434	Module hubs
Fungi	Rig_lin	Rigidoporus lineatus	0.00000000	0.07609495	Peripheral
Fungi	Rig_mic	Rigidoporus microporus	0.0000000	-0.36668137	Peripheral
Fungi	Rig_sp1	Rigidoporus sp.1	0.0000000	-0.58339460	Peripheral
Fungi	Tra_lac	Trametes lactnea	0.49948871	-0.30324526	Connector
Fungi	Tra_mem	Trametes membranacea	0.00000000	-0.07609495	Peripheral
Fungi	Tri_aur	Tricholomopsis aurea	0.15628533	0.15453168	Peripheral
Drosophilidae	Dro_sp1	Drosophila (SB13009)	0.5947070	NA	Peripheral
Drosophilidae	Hir_sp1	Hirtodrosophila (SB13010)	0.0137058	0.7071068	Peripheral
Drosophilidae	Hir_sp2	Hirtodrosophila (SB13011)	0.6069172	0.7071068	Peripheral
Drosophilidae	Hir_sp3	Hirtodrosophila (SB14002)	0.000000	-0.6961134	Peripheral
Drosophilidae	Hir_sp5	Hirtodrosophila (SB14007)	0.3429537	-0.4497964	Peripheral
Drosophilidae	Hir_sp7	Hirtodrosophila (SB16007)	0.000000	NA	Peripheral

Peripheral	-0.5582156	0.000000	Zygothrica virgatalba	Zyg_vir	Drosophilidae
Peripheral	-0.7071068	0.4416790	Zygothrica poeyi	Zyg_poe	Drosophilidae
Peripheral	-0.5962758	0.0000000	Zygothrica aff. subcandens	Zyg_sub	Drosophilidae
Connector	-0.4933219	0.6034229	Paraliodrosophila antennata	Par_ant	Drosophilidae
Peripheral	1.1544914	0.2144965	Mycodrosophila pseudoprojectans	Myc_pse	Drosophilidae
Peripheral	1.1459098	0.1125867	Mycodrosophila projectans	Myc_pro	Drosophilidae
Peripheral	1.1508043	0.2631421	Mycodrosophila neoprojectans	Myc_neo	Drosophilidae
Peripheral	-0.7071068	0.0000000	Leucophenga (SB16009)	Leu_sp1	Drosophilidae
Peripheral	-0.6574824	0.0000000	Hirtodrosophila subgilva	Hir_subg	Drosophilidae
Peripheral	0.7071068	0.5749672	Hirtodrosophila subflavohalterata	Hir_sub	Drosophilidae
Peripheral	-0.7071068	0.000000	Hirtodrosophila morgani	Hir_morg	Drosophilidae

4
S
Φ
Ō
a

Table S4. List of 17 Drosophilidae species, followed by code in module and fungal category used for oviposition. A1, A2, A3, and A4 represent modules 1, 2, 3 e 4, respectively. A1, A2, A3, and A4 indicate the fungal category in toughness level.

Drosophilidae species	Modules	Fungi Category
Drosophila (SB13009)	A4	A1, A2, A3 and A4
Hirtodrosophila (SB13010)	A4	A3 and A4
Hirtodrosophila (SB13011)	A4	A1, A2, A3 and A4
Hirtodrosophila (SB14002)	A1	A1
Hirtodrosophila (SB14007)	A4	A1, A2 and A4
Hirtodrosophila (SB16007)	A2	A2
Hirtodrosophila morgani	A2	A2
Hirtodrosophila subflavohalterata	A2	A2, A3 and A4
Hirtodrosophila subgilva	A3	A3
Leucophenga (SB16009)	A4	A4
Mycodrosophila neoprojectans	A3	A1, A2, A3 and A4
Mycodrosophila projectans	A1	A1, A2, A3 and A4

Mycodrosophila pseudoprojectans	A3	A2, A3 and A4
Paraliodrosophila antennata	A3	A1, A2, A3 and A4
Zygothrica aff. subcandens	A2	A2
Zygothrica poeyi	A3	A2, A3 and A4
Zygothrica virgatalba	A2	A2

S5
❹
Q
Ta

Table S5. List of 38 Fungi species, followed by presence in the category regarding the characteristics of tenacity of fruiting bodies.

Code	Fundi Speciae	tenory/tenacity
0000		
Aga_sp1	Agaricales sp.1	4
Aga_sp2	Agaricales sp.2	З
Aga_sp3	Agaricales sp.3	4
Aga_sp4	Agaricales sp.4	4
Aur_pol	Auricularia polytricha	2
Aur_sp2	<i>Auricularia</i> sp.2	2
Fav_ten	Favolus tenuiculus	2
Ger_sp1	Gerronema sp.1	З
Ger_sp2	<i>Gerronema</i> sp.2	ю
Ger_sp3	Gerronema sp.3	З
Gym_sp	<i>Gymnopus</i> sp.	4
Gym_sp1	<i>Gymnopus</i> sp.1	4
Gym_sp3	Gymnopus sp.3	4

Gym_sp4	<i>Gymnopus</i> sp.4	4
Hem_sp1	Hemimycena sp.1	4
Hyd_cae	Hydropus aff. caespitosus	4
Hyd_sp1	Hydropus sp.1	4
Hyd_sp2	Hydropus sp.2	4
Hyd_sp3	Hydropus sp.3	4
Lac_cf_ang	Lactocollybia cf. angiospermarum	4
Lac_sp	Lactocollybia sp.	4
Len_rap	Lentinula raphanica	ო
Mas_aff_vol	Marasmiellus aff. volvatus	4
Mar_vol	Marasmiellus volvatus	4
Mas_sp3	Marasmius sp.3	4
Pan_sp1	Panus sp.1	2
Per_sti	Perenniporia stipitata	~
Pol_gui	Polyporus guianensis	ო
Poly_sp1	Polyporus sp.1	S

oly_sp2	Polyporus sp.2	~
se_cuc	Pseudofavolus cucullatus	3
Rig_bio	Rigidoporus biokoensis	
Rig_lin	Rigidoporus lineatus	.
Rig_mic	Rigidoporus microporus	~
Rig_sp1	Rigidoporus sp.1	~
[ra_lac	Trametes lactnea	~
[ra_mem	Trametes membranacea	~
ri_aur	Tricholomopsis aurea	3

A estrutura da rede Drosophilidae-Fungi com dois tipos de interações para a

região Amazônica brasileira*

*Capítulo formatado de acordo com as normas da Oikos

A estrutura da rede Drosophilidae-Fungi com dois tipos de interações para a região Amazônica brasileira

Rosângela Santa-Brígida¹, Marlúcia B. Martins², Priscila M. Sanjuan³, Carlos A. Rosa⁴, Felipe Wartchow⁵, Luiz H. Rosa⁴, Isabela G. Varassin⁶ e Claudio J. B. de Carvalho¹

¹Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 81531– 980, Brazil.

²Departamento de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, 66077–530 Brazil.

³Instituto Tecnológico Vale, Desenvolvimento Sustentável. Belém, PA, 66055-090, Brazil.

⁴Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270–901, Brazil.

⁵Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, CEP- 58051–900, Brazil.

⁶ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, CEP-81531–980, Brazil.

Correspondência:

Rosângela Santa-Brígida, Laboratório de Biodiversidade e Biogeografia de Diptera, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 81531–980, Brazil. E-mail: rosangela_brigida@yahoo.com.br.

Resumo

Os Drosophilidae micófagos destacam-se por sua estreita relação a corpos de frutificação de Basidiomicetos ou fungos macroscópicos, com quem estabelecem interações múltiplas para a alimentação, oviposição, cortejo e cópula, ao passo que os imaturos consomem leveduras e tecido dos cogumelos. Aqui, compreendemos a montagem do sistema formado por Drosophilidae e fungos macroscópicos com uma rede de multicamada formada por interações para alimentação e oviposição da floresta amazônica brasileira, para investigar a estruturação da rede com diferentes tipos de interações. Testamos se as redes formadas por interações entre Drosophilidae e os recursos para alimentação e oviposição são modulares e aninhadas e se espécies-chaves nas diferentes camadas interligam diferentes tipos de interação. Registramos 23 espécies de Drosophilidae e 47 de fungos para a rede multicamada, 17 e 36 para a rede de alimentação e 17 e 38 para a rede de oviposição. Encontramos uma rede aninhada e marginalmente modular, na qual os fungos que oferecem recursos, que são conectados por espécies centrais de Drosophilidae, com diferentes papéis nas camadas. As espécies que apresentaram valores elevados de centralidade, demonstraram seus importantes papéis para a alimentação e oviposição, em termos de número de fungos com os quais elas interagem (grau relativo), como elas ligam diferentes módulos (centralidade por intermédio), e a similaridade das suas interações com as interações feitas por espécies próximas (centralidade por proximidade). Portanto, as espécies centrais estruturam a rede Drosophilidae-Fungi para um sistema generalista e as espécies centrais que apresentaram dualidade quanto ao uso de seus hospedeiros, contribuem para a estruturação aninhada e as espécies não duais, mas centrais nas suas camadas contribuem para a estruturação modular fraca. Por fim, mostramos que algumas espécies servem como pontes que conectam os dois tipos de interação com os fungos, levando a uma rede de multicamada generalizada.

Palavras-chaves: aninhamento, centralidade por intermédio, centralidade por aproximação, modularidade, multicamada.

Introdução

As interações, que são a arquitetura da biodiversidade (Bascompte e Jordano 2007, Lewinsohn et al. 2006), são geralmente retratadas através de um único tipo de interação, como interações mutualísticas e antagônicas (Bronstein 2015). No entanto, mesmo em redes classicamente tratadas como mutualísticas, como as de polinização, se percebe que os limites não são tão claros e interações positivas e negativas coexistem dentro da mesma rede (Genini et al. 2010). De fato, os sistemas ecológicos são usualmente "multicamadas", ou seja, envolvem vários tipos de interações, com consequências para a dinâmica e estrutura desses sistemas (Melián et al. 2009, Boccaletti et al. 2014). Assim, por exemplo, a combinação de interações mutualísticas e antagônicas entre o mesmo par de espécies pode alterar a aptidão destas espécies (Armbruster 1997), ou, do ponto de vista da comunidade, pode afetar a persistência das espécies e sua diversidade (Melián et al. 2009).

Os drosofilídeos estabelecem interações com diversas espécies e a maioria se alimenta de microrganismos, principalmente de leveduras presentes em flores, frutos, cogumelos, casca de arvores, exsudados etc., assim como existem espécies que são mais restritas ecologicamente e outras mais versáteis para alimentação (Powell 1997). Os Drosophilidae micófagos destacam-se por sua estreita relação a corpos de frutificação de Basidiomicetos ou fungos macroscópicos, com quem estabelecem interações múltiplas (Courtney et al. 1990, Gottschalk et al. 2009, Valer et al. 2016). Os adultos interagem com os corpos de frutificação para alimentação, oviposição, cortejo e cópula, ao passo que os imaturos consomem leveduras e tecido dos cogumelos (Courtney et al. 1990, Wertheim 2000). Por outro lado, os Drosophilidae micófagos que interagem com os corpos de frutificação, para uma determinada finalidade, contribuem para a dispersão dos esporos de seus hospedeiros (Tuno 1999). As interações entre drosofilídeos e fungos são então particularmente interessantes por serem de natureza complexa e múltipla, constituindo um excelente grupo para ser abordado sob o foco de interações multicamadas (Genrich et al. 2016).

Neste estudo objetivamos compreender a montagem do sistema formado por Drosophilidae e fungos macroscópicos que hospedam leveduras que são fontes de alimento para as espécies de Drosophilidae ou fornecem local para deposição de seus ovos para reprodução. Nós testamos se as redes formadas por interações entre Drosophilidae e os recursos para alimentação e oviposição são modulares e aninhadas. Utilizamos uma rede de multicamada para testar (i) se as interações para alimentação e oviposição são separadas em diferentes módulos, ou se sobrepõem, devido as diferentes finalidades para o uso das espécies e, (ii) se espécies-chaves nas diferentes camadas interligam diferentes tipos de interações. Testamos a hipótese de que a rede multicamada e as duas camadas separadas diferem em suas propriedades estruturais. Mas especificamente, esperávamos que a rede multicamada estivesse menos aninhada e mais modular em relação as suas camadas separadas. Sabe-se que as larvas e os adultos de Diptera não competem entre si pelos mesmos recursos, pois são insetos holometábolos podem explorar ambientes distintos (Snodgrass 1953). Em relação as camadas, espera-se que ambas sejam mais aninhadas e menos modular. As propriedades estruturais dessas redes tendem a
serem mais similares as redes mutualísticas. Como já discutido, a relação dos Drosophilidae micófagos e os fungos macroscópicos, de certa forma têm uma relação mútua.

Material e Métodos

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido na Estação Científica Ferreira Penna (ECFPn – 01°42'S, 51°31'W), localizada na Floresta Nacional de Caxiuanã, estado do Pará, Brasil. A floresta contém aproximadamente 300,000 ha (Lisboa et al. 2007). De acordo com a classificação de Köppen, o clima é quente e úmido com subtipo climático 'Am' (clima tropical). Durante o ano a região apresenta uma curta estação seca com chuvas durante o ano todo, a sazonalidade é definida pela quantidade de chuva, com precipitação média de 2,000–2,500 mm/ano, uma estação seca pronunciada entre junho e novembro, onde a precipitação é inferior a 100 mm/mês (Rowland et al. 2018).

Coleta dos dados das interações entre Drosophilidae e fungos

Foram realizadas seis amostragens durante o período de janeiro a junho de 2016. As coletas foram realizadas em trilhas já estabelecidas na mata, com buscas ativas pelos corpos de frutificação dos fungos. No total, foram 34 dias de busca ativa na floresta, cinco ou seis dias para cada expedição. Neste estudo, a unidade amostral foi definida o conjunto de corpos de frutificação de cada espécime de fungo.

O evento de interação foi registrado quando o Drosophilidae estava presente nos corpos de frutificação. Quando observávamos amostras de fungos com presença de drosofilídeos, primeiramente coletávamos dados para a interação para a alimentação e em seguida para a oviposição.

Para a análise da camada alimentação, incluímos as interações nas quais a presença de leveduras nos papos das moscas, indicando potencial interação para a alimentação dos microorganismos presentes nos fungos. Como já discutido, os drosofilídeos micófagos usam os fungos para se alimentar, portanto, partimos do pressuposto que as leveduras encontradas nos papos das moscas foram consumidas nos cogumelos. Para esta interação coletávamos os espécimes de Drosophilidae que estavam sobrevoando por cinco minutos com um aspirador mecânico. Em seguida as moscas foram esterilizadas por imersão em água destilada e etanol 70% por um minuto, e realizado a dissecação dos papos de, no máximo, 35 indivíduos coletados em cada amostra. Na dissecação retirávamos a cabeca do resto do corpo do inseto, onde teoricamente inicia o esôfago e papo, e nessas regiões o processo de digestão química dos alimentos ainda não ocorre (Snodgrass 1953), portanto, as leveduras estavam vivas. Em seguida foi feito esfregaço da parte cortada da cabeça e o resto do corpo em placas com agar YM (3% de extrato de levedura, 3% de extrato de malte, 5% de peptona, 1% de glicose, 0,02% de cloranfenicol, 2% de agar e 100 ml de água destilada) e encubadas por 2-7 dias. Todos os isolados de leveduras foram purificados por meio de estrias repetidas nas placas de ágar YM e preservados em caldo GYMP (2% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,5 % de extrato de malte; 0,2% Na2PO4) contendo 20% de glicerina a -80° C.

Para a camada oviposição, incluímos as interações que tiveram sucesso na reprodução (quando emergia drosofilídeos dos corpos de frutificação). Para isso, os

corpos de frutificação foram coletados para a observação de emergência dos adultos de Drosophilidae. Em laboratório, as amostras foram acondicionadas em recipientes contendo areia previamente esterilizada. Para evitar a desidratação, adicionávamos água destilada diariamente. Mantivemos as amostras entre 20 e 25 ° C por quatro ou cinco semanas e, durante esse período, os insetos emergentes foram aspirados diariamente e fixados em etanol a 99%.

As duas camadas formaram uma única rede e houve drosofilídeos que usaram os fungos para ambas as interações (para se alimentar e para ovipositar) em diferentes espécies de fungos foram também incluídas nas análises.

Identificação dos Drosophilidae, leveduras e fungos macroscópicos

As moscas foram identificadas com base na morfologia externa, terminálias (genitálias) masculinas e femininas (ao menor nível possível), com base na literatura (Hendel 1936, Frota-Pessoa 1945, Burla 1956, Wheeler e Takada 1963, Grimaldi 1987, 1990, Vilela e Bächli 1990, 2004, 2007). Depositamos o material na coleção Entomologia do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), no estado do Pará e na Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure, no departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP), na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil.

A identificação das espécies de leveduras foi realizada por meio de análise de sequências da região ITS-5.8S e dos domínios D1/D2 da subunidade grande do gene rRNA. O DNA amplificado e limpo foi sequenciado em um sistema de sequenciamento automatizado com o instrumento de eletroforese ABI 3130 Genetic Analyzer, com o kit de sequenciamento de ciclo BigDye v3.1 e a matriz de separação polímero POP7. Comparamos as sequências com as do banco de dados do GenBank usando o Basic

Local Alignment Search Tool (BLAST; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712). No total, 81 espécies de leveduras foram identificadas.

A identificação das espécies de fungos foi realizada por meio de análise de sequência da região ITS-5.8S (espécies destacadas no Tabela S1) e por taxonomia clássica, quando não possível realizar a identificação com a biologia molecular. Para a identificação por biologia molecular, seguimos o protocolo de extração de DNA descrito por Rosa et al. (2009). A região do espaçador interno transcrito (ITS) foi amplificada com os iniciadores universais ITS1 e ITS4 (White et al. 1990). A amplificação foi realizada conforme descrito por Rosa et al. (2009). O DNA amplificado e limpo foi seguenciado em um sistema de seguenciamento automatizado com o instrumento de eletroforese ABI 3130 Genetic Analyzer, com o kit de sequenciamento de ciclo BigDye v3.1 e a matriz de separação polímero POP7. Comparamos as seguências com as do banco de dados do GenBank usando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712). Os sequenciamentos das leveduras e fungos macroscópicos foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, MS), Belo Horizonte, Brasil. Para identificação pela taxonomia clássica, os corpos de frutificação dos fungos foram amostrados de acordo com os métodos de documentação e preservação citados por Fidalgo e Bononi (1989). Análises macroscópicas e microscópicas foram realizadas, sendo que a análise das microestruturas foi realizada a partir de cortes depositados entre lâminas e lamínulas, com solução de KOH 3% e floxina 1%, e reagente de Melzer (Teixeira 1995). Para a identificação e/ou confirmação das espécies foi utilizada literatura especializada, tais como Ryvarden e Johansen (1980), Furtado (1981) e Ryvarden (1991, 2004). A nomenclatura utilizada seguiu o Mycobank (http://www.mycobank.org/).

Análises das redes

Para descrever a estrutura da interação Drosophilidae-Fungi, construímos uma rede de multicamada binária formada por Drosophilidae e suas interações para alimentação e oviposição em fungos macroscópicos a partir de duas matrizes, com espécies de Drosophilidae nas linhas e fungos macroscópicos nas colunas e as células preenchidas com presença e ausência de interações de cada tipo de interação registrado entre uma espécie de Drosophilidae i e uma espécie de fungo j. Construímos uma matriz para cada tipo de interação com os dados das interações registradas ao longo de todo o período de seis meses de coletas, e cada uma representa uma camada de rede. Portanto, a rede multicamada compreendeu todas as interações registradas, na qual as espécies de Drosophilidae e fungos estão conectadas entre si por interações para alimentação e oviposição. As espécies que fazem ligações em ambas as camadas (pertencem à ambas as camadas da rede), chamaremos aqui de "espécies pontes". Os gráficos foram desenhados no Pajek 4.09 (Batagelj and Mrvar 2003) usando o método 'Kamada-kawai – componentes separados, no qual os vértices (espécies) com um número maior de conexões ou módulos de conexões são atraídos para mais perto do centro.

Para descrever a estrutura de cada uma das duas camadas, usamos duas métricas de rede usadas frequentemente para esse objetivo: modularidade e aninhamento. As métricas foram calculadas para a rede multicamadas e para cada camada separadamente. A modularidade avalia se alguns grupos de espécies

(módulos) estão mais conectados umas às outras em relação a outros grupos de espécies da mesma rede (Newman 2006). Enquanto, em uma rede aninhada as espécies com menos interações conectam-se a um subconjunto de espécies que interagem mais na rede (Bascompte e Jordano 2014). Calculamos a modularidade com a função *computeModules()* no pacote *bipartite* (Dormann et al., 2008) com 10⁷ etapas definidas e opções padrão da função através do algoritmo DIRTLPAwb+ (Beckett, 2016), e o aninhamento (NODF) com a função *networklevel()* no pacote *bipartite* (Dormann et al. 2008). Usamos o modelo nulo de Patefield para estimar a significância das métricas e expectativas de rede observadas, com a função *nullmodel()*, com o método *huffle.web*, no pacote bipartite (Dormann et al. 2008) com 1000 modelos gerados no software R (R Development Core Team 2016). O desenho da rede foi preparado no programa Pajek 4.09 (Batageli e Mrvar 1998).

Usamos a centralidade como *proxy* para identificar espécies chaves na rede, uma vez que o conceito de centralidade é útil para avaliar a importância relativa de uma espécie para a estrutura de toda a rede (Martín González et al. 2010, Mello et al. 2015, Pilosof et al. 2017). A importância de uma espécie em relação às demais espécies pode ser medida de diversas formas: pelo grande número de interações que estabelecem em relação às demais espécies (grau relativo); por serem capazes de visitar fungos que agregam em interações em diferentes guildas (centralidade por intermédio); ou por compartilhar um grande número de interações com as outras espécies (centralidade por proximidade) (Nooy et al. 2005, Martín González et al. 2010). Calculamos estas três métricas de centralidade considerando que o grau relativo é a razão entre números de interações de uma espécie sobre o total de interações; a centralidade por intermédio é calculada como a proporção do menor caminho entre todos os pares de espécies na rede, que contenha a espécie em foco;

e a centralidade por proximidade é a distância média de uma espécie de todas as outras espécies na rede. A centralidade de cada espécie foi definida como um vetor de cada métrica de centralidade, medidos na rede de multicamada e suas duas camadas separadas. Calculamos as centralidades com a função *specieslevel()* no pacote *bipartite* (Dormann et al. 2008) no software R (R Development Core Team 2016).

Nós comparamos as métricas de centralidades (grau relativo, centralidade por intermédio e centralidade por aproximação) de Drosophilidae e fungo de acordo com as diferentes camadas (alimentação, oviposição e multicamada) com modelos lineares mistos, utilizando o pacote *Ime4* (Bates et al. 2015) com a função *Imer()*, no programa R. Consideramos as centralidades como variáveis respostas, com o tipo de rede (camadas) e grupo taxonômico (Drosophilidae ou fungo) como fatores fixos e as espécies como fatores aleatórios nos modelos. Para testar se o tipo de rede teve efeitos significativos sobre as centralidades, foi realizado um teste de razão de verossimilhança comparando o modelo com e sem o fator fixo usando o pacote *car* (Fox e Weisberg, 2018). Para a centralidade por intermédio, os valores foram logaritimizados (log10) para uma melhor distribuição dos resíduos.

Resultados

Espécies e suas interações

Registramos um total de 1644 indivíduos de Drosophilidae e 88 amostras de fungos macroscópicos. A rede multicamada apresentou 158 registros de interações entre 23 espécies de Drosophilidae e 47 espécies de fungos (Tabela S1, Fig. 1), 86 interações

para a alimentação, 108 ligações para a oviposição (Table S2) e 98 ligações duplas (i.e. ligações para alimentação e oviposição entre as mesmas espécies de Drosophilidae e fungo). As camadas alimentação e oviposição se sobrepuseram 74%, as espécies estavam presentes em ambas A camada de alimentação foi constituída por 17 espécies de Drosophilidae e 36 espécies de fungos, enquanto a camada de oviposição por 17 espécies de Drosophilidae e 38 espécies de fungos (Tabela S3).

As 98 ligações duplas foram feitas entre 11 espécies de Drosophilidae (Drosophila (SB13009), Hirtodrosophila (SB13010), Hirtodrosophila (SB13011), Hirtodrosophila (SB13027), Hirtodrosophila subflavohalterata, Leucophenga (SB16009), Mycodrosophila neoprojectans, Μ. projectans, М. pseudoprojectans, Paraliodrosophila antennata e Zygothrica virgatalba) e 27 espécies e fungos (Agaricales sp. 2, Agaricales sp. 3, F. tenuiculus, Gerronema sp. 1, Gerronema sp. 2, Gymnopus sp. 3, Gymnopus sp.4, Hemimycena sp.1, Hydropus aff. Caespitosus, Hydropus sp. 2, Hydropus sp. 3, Lactocollybia sp., Lentinula raphanica, Marasmiellus aff. volvatus, M. volvatus, Marasmius sp. 3, Panus sp.1, Perenniporia stipitata, Polyporus guianensis, Polyporus sp. 1, Polyporus sp. 2, Pseudofavolus cucullatus, Rigidoporus biokoensis, Rigidoporus lineatus, Trametes lactnea, T. membranacea e Tricholomopsis aurea) (Material suplementar, Tabela S2).

Em ambas as camadas (alimentação e oviposição) tiveram seis espécies de Drosophilidae que usaram o fungo para alimentação (*Drosophila atrata*, *Drosophila calloptera*, *Drosophila* cuaso, *Hirtodrosophila* (SB14009), *Hirtodrosophila* (SB16007) e *Mycodrosophila elegans*) ou para oviposição (*Hirtodrosophila* (SB13027), *Hirtodrosophila* (SB14007), *H. morgani*, *H. subgilva*, *Z. aff. subcandens* e *Z. poeyi*). Registramos quatro espécies de *Drosophila* (*Drosophila* sp.1, *D. atrata*, *D. calloptera* e *D. cuaso*) do total e três usaram apenas a camada de alimentação (Tabela S2).

Assim como Zygothrica que foi registrado com três espécies (*Z. subflavohalterata*, *Z. poeyi* e *Z. virgatalba*) e *Z. subflavohalterata* e *Z. poeyi* foram exclusivas para a camada oviposição (Tabela S3). Das 47 conexões possíveis, *Hirtodrosophila* sp.2 interagiu com 35 espécies de fungos (correspondendo 74% de todas as interações na comunidade). Os drosofilídeos com maior número de conexões foram *Hirtodrosophila* sp.2 e *M. neoprojectans* (Fig. 1).



Figura 1. Rede de multicamada formada por interações entre Drosophilidae e fungos que fornecem recursos para as moscas. Os círculos representam espécies de Drosophilidae e os quadrados representam espécies de fungos. As linhas representam interações para alimentação (vermelha) e oviposição (azul). As cores dos símbolos representam os módulos da rede multicamada. Veja os nomes das espécies de fungos e Drosophilidae no Tabela S1.

Os padrões estruturais da rede mudaram quando considerada a rede de multicamada, que apresentou maior aninhamento que as redes monocamadas, e menor modularidade (Tabela 1). Na rede de multicamada, todos os módulos foram compostos por espécies das duas camadas, sendo que 47% das espécies de Drosophilidae e 57% das espécies de fungos estavam presentes em ambas as camadas de alimentação e oviposição. Observamos 158 interações na rede multicamada, sendo 98 (38%) foram repetidas nas camadas de oviposição e alimentação.

Tabela 1. Valores das métricas para as camadas da rede Drosophilidae-Fungi e os números de módulos formados.

Métricas	Multicamada	Alimentação	Oviposição
Riqueza de fungos	47	36	38
Riqueza de Drosophilidae	23	17	17
Aninhamento (NODF)	47,8*	37,7*	45,4
Modularidade (Newman)	0,33*	0,47*	0,35
Número de módulos	4	6	6

* P<0.05

O papel das espécies mudou entre as camadas, uma vez que as centralidades das espécies diferiram entre as camadas (Tabela S4) como detectado pelo teste de razão de verossimilhança (Tabela 2). No entanto, das 11 espécies de Drosophilidae que conectaram as camadas de alimentação e oviposição (Fig. 1), *Hirtodrosophila* (SB13011) apresentou os maiores valores de centralidade para todas as métricas, e para os fungos, das 27 espécies com ligações para as duas camadas, *Favolus*

tenuiculus apresentou os maiores valores de centralidades (Material suplementar, Tabela S4). Um total de 12 espécies de Drosophilidae e 20 espécies de fungos que não interligam as camadas, mas foram espécies chaves nas suas camadas. Dentro os gêneros de Drosophilidae registrados, observados que três espécies de *Mycodrosophila* (*M. projectans, M. neoprojectans* e *M. pseudoprojectans*) foram espécies pontes na multicamada.

Tabela 2. Comparações das métricas de centralidades de Drosophilidae e fungo entre as camadas (multicamada, alimentação e oviposição). As comparações foram feitas com modelos de efeitos mistos, usando as espécies como variáveis aleatórias. A significância dos termos foi obtida a partir de teste de razão de verossimilhança comparando os modelos sem as variáveis das centralidades.

			Te	este de razão de
			ver	ossimilhança
Resposta Variável	Estimativa	SE	χ2	<i>p</i> -valor
Grau relativo	0,12	0,01	7,6	0,005
Centralidade por intermédio	5,4	0,2	8,9	0,002
Centralidade por proximidade	0,03	0,001	0	1

Discussão

A abordagem de rede de multicamada revelou que a estrutura da rede multicamadas diferiu das redes monocamadas. Aqui, identificamos uma alta sobreposição entre as relações para oviposição e alimentação da rede Drosophilidae-Fungi, pois quase metade das espécies de Drosophilidae usam os mesmos fungos para oviposição e para alimentação. Isso resultou em uma rede multicamada com maior aninhamento,

em especial quando comparada com a rede de oviposição, a qual não apresentou aninhamento e nem modularidade significativos, além de menor modularidade, sem ocorrência de módulos exclusivos. Além do mais, detectamos que as espécies que interligam as camadas tendem a ser espécies-chave. Entre essas, algumas atuam como dual keystone (*sensu* Genrich et al. 2017), sendo chave em ambas camadas.

No nível das camadas, alimentação foi significativamente aninhado e modular do que oviposição. Em redes mutualísticas e antagônicas o aninhamento e modularidade tem efeitos opostos (Thébault & Fontaine 2010). O aninhamento tende a atenuar a competição entre espécies e mantém a comunidade conectada durante perturbações (Bascompte et al. 2003). A modularidade mantém os módulos coesos, os efeitos das perturbações são contidos nos módulos, contribuindo assim para a estabilidade da rede (Thébault & Fontaine 2010). Aqui não podemos dizer que alimentação é uma rede mutualísticas e oviposição seria uma rede antagônica, nossos dados não nos permite ter essa conclusão. No entanto, as redes alimentação e oviposição parecem ser estruturadas de forma semelhantes as redes mutualísticas e antagônicas, respectivamente.

Detectamos 38 espécies como espécies chaves duais (Genrich et al. 2017), na rede multicamada. Estas espécies, além de apresentarem uma importância desproporcional em relação às demais (Paine 1969), também funcionam conectando as redes de alimentação e oviposição. Essas espécies apresentam interações bastante generalistas (Dormann 2011), uma vez que estabelecem interações com muitas espécies (elevado grau relativo), e portanto tem um papel importante no funcionamento ecossistêmico (Mello et al. 2015). Além disso, pela elevada sobreposição de interações com outras espécies (centralidade por proximidade), são capazes de propagar perturbações mais facilmente, sendo responsáveis pela

manutenção da dinâmica na rede. Essas características das espécies chaves devem elevar o aninhamento da rede multicamada, tornando-a mais robusta a extinções secundárias (Bascompte e Jordano 2007), assim como diminuindo a competição entre espécies (Bastolla et al. 2009). Por outro lado, o elevado valor de centralidade por intermédio revela que é uma espécie que mantém a estrutura e a coesividade da rede (Nooy et al. 2005), diminuindo a compartimentalização da rede, o que reflete nos menores valores de modularidade da rede multicamada.

As espécies de Drosophilidae que usam os fungos para a alimentação ou oviposição podem competir por recurso comum em seus hospedeiros, a alimentação. Apesar da alta sobreposição observada em que 47% das espécies que frequentaram os fungos para alimentação e para oviposição na rede de multicamada, os Drosophilidae podem estar explorando leveduras diferentes, e não ocorrer competição para a alimentação dos adultos e larvas. De fato, os adultos podem frequentar o fungo para se alimentar das leveduras presentes nos corpos frutificação (Rohlfs e Kurschner 2010, Matavelli et al. 2015), e as larvas se alimentam das leveduras e das hifas (Carson 1971). Além disso, a preferência por espécies de leveduras para alimentação entre os adultos e as larvas de Drosophila são diferentes, os adultos exploram uma composição de leveduras, enquanto as larvas outra (Cooper 1960). A preferência por espécies de leveduras deve, portanto, determinar as interações para a alimentação e oviposição. Assim, as interações para a alimentação e oviposição são separadas em diferentes módulos, a rede multicamada foi marginalmente modular, com uma organização modular fraca, os quatros módulos sendo compartilhado pela maioria das espécies, por exemplo Drosophila (SB13009), Hirtodrosophila (SB13010) e Hirtodrosophila (SB13011).

A quantidade de interações para alimentação e para oviposição não variou entre espécies comuns de fungos. Isto pode ser parcialmente explicado pela abundância das espécies comuns entre as camadas, como *Favolus tenuiculus, Lentinula raphanica* e *Rigidoporus biokoensis* que representaram 57% do total. As espécies que tiveram interações para alimentação ou para oviposição foram mais comuns da ordem Polyporales e Agaricales, respectivamente. Espécies com maiores tenacidades, como *Fomes fasciatus, Ganoderma australe e Nigrofomes melanoporus* da ordem Polyporales foram usadas apenas para alimentação. Portanto, espécies de cogumelos com tenacidade mais forte ou menos forte pode causar diferenças estruturais em redes com interações de multicamadas. No entanto, estudos futuros devem avaliar os níveis dessas mudanças e como a morfologia da tenacidade dos fungos pode influenciar a estrutura das interações para alimentação ou oviposição ou oviposição.

Observamos que espécies, no entanto, ocorreram exclusivamente na camada de alimentação ou oviposição. Por exemplo, *Drosophila atrata*, *Drosophila calloptera*, *Drosophila* cuaso, *Hirtodrosophila* (SB14009), *Hirtodrosophila* (SB16007) e *Mycodrosophila elegans* presentes na camada alimentação. *Hirtodrosophila* (SB13027), *Hirtodrosophila* (SB14007), *H. morgani*, *H. subgilva*, *Z. aff. subcandens* e *Z. poeyi* estavam presentes apenas na camada de oviposição. As espécies de *Drosophila* que foram exclusivas na camada alimentação, não são espécies exclusivamente micófagas, mas são comumente encontradas em corpos de frutificação para o Brasil (Gottschalk et al. 2009, Santa-Brígida et al. 2019).

Observamos que sete espécies de fungos usados pelos drosofilídeos na camada de alimentação, apresentam corpos frutificação rígidos, e nesses fungos não observamos emergência de adultos. Dessa forma, os drosofilídeos podem não os usar essas espécies para ovipositar, por serem rígidos, sendo um nicho não adequado para

as larvas, e com ausência das larvas nesses corpos de frutificação, os adultos interagem com esses fungos apenas para alimentação. Alternativamente, é possível que os Drosophilidae encontram espécies de leveduras não encontradas nos corpos de frutificação com presença de larvas. Para os fungos, observamos que a comunidade está unida por espécies de Drosophilidae altamente centrais que podem fornecer diferentes funções ecológicas aos fungos, por exemplo, aumentam a aptidão fúngica pela dispersão de esporos para locais favoráveis à germinação (Tuno 1999).

Aqui, mostramos que algumas espécies servem como pontes que conectam os dois tipos de interação com os fungos, levando a uma rede de multicamada generalizada. As espécies centrais que apresentaram dualidade quanto ao uso de seus hospedeiros, contribuem para a estruturação aninhada e as espécies não duais, mas centrais nas suas camadas contribuem para a estruturação modular fraca. Essas espécies são particularmente importantes conferindo robustez e coesividade à rede.

Agradecimentos – Somos gratos a Cleumar Lopez e Robson Carvalho pela assistência durante o trabalho de campo; Camila Silveira Souza por sua ajuda nas análises; Ana Raquel dos Santos, Mariana Costa e Vivian Gonçalves pela assistência em laboratório; Marcos de S. Fialho por sugestões e comentários, nos ajudou a melhorar este manuscrito. Bolsas de estudo, permissão para coleta de espécimes e apoio logístico foram fornecidos pela Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (RSB, # 40001016005P5; CJBC, #309873/2016-9; IGV, #313801 / 2017-7), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença # 52267-1), Programa de Pós-graduação de Entomologia da Universidade Federal do Paraná, Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (# 441224/2016–4), Estação Científica Ferreira Penna e Museu Paraense Emílio Goeldi.

Referências

- Armbruster, W. S. 1997. Exaptations link evolution of plant–herbivore and plant– pollinator interactions: a phylogenetic inquiry. – Ecology 778: 1661–1672.
- Bascompte, J., Jordano, P., Melián, C.J, Olesen, J.M. 2003. The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. Proc. Natl Acad. Sci.16: 9383–9387.
- Bascompte, J. & Jordano, P. 2007. *Plant–animal mutualistic networks: The architecture of biodiversity*. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 38: 567–593.
- Bascompte, J. & Jordano, P. 2014. Mutualistic networks. Princeton Univ. Press.
- Bastolla, U. et al. 2009. *The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity*. Nature 458: 1018–1020.
- Batageli, V. & Mrvar, A. 2003. Pajek: analysis and visualization of large networks. Preprint Series 41: 1–18.
- Bates, D., Mächler, M. et. al 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J. Stat. Softw. 67: 1–48. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01
- Beckett, S. J. 2016. Improved community detection in weighted bipartite networks. Royal Soc. Open Sci. 3: 140536.
- Boccaletti, S., Bianconi, G. et al. 2014. The structure and dynamics of multilayer networks. Phys. Rep. 544: 1–122.
- Bronstein, J. L. 2015. Mutualism. Oxford Univ. Press.
- Burla, H. 1956. Die Drosophilidengattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur *Drosophila*untergattung *Hirtodrosophila*. – Mitt. Zool. Mus. Berl. 32: 189–321.
- Carson, H. L. 1971. The ecology of Drosophila breeding sites. University of Hawaii Honolulu.

- Cooper, D. M. 1960. Food Preferences of Larval and Adult *Drosophila*. Evolution 14: 41–55.
- Courtney, S. P., Kibota, T. T. et al. 1990. Ecology of mushroom-feeding Drosophilidae. – Adv. Ecol. Res. 20: 225–274.
- Dormann, C. F., Gruber, B. et al. 2008. Introducing the bipartite package: analyzing ecological networks. R News. 8: 8–11.
- Dormann, C. F. 2011. How to be a specialist? Quantifying specialisation in pollination networks. Network Biology 1: 1–20.
- Fidalgo, O. & Bononi, V. L. R. 1989. Guia de coleta, preservação e herborização de material botânico. Manual no. 4, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.
- Furtado, J. S. 1981. Taxonomy of Amauroderma (Basidiomycetes, Polyporaceae). Mem. N. Y. Bot. Gard. 34: 1–109.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2018. An R Companion to Applied Regression. Thousand Oaks, US.
- Frota-Pessoa, O. 1945. Sobre o subgênero Hirtodrosophila, com descrição de uma nova espécie (Dipt., Drosophilidae, Drosophila). – Rev. Bras. Entomol. 5: 469– 483.
- Genini, J., Morellato, L. P. C. et al. 2010. Cheaters in mutualism networks. Biol. Lett. 22: 1–5.
- Genrich, C. M., Mello, M. A. et al. 2017. Duality of interaction outcomes in a plant– frugivore multilayer network. – Oikos 126: 361–368. doi:10.1111/oik.03825
- Gottschalk, M. S., Bizzo, L. et al. 2009. Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantic Rain Forest areas. – Iheringia 99: 442–448.

- Grimaldi, D. A. 1987. Phylogenetics and taxonomy of Zygothrica (Diptera: Drosophilidae). Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 186: 103–268.
- Hendel, F. 1936. Ergebnisse einer zoologischen Sammelreise nach Brazilien insbesondere in das Amazonasgebiet, ausgefuhrt von Dr. H. Zerny. X. Teil. Diptera. Muscidae acalyptratae (excl. Chloropidae). Ann. des K.K. Naturhist. Hofmus. 47: 61–106.
- Lewinsohn, T. M., Loyola, R. D. et al. 2006. Matrizes, redes e ordenações: a detecção de estruturaem comunidades interativas. Oecol. Bras. 10: 90–104
- Lisboa, P. L. B. 2007. A Estação Científica Ferreira Penna/ECFPn (1993–2000). –
 In: Lisboa, P. L. B. (Ed.), Caxiuanã: Populações tradicionais, meio físico e diversidade biológica. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. pp 35–55.
- Martín González, A. M., Dalsgaard, B. et. al. 2010. Centrality measures and the importance of generalist species in pollination networks. – Ecol. Complex. 7: 36– 43.
- Matavelli, C., Carvalho, M. J. A.et al. 2015. Differences in larval nutritional requirements and female oviposition preference reflect the order of fruit colonization of Zaprionus indianus and Drosophila simulans. – J. Insect Physiol. 82: 66–74.
- Melián, C. J., Bascompte, J. et al. 2009. Diversity in a complex ecological network with two interaction types. – Oikos 118: 122–130. doi:10.1111/j.1600-0706.2008.16751.x
- Mello, M. A. R. et al. 2015. Keystone species in seed dispersal networks are mainly determined by dietary specialization. Oikos 124: 1031–1039.
- Newman, M. 2006. Modularity and community structure in networks. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103: 16723398.

- Nooy, W., Mrvar, A. et al. 2005. Exploratory social network analysis with Pajek. -Cambridge University Press.
- Paine, R. T. 1969. A note on trophic complexity and community stability. Am. Nat. 103: 91–93.
- Pilosof, S., Porter, M. A. et al. 2017. Ecological multilayer networks: a new frontier for network ecology. – Nat. Eco. Evol. 01: 1–9.
- Powell, J. R. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: the Drosophila model. Oxford University Press, New York.
- R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. URL. https//www.Rproject.org/https://doi.org/10. 1016/B978-0-12-381308-4.00001-7.
- Rohlfs, M., Kurschner, L. 2010. Saprophagous insect larvae, Drosophila melanogaster, profit from increased species richness in beneficial microbes. J.
 Appl. Entomol. 134: 667–671.
- Rosa, L. H., Vaz, A. B. M. et al. 2009. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass Deschampsia Antarctica Desv. (Poaceae). Polar Biol. 32: 161–167.
- Rowland, L., da Costa, A. C. L. et al. 2018. Shock and stabilisation following longterm drought in tropical forest from 15 years of litterfall dynamics. – J. Ecol. 106: 1673–1682.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of Polypores: nomenclature and taxonomy. Syn. Fung. 5: 1–373.
- Ryvarden, L. 2004. Neotropical Polypores. Part 1. Syn. Fung. 19: 1–227.
- Ryvarden, L. & I. Johansen. 1980. A preliminary Polypore Flora of East Africa. Fungiflora, Oslo, Norway.

Snodgrass, R. E. 1953. Principles of insects morphology. – Cornell University Press

- Teixeira, A. R. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual no. 6, Instituto de Botânica, São Paulo, Brazil.
- Thébault, E. & Fontaine, C. 2010. Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks. Science 329: 853–856.
- Tuno, N. 1999. Insect feeding on spores of a bracket fungus, Elfvingia applanata (Pers.) Karst. (Ganodermataceae, Aphyllophorales). Ecol. Res. 14: 97–103.
- Valer, F.B, Bernardi, E., Mendes, M.F., Blauth, M.L., Gottschalk, M.S. 2016. Diversity and associations between Drosophilidae (Diptera) species and Basidiomycetes in a Neotropical forest. – An. Acad. Bras. Ciênc. 88: 1–14.
- Vilela, C. R. & Bächli, G.1990. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 63: 1–332.
- Vilela, C. R. & Bächli, G. 2004. On the identities of nine Neotropical species of Hirtodrosophila (Diptera, Drosophilidae). Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 77: 161–195.
- Vilela, C. R. & Bächli, G. 2007. Revision of the Neotropical genus Paraliodrosophila (Diptera, Drosophilidae). – Bull. Soc. Entomol. Suisse 80: 291–317.
- Wertheim, B., Sevenster, J. G. et al. 2000. Species diversity in a mycophagous insect community: The case of spatial aggregation vs. resource partitioning. *J. Anim. Ecol.* 69: 335–351. https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2000.00396.x.
- Wheeler, M. R. & Takada, H. 1963. A Revision of the American Species of *Mycodrosphila* (Diptera; Drosophilidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 36: 391–399.
- White, T. J., Bruns, T. D. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., & Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Vol. 18. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 315–322.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1

Tabela S1. Lista das espécies de Drosophilidae e fungos

Nós	Código	Taxon
Drosophila (SB13009)	Dro_sp1	Drosophilidae
Drosophila atrata	Dro_atr	Drosophilidae
Drosophila calloptera	Dro_cal	Drosophilidae
Drosophila cuaso	Dro_cua	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB13010)	Hir_sp1	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB13011)	Hir_sp2	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB13027)	Hir_sp3	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB14002)	Hir_sp4	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB14007)	Hir_sp5	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB14019)	Hir_sp6	Drosophilidae
Hirtodrosophila (SB16007)	Hir_sp7	Drosophilidae
Hirtodrosophila morgani	Hir_morg	Drosophilidae
Hirtodrosophila subflavohalterata	Hir_sub	Drosophilidae
Hirtodrosophila subgilva	Hir_subg	Drosophilidae
Leucophenga (SB16009)	Leu_sp1	Drosophilidae
Mycodrosophila elegans	Myc_ele	Drosophilidae
Mycodrosophila neoprojectans	Myc_neo	Drosophilidae
Mycodrosophila projectans	Myc_pro	Drosophilidae
Mycodrosophila pseudoprojectans	Myc_pse	Drosophilidae
Paraliodrosophila antennata	Par_ant	Drosophilidae

Zygothrica aff. subcandens	Zyg_sub	Drosophilidae
Zygothrica poeyi	Zyg_poe	Drosophilidae
Zygothrica virgatalba	Zyg_vir	Drosophilidae
Agaricales sp.1	Aga_sp1	Fungos
Agaricales sp.2	Aga_sp2	Fungos
Agaricales sp.3	Aga_sp3	Fungos
Agaricales sp.4	Aga_sp4	Fungos
Auricularia polytricha	Aur_pol	Fungos
<i>Auricularia</i> sp.2	Aur_sp2	Fungos
Favolus tenuiculus	Fav_ten	Fungos
Fomes fasciatus	Fom_fas	Fungos
Ganoderma australe	Gan_aus	Fungos
Gerronema sp.1	Ger_sp1	Fungos
Gerronema sp.2	Ger_sp2	Fungos
Gerronema sp.3	Ger_sp3	Fungos
<i>Gymnopus</i> sp.	Gym_sp	Fungos
<i>Gymnopus</i> sp.1	Gym_sp1	Fungos
<i>Gymnopus</i> sp.3	Gym_sp3	Fungos
<i>Gymnopus</i> sp.4	Gym_sp4	Fungos
<i>Hemimycena</i> sp.1	Hem_sp1	Fungos
Hydropus aff. caespitosus	Hyd_cae	Fungos
<i>Hydropus</i> sp.1	Hyd_sp1	Fungos
Hydropus sp.2	Hyd_sp2	Fungos
Hydropus sp.3	Hyd_sp3	Fungos
Lactocollybia cf. angiospermarum	Lac_cf_ang	Fungos

<i>Lactocollybia</i> sp.	Lac_sp	Fungos
Lentinula raphanica	Len_rap	Fungos
Marasmiellus aff. volvatus	Mas_aff_vol	Fungos
Marasmiellus volvatus	Mar_vol	Fungos
<i>Marasmius</i> sp.3	Mas_sp3	Fungos
Nigrofomes melanoporus	Nig_mel	Fungos
Oudemansiella cubensis	Oud_cub	Fungos
Panus sp.1	Pan_sp1	Fungos
Perenniporia stipitata	Per_sti	Fungos
Phellinus gilvus	Phe_gil	Fungos
Polyporaceae sp.1	Pol_sp1	Fungos
Polyporales sp.2	Polyp_sp2	Fungos
Polyporus guianensis	Pol_gui	Fungos
Polyporus sp.1	Poly_sp1	Fungos
Polyporus sp.2	Poly_sp2	Fungos
Pseudofavolus cucullatus	Pse_cuc	Fungos
Rigidoporus biokoensis	Rig_bio	Fungos
Rigidoporus lineatus	Rig_lin	Fungos
Rigidoporus microporus	Rig_mic	Fungos
<i>Rigidoporus</i> sp.1	Rig_sp1	Fungos
Trametes lactnea	Tra_lac	Fungos
Trametes membranacea	Tra_mem	Fungos
Tricholomopsis aurea	Tri_aur	Fungos
<i>Xylaria</i> sp.1	Xyl_sp1	Fungos
<i>Xylaria</i> sp.2	Xyl_sp2	Fungos

Tabela S2

Tabela S2. Matriz de dados da camada de alimentação

	_		1	-	-	~	6	23	-	4	-	~	~	-	6
	Grau	(k)													
	m	9	. 	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0
	n	2	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0
	m	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~
	m	ო	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0
	m	2	~	0	0	0	~	-	0	~	0	0	0	0	0
	m	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	n	0	0	0	0	0	0	-		-	0	0	0	0	0
	2	6	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	~
	2	œ	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0
	2	~	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	~
	2	9	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	~
	2	2	0	0	0	0	~	-	0	0	0	0	0	0	0
	2	4	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
	2	ო	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	2	~	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	2	~	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~
	2	0	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0
	~	6	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	~	œ	.	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	4	0	0	0	0	-	-	0	0	~	0	0	0	0
	~	9	0	0	0	0	0	-	0	0	0		0	0	0
	~	S	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	~
	.	4	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	.	e	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0
	.	2	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
1	~	-	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0
1	~	0	0	0	0	0	~	-	0	-	0	0	0	0	0
	6 8	•		0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2		~	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	9	•	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
	4		0	0	0	0	0	, -	0	0	0	0	0	0	0
	ი)	.	0	-	~	0	-	0	0	0	0	0	0	~
	7	l	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	· ·		0		U	0	, (C	1) () (2	7) () (6	U	0		ctans (
	Jrosophilidae/Fungo		Drosophila (SB13009)	Drosophila atrata	Drosophila calloptera	Drosophila cuaso	Hirtodrosophila (SB1301	Hirtodrosophila (SB1301	Hirtodrosophila (SB1302	Hirtodrosophila (SB1400	Hirtodrosophila (SB1401:	Hirtodrosophila subflavohalterata	Leucophenga (SB16009)	Mycodrosophila elegans	Mycodrosophila neoproje
	Códiao		Dro_sp 1	Dro_atr /	Dro_cal 1	Dro_cu a	Hir_sp1 /	Hir_sp2 /	Hir_sp6 /	Hir_sp4	Hir_sp7 /	Hir_sub	Leu_sp 1 1	Myc_ele /	Myc_ne

сı		5		11	~	
0		0		0	0	2
0		0		0	0	-
0		0		-	0	2
0		0		0	0	.
0		0		0	0	4
0		0		~	0	.
~		0		-	0	ŝ
0		~		0	0	ი
0		0		0	0	-
0		0		0	0	2
0		~		~	0	4
0		0		0	0	2
0		~		-	0	4
0		0		-	0	-
0		0		-	0	ი
0		0		-	0	2
0		0		0	0	.
~		0		0	0	2
0		0		0	0	2
~		0		-	0	ŝ
0		0		0	0	2
~		0		-	0	ŝ
0		0		0	0	-
0		0		0	0	-
0		0		0	0	-
0		0		0	0	-
0		0		0	0	n
0		0		0	0	-
0		0		0	0	7
0		0		0	0	n
0		~		0	0	ς,
-		-		-	-	9
0		0		0	0	ი
0		0		0	0	-
Mycodrosophila projectans		Mycodrosophila	pseudoprojectans	Paraliodrosophila antennata	Zygothrica virgatalba	Grau (k)
Myc_pr	0	Myc_ps	Ð	Par_ant	Zyg_vir	

S
a
Ð
ab
Ĕ

Tabela S3. Matriz de dados da camada oviposição

Cádia ô	Duccontribution (Erman	, ,	•			1	•		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	7	2	7	7	7	2	2	7	e	e	e	e	e	e	e	e	33	irau
comigo	urosopiiiiidae/rungo	-	o	4	0	-	0	n	0	-	2	ŝ	4	2	9	~	ø	6	0	-	2	e	4	2	9	~	œ	6	0	-	2	ŝ	4	5	9	4	8	(Y
Dro_sp 1	Drosophila (SB13009)	0 0	~	0	0 0	-	0	0	0	0	0	~	~	0	0	0	~	0	0	~		~	~	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	9
Hir_sp1	Hirtodrosophila (SB13010)	1	0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ო
Hir_sp2	Hirtodrosophila (SB13011)	-	~	-	0	-	~	-	-	0	~	-	~	0	-	0	-	-	-	-	-	~	-	~	0	-	0	-	0	0	-	0	0	0	0	0		24
Hir_sp3	Hirtodrosophila (SB14002)	0	0	0	0 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
Hir_sp4	Hirtodrosophila (SB14007)	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	-	0	0	0	~	0	4
Hir_sp5	Hirtodrosophila (SB16007)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Hir_mo rg	Hirtodrosophila morgani	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Hir_sub	Hirtodrosophila subflavohalterata	0 0	-	0	-	~	0	0	~	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Hir_sub g	Hirtodrosophila subgilva	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Leu_sp 1	Leucophenga (SB16009)	1 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Myc_ne o	<i>Mycodrosophila</i> neoprojectans	-	.	0	0 0	~	~	~	~	~		~	0	~	0			0	~	0	~	0	0	0	~	0	~	~	~	0	0	0		0		0	~	52
Myc_pr o	Mycodrosophila projectans	0 0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	-		0	~	-	~	0			0	0	7

4		7	-	£	-	
0		-	0	0	0	e
0		0	0	0	0	÷
0		-	0	0	0	ო
0		0	0	0	0	-
0		0	0	0	0	-
0		0	0	0	0	2
0		0	0	0	0	ŝ
0		0	0	0	0	-
0		0	0	0	0	-
~		-	0	0	0	S
0		0	0	0	0	2
0		0	0	0	0	6
0		0	0	0	0	-
0		0	0	0	0	-
0		-	0	0	0	4
0		0	0	0	0	2
-		-	0	0	0	∞
0		-	0	0	0	4
0		0	0	0	0	_
0		-	0	-	0	۰ ۲
0			0		0	-
0		0	0	0	0	
0		0	0	0	0	2
0		0	0	0	0	2
~		0	0	0	0	5
0		0	0	0	0	2
0		0	0	0	0	÷
0		-	0		0	S
0		-	0	-	0	S
-		-	6	0	1	9
0		0	0	0	0	2
0		0	0	0	0	2
0		-	0	-	0	6 1
0		0	0	0	0	2
0		0	0	0	0	4
Mycodrosophila	pseudoprojectans	Paraliodrosophila antennata	Zygothrica aff. subcandens	Zygothrica poeyi	Zygothrica virgatalba	Grau (k)
Myc_ps	θ	Par_ant	Zyg_su b	Zyg_po e	Zyg_vir	

Tabela S4

Tabela S4. Valores das métricas de centralidades calculadas para as espécies de fungos e Drosophilidae como vetores

Centralidade por intermédio Centralidade por proximidade

Grau relativo

para a rede de multicamada e suas duas camadas.

Taxon	Espécies	Código	ebemeoitluM	ošįstnemilA	ošįisoqivO	ebemeoitluM	ošįostnemilA	ospisoqivO	BbemeoitluM	ošįstnemilA	ošpisoqivO
Drosophilidae	1Drosophila (SB13009)	Dro_sp1	0,34	0,31	0,26	0,16	0,27	0,13	0,06	0,07	0,07
Drosophilidae	² Drosophila atrata	Dro_atr	0,02	0,03	ı	0,00	0,00	ı	0,03	0,04	ı
Drosophilidae	² Drosophila calloptera	Dro_cal	0,02	0,03	ı	0,00	0,00	ı	0,05	0,06	ı
Drosophilidae	² Drosophila cuaso	Dro_cua	0,02	0,03	ı	0,00	0,00	ı	0,05	0,06	ı
Drosophilidae	¹ Hirtodrosophila (SB13010)	Hir_sp1	0,23	0,25	0,08	0,02	0,01	0,02	0,05	0,06	0,06
Drosophilidae	¹ Hirtodrosophila (SB13011)	Hir_sp2	0,74	0,64	0,63	0,25	0,47	0,21	0,06	0,08	0,08
Drosophilidae	² Hirtodrosophila (SB13027)	Hir_sp3	0,02	,	0,03	0,00	ı	0,00	0,04	ı	0,05
Drosophilidae	¹ Hirtodrosophila (SB14002)	Hir_sp4	0,02	0,11	0,11	0,00	0,01	0,00	0,04	0,06	0,05
Drosophilidae	² Hirtodrosophila (SB14007)	Hir_sp5	0,11	ī	0,03	0,01	ı	0,00	0,04	ı	0,04
Drosophilidae	² Hirtodrosophila (SB14019)	Hir_sp6	0,02	0,03	ı	0,00	0,00	ı	0,04	0,05	ı
Drosophilidae	² Hirtodrosophila (SB16007)	Hir_sp7	0,02	0,03	ı	0,00	0,00	ı	0,03	0,05	ı
Drosophilidae	² Hirtodrosophila morgani	Hir_morg	0,02	ı	0,03	0,00		0,00	0,03		0,04

Drosophilidae	² Hirtodrosophila subflavohalterata	Hir_sub	0,17	0,03	0,18	0,30	0,00	0,36	0,05	0,04	0,07
Drosophilidae	¹ Hirtodrosophila subgilva	Hir_subg	0,02		0,03	0,00	ı	0,00	0,04	ī	0,06
Drosophilidae	¹ Leucophienga (SB16009)	Leu_sp1	0,04	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,04	0,05	0,05
Drosophilidae	² Mycodrosophila elegans	Myc_ele	0,02	0,03		0,00	0,00		0,03	0,05	·
Drosophilidae	¹ Mycodrosophila neoprojectans	Myc_neo	0,51	0,25	0,58	0,03	0,00	0,14	0,05	0,06	0,07
Drosophilidae	¹ Mycodrosophila projectans	Myc_pro	0,30	0,14	0,29	0,08	0,09	0,04	0,05	0,07	0,06
Drosophilidae	¹ Mycodrosophila pseudoprojectans	Myc_pse	0,17	0,14	0,11	0,06	0,05	0,04	0,05	0,06	0,07
Drosophilidae	¹ Paraliodrosophila antennata	Par_ant	0,38	0,31	0,29	0,09	0,09	0,04	0,05	0,07	0,07
Drosophilidae	¹ Zygothrica aff. subcandens	Zyg_sub	0,02		0,03	0,00	·	0,00	0,05	ı	0,06
Drosophilidae	² Zygothrica poeyi	Zyg_poe	0,11		0,13	0,01	,	0,01	0,05	·	0,06
Drosophilidae	¹ Zygothrica virgatalba	Zyg_vir	0,02	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,06
Fungos	² Agaricales sp.1	Aga_sp1	0,17	0,06	0,24	0,02	0,00	0,02	0,02	0,02	0,03
Fungos	¹ Agaricales sp.2	Aga_sp2	0,13		0,12	0,02	,	0,02	0,02	·	0,03
Fungos	¹ Agaricales sp.3	Aga_sp3	0,30	0,18	0,35	0,07	0,03	0,07	0,02	0,03	0,03
Fungos	² Agaricales sp.4	Aga_sp4	0,04		0,06	0,00	ı	0,00	0,02	ı	0,03
Fungos	² Auricularia polytricha	Aur_pol	0,09		0,12	0,00	ŀ	0,00	0,01	ı	0,02
Fungos	² Auricularia sp.2	Aur_sp2	0,09		0,12	0,00	ı	0,00	0,01	ı	0,02
Fungos	¹ Favolus tenuiculus	Fav_ten	0,52	0,53	0,53	0,08	0,07	0,07	0,02	0,03	0,03
Fungos	² Fomes fasciatus	Fom_fas	0,04	0,06	ı	0,00	0,00	,	0,02	0,03	ı

Fungos	² Ganoderma australe	Gan_aus	0,13	0,18	·	0,00	0,00	I	0,02	0,03	ı
Fungos	¹ Gerronema sp.1	Ger_sp1	0,13	0,18	0,12	0,01	0,05	0,02	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Gerronema sp.2	Ger_sp2	0,26	0,12	0,29	0,03	0,03	0,07	0,02	0,03	0,03
Fungos	² Gerronema sp.3	Ger_sp3	0,22		0,29	0,06	ı	0,07	0,02	ı	0,03
Fungos	² Gymnopus sp.	Gym_sp	0,04		0,06	0,00		0,00	0,02	ı	0,02
Fungos	² Gymnopus sp.1	Gym_sp1	0,09		0,12	0,01		0,02	0,02	ı	0,03
Fungos	¹ Gymnopus sp.3	Gym_sp3	0,22	0,06	0,29	0,05	0,00	0,07	0,02	0,02	0,03
Fungos	¹ Gymnopus sp.4	Gym_sp4	0,09	0,06	0,12	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,03
Fungos	¹ Hemimycena sp.1	Hem_sp1	0,17	0,18	0,12	0,07	0,10	0,06	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Hydropus aff. caespitosus	Hyd_cae	0,09	0,06	0,12	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02	0,03
Fungos	² Hydropus sp.1	Hyd_sp1	0,04		0,06	0,00	·	0,00	0,02	ı	0,02
Fungos	¹ Hydropus sp.2	Hyd_sp2	0,22	0,06	0,29	0,02	0,00	0,02	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Hydropus sp.3	Hyd_sp3	0,09	0,06	0,06	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02	0,03
Fungos	² Lactocollybia cf. angiospermarum	Lac_cf_ang	0,09		0,12	0,01		0,02	0,02	ı	0,03
Fungos	¹ Lactocollybia sp.	Lac_sp	0,17	0,06	0,24	0,02	0,00	0,04	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Lentinula raphanica	Len_rap	0,35	0,29	0,47	0,05	0,07	0,07	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Marasmiellus aff. volvatus	Mas_aff_vol	0,13	0,12	0,12	0,04	0,00	0,00	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Marasmiellus volvatus	Mar_vol	0,30	0,29	0,24	0,08	0,16	0,04	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Marasmius sp.3	Mas_sp3	0,13	0,12	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,03

Fungos	² Nigrofomes melanoporus	Nig_mel	0,09	0,12	ı	0,01	0,00	I	0,02	0,03	ı
Fungos	² Oudemansiella cubensis	Oud_cub	0,04	0,06	ı	0,00	0,00	,	0,02	0,03	ı
Fungos	¹ Panus sp.1	Pan_sp1	0,09	0,12	0,06	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02
Fungos	¹ Perenniporia stipitata	Per_sti	0,17	0,18	0,12	0,02	0,07	0,04	0,02	0,03	0,03
Fungos	² Phellinus gilvus	Phe_gil	0,04	0,06	ı	0,00	0,00		0,02	0,02	ı
Fungos	² Polyporaceae sp.1	Pol_sp1	0,17	0,24	ı	0,02	0,03		0,02	0,03	ı
Fungos	² Polyporales sp.2	Polyp_sp2	0,09	0,12	ı	0,01	0,07		0,02	0,03	ı
Fungos	¹ Polyporus guianensis	Pol_gui	0,22	0,24	0,12	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Polyporus sp.1	Poly_sp1	0,22	0,12	0,29	0,03	0,01	0,07	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Polyporus sp.2	Poly_sp2	0,09	0,06	0,06	0,01	0,00	0,00	0,02	0,03	0,02
Fungos	¹ Pseudofavolus cucullatus	Pse_cuc	0,17	0,18	0,06	0,02	0,01	0,00	0,02	0,03	0,02
Fungos	¹ Rigidoporus biokoensis	Rig_bio	0,30	0,29	0,29	0,06	0,07	0,11	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Rigidoporus lineatus	Rig_lin	0,13	0,06	0,12	0,02	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02
Fungos	² Rigidoporus microporus	Rig_mic	0,04		0,06	0,00	I	0,00	0,02	ı	0,02
Fungos	² Rigidoporus sp.1	Rig_sp1	0,04	ŀ	0,06	0,00	I	0,00	0,02	I	0,02
Fungos	¹ Trametes lactnea	Tra_lac	0,30	0,24	0,18	0,09	0,16	0,04	0,02	0,03	0,03
Fungos	¹ Trametes membranacea	Tra_mem	0,04	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02
Fungos	¹ Tricholomopsis aurea	Tri_aur	0,13	0,12	0,18	0,02	0,00	0,02	0,02	0,02	0,03
Fungos	² <i>Xylaria</i> sp.1	Xyl_sp1	0,04	0,06	·	0,00	0,00		0,02	0,02	ı

ı.
0,03
0,02
0,04
0,00
ı
0,12
0,09
Xyl_sp2
² <i>Xylaria</i> sp.2
Fungos

¹ Espécies comuns nas duas camadas.
² Espécies que não foram comuns nas duas camadas.

ARMBRUSTER, W. S. Exaptations link evolution of plant-herbivore and plantpollinator interactions: a phylogenetic inquiry. Ecology 778, p. 1661–1672, 1997.

ASHBURNER, M. Entomophagous & other bizarre Drosophilidae. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, JR. J. N. (Eds). The Genetics and Biology of *Drosophila*. Vol. 3a, London, Academic Press, 1981. p. 395–429.

BASCOMPTE, J.; JORDANO, P. *Plant–animal mutualistic networks: The architecture of biodiversity*. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 38, p. 567–593, 2007.

BASCOMPTE, J.; JORDANO, P. Mutualistic networks. Princeton: Princeton University Press, 2014.

BLÜTHGEN, N.; MENZEL, F.; BLÜTHGEN, N. Measuring specialization in species interaction networks. BMC Ecology, 6, 1–12, 2006.

BASTOLLA, U.; FORTUNA, M. A.; PASCUALGARCÍA, A.; FERRERA, A.; LUQUE, B.; BASCOMPTE, J. *The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity*. Nature 458, p. 1018–1020, 2009.

BATAGELI, V.; MRVAR, A. Pajek: analysis and visualization of large networks. – Preprint Series 41, 1–18, 2003.

BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting linear mixed effects models using lme4. Journal of Statistical Software, 67, p. 1–48, 2015.

BECKETT, S. J. Improved community detection in weighted bipartite networks. – Royal Society Open Science 3, 1–18, 2016.

BOCCALETTI, S.; BIANCONI, G.; CRIADO, R.; DEL GENIO, C.I.; GÓMEZGARDEÑES, J.; ROMANCE, M.; SENDIÑANADAL, I.; WANG, Z.; ZANIN, M. The structure and dynamics of multilayer networks. Physics Reports, 544, p. 1–122, 2014.

BRONSTEIN, J. L. Mutualism. Oxonia: Oxford University Press, 2015.

BRUNS, T. D. Insect mycophagy in the Boletales: Fungivore diversity and the mushroom habitat. In: WHEELER, Q.; BLACKWELL, M. (Eds). Fungus Insect Relationships, Perspectives in Ecology and Evolution: Columbia University Press, New York, New York, 1984. p. 91–129

BURLA, H. Die Drosophilid engattung *Zygothrica* und ihre beziehung zur *Drosophila*– untergattung *Hirtodrosophila*. Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum, 32, p. 189–321, 1956.

BURLA, H.; BÄCHLI, G.; HUBER, H. *Drosophila* reared from the stinkhorn, *Phallus impudicus*, near Zurich, Switzerland. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 29, p. 97–107, 1991.

CARSON H. L. The ecology of *Drosophila* breeding sites. Honolulu: University of Hawaii, 1971.

CHACOFF, N. P.; VÁZQUEZ, D. P.; LOMÁSCOLO, S. B.; STEVANI, E. L.; DORADO, J.; PADRÓN, B. Evaluating sampling completeness in a desert plant-pollinator network. Journal of Animal Ecology, 81, p. 190–200, 2012.

CHARLESWORTH, P.; SHORROCKS, B. The reproductive biology and diapause of the British fungal breeding *Drosophila*, Ecological Entomology, 5, p. 315–326, 1980.

COOPER, D. M. Food Preferences of Larval and Adult *Drosophila*. Evolution 14, p. 41–55, 1960.

COURTNEY, S. P.; KIBOTA, T. T.; SINGLETON T. A. Ecology of mushroom feeding Drosophilidae. Advances in Ecological Research, 20, p. 225–274, 1990.

DEHLING, D. M.; TÖPFER, T.; SCHAEFER, H. M.; JORDANO, P.; BÖHNINGGAESE, K.; SCHLEUNING, M. Functional relationships beyond species richness patterns: trait matching in plant–bird mutualisms across scales. Global Ecology and Biogeography, 23, p. 1085–1093, 2014.

DEHLING, D. M.; JORDANO, P.; SCHAEFER, H. M.; BÖHNINGGAESE, K.; SCHLEUNING, M. Morphology predicts species' functional roles and their degree of specialization in plant–frugivore interactions. Proceedings Royal Socciety B, 283, 1–17, 2016.

DEVOTO, M.; BAILEY, S.; CRAZE, P.; MEMMOTT, J. Understanding and planning ecological restoration of plant-pollinator networks. Ecology Letter, 15, p. 319–328, 2012.

DORMANN, C. F. How to be a specialist? Quantifying specialisation in pollination networks. Network Biology 1, p. 1–20, 2011.

DORMANN, C. F.; GRUBER, B.; FRUEND, J. Introducing the bipartite package: analyzing ecological networks. R News, 8, p. 8–11, 2008.

DORMANN, C. F.; STRAUSS, R. A method for detecting modules in quantitative bipartite networks. Methods in Ecology and Evolution, 5, p. 90–98, 2014.

EPPS, M. J.; ARNOLD, A. E. Diversity, abundance and community network structure in sporocarp associated beetle communities of the central Appalachian Mountains. Mycologia, 102, p. 785–802, 2010.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. Guia de coleta, preservação e herborização de material botânico. Manual no. 4, São Paulo: Instituto de Botânica, 1989.

FOX, J.; WEISBERG, S. An R Companion to Applied Regression. Thousand Oaks, US, 2018.

FROTA-PESSOA, O. Sobre o subgênero "*Hirtodrosophila*", com descrição de uma nova espécie (Diptera, Drosophilidae, *Drosophila*). Revista Brasileira de Biologia, 5, p. 469–483, 1945.

FURTADO, J. S. Taxonomy of Amauroderma (Basidiomycetes, Polyporaceae). Memoirs of the New York Botanical Garden, 34, p. 1–109, 1981.

GANTER, P. F. Yeast and Invertebrate Associations. In: ROSA, C.; PÉTER G. (Eds). The Yeast Handbook. New York: Springer Verlag, 2006. p. 303–370.

GENINI, J.; MORELLATO, L. P. C.; GUIMARÃES JR., P. R.; OLESEN, J. M Cheaters in mutualism networks. Biology Letters, 22, p. 1–5, 2010.

GENRICH, C. M.; MELLO, M. A.; SILVEIRA, F. A.; BRONSTEIN, J. L.; PAGLIA, A. P. Duality of interaction outcomes in a plant–frugivore multilayer network. – Oikos 126, p. 361–368, 2017.

GOTELLI, N. J.; COLWELL, R.K. Estimating species richness. In: MAGURRAN, A. E. & MCGILL, B. J. (Eds). Biological diversity: Frontiers in measurement and assessment. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 39–54.

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

GUIMERÀ, R.; AMARAL, L. A. N. Cartography of complex networks: modules and universal roles. Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment, P02001): P020011–P0200113, 2005.

GRAINGER, J. Ecology of the larval fungi. Transactions of the British Mycological Socciety, 29, p. 52–63, 1946.

GRIMALDI D. A. Phylogenetics and taxonomy of *Zygothrica* (Diptera: Drosophilidae). Bulletin of the American Museum of Natural History, 186, p. 103–268, 1987. GRIMALDI, D. A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). Bulletin of the American Museum of Natural History, 197, p. 1–139, 1990.

GRIMALDI, D.; JAENIKE, J. Competition in natural populations of mycophagous *Drosophila*. Ecology, 64, p. 1113–1120, 1984.

HANSKI I. Fungivory: fungi, insects and ecology. Em: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JB (eds) Insectfungus interaction. Academic PRESS, LONDON, PP. p. 25–68, 1989.

HENDEL, F. Ergebnisse einer zoologischen Sammelreise nach Brazilien insbesondere in das Amazonasgebiet, ausgefuhrt von Dr. H. Zerny. X. Teil. Diptera. Muscidae acalyptratae (excl. Chloropidae). Annalen des Kaiserlichkoniglichen Naturhistorischen, 47, p. 61–106, 1936.

HOSAKA, K.; UNO, K. A preliminary Survey on Larval Diversity in Mushroom Fruit Bodies. Bulletin *of the* National Museum of Nature *and* Science Series B, *(*Botany), 38, p. 77–85, 2012.

JAENIKE, J. Host selection by mycophagous *Drosophila*. Ecology, 59, p.1286–1288, 1978.

KIMURA, M. T. *Drosophila* survey of Hokkaido, XXXII. A field survey of fungus preferences of Drosophilid flies in Sapporo. Journal of the Faculty of Science Hokkaido University, 20, p. 288–298, 1976.

KIMURA, M.T.; BEPPU, K.; ICHIJO, N.; TODA, M.J. Bionomics of Drosophilidae (Diptera) in Hokkaido. II. *Drosophila testacea*. Kontyû,4 6, p. 585–595, 1978.

KIRK, P. M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. CAB International, Wallingford, 2008.

LACY, R.C. Predictability, toxicity, and trophic niche breadth in fungus feeding Drosophilidae (Diptera). Ecological Entomology, 9, p. 43–54, 1984.

LAGANÀ, A.; ANGIOLINI, C.; LOPPI, S.; SALERNI, E.; PERINI, C.; BARLUZZI, C.; DE DOMINICIS, V. Periodicity, fluctuations and successions of macrofungi in fir forest (Abies alba Miller) in Tuscany, Italy. Forest Ecology and Management, 169, p. 187–202, 2002.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. Numerical ecology. Developments in Environmental Modelling, 3rd ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 2012.
LEWINSOHN T. M.; LOYOLA, R. D.; PRADO, P.I. Matrizes, redes e ordenações: a detecção de estrutura em comunidades interativas. Oecologia Brasiliensis, 10, p. 90– 104, 2006.

LISBOA, P. L. B. A Estação Científica Ferreira Penna/ECFPn (1993–2000). Em: LISBOA, P. L. B. (Ed.). Caxiuanã: Populações tradicionais, meio físico e diversidade biológica. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 35–55. 2007.

MAGLIANESI, M.A.; BLÜTHGEN, N.; BÖHNINGGAESE, K.; SCHLEUNING, M. Morphological traits determine specialization and resource use in plant–hummingbird networks in the Neotropics. Ecology, 95, p. 3325–3334, 2014.

MARTIN, M. M. Biochemical implications of insect mycophagy. Biological Reviews, 54, p.1–21, 1979.

MARTÍN GONZÁLEZ, A. M.; DALSGAARD, B.; OLESEN, J. Centrality measures and the importance of generalist species in pollination networks. Ecological Complexity, 7, p. 36–43, 2010.

MATAVELLI, C.; CARVALHO, M. J. A.; MARTINS, N. E.; MIRTH, C. K. Differences in larval nutritional requirements and female oviposition preference reflect the order of fruit colonization of *Zaprionus indianus* and *Drosophila simulans*. J. Insect Physiol. 82, p. 66–74, 2015.

MELIÁN, C. J.; BASCOMPTE, J.; JORDANO, P.; KRIVAN, V. Diversity in a complex ecological network with two interaction types. Oikos, 118, p. 122–130, 2009.

MELLO, M. A. R; RODRIGUES, F. A.; COSTA, L. DA F.; KISSLING, W. D.; ŞEKERCIOĞLU, C. Ë. H.; MARQUITTI, F. M. D.; KALKO, E. K. V. Keystone species in seed dispersal networks are mainly determined by dietary specialization. Oikos, 124, p. 1031–1039, 2015.

NEWMAN, M. Modularity and community structure in networks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 23, p. 8577–8582, 2006.

NOOY, W.; MRVAR, A.; BATAGELJ, V. Exploratory social network analysis with Pajek. New York: Cambridge University Press, 2005.

OAKESHOTT, J.G.; VACEK, D.C.; ANDERSON, P.R. Effects of microbial floras on the distributions of 5 domestic *Drosophila* species across fruit resources. Oecologia, 78, p. 533–541, 1989.

OLESEN, J. M.; BASCOMPTE J.; DUPONT Y.L.; JORDANO P. The modularity of pollination networks. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, p. 19891–19896, 2007.

OLITO, C.; FOX, J.W. Species traits and abundances predict metrics of plant – pollinator network structure, but not pairwise interactions. Biotropica, 000, p. 001–009, 2014.

PAINE, R. T. A note on trophic complexity and community stability. The American Naturalist, 103, p. 91–93, 1969.

PARSONS, P. Lek behaviour in *Drosophila* (*Hirtodrosophila*) *polypori* Malloch an Australian rainforest species. Evolution, 31, p. 223–225, 1977.

PATEFIELD, W. M. Algorithm AS 159: An efficient method of generating random R x C tables with given row and column totals. Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics), 30, p. 91–97, 1981.

PILOSOF, S.; PORTER, M. A.; PASCUAL, M.; KÉFI, S. Ecological multilayer networks: a new frontier for network ecology. Nature Ecology and Evolutuion, 01, p. 1–9, 2017.

POWELL, J. R. Progress and prospects in evolutionary biology: the *Drosophila* model. Oxford University Press: New York, 1997.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. URL. 2016

ROHLFS, M.; KURSCHNER, L. Saprophagous insect larvae, *Drosophila melanogaster*, profit from increased species richness in beneficial microbes. Journal of Applied Entomology, 134, p. 667–671, 2010.

ROQUE, F.; FIGUEIREDO, R.; TIDON, R. Nine new records of drosophilids in the Brazilian savanna. Drosophila Information Service, 89, p. 14–17, 2006.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B., CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia* Antarctica Desv. (Poaceae). Polar Biology, 32, p. 161–167, 2009.

ROHÁČEK, J.; ŠEVČÍK, J. Diptera associated with sporocarps of Meripilus giganteus in an urban habitat. Central European Journal of Biology, 8, p. 143–167, 2013.

ROUQUETTE, J.; DAVIS, A.J. *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae) oviposition patterns on fungi: The effect of allospecifics, substrate toughness, ovipositor structure and degree of specialisation. European Journal of Entomology, 100, p. 351–355, 2003. ROWLAND, L.; DA COSTA, A. C. L.; OLIVEIRA, A. A. R.; ALMEIDA, S. S.;

FERREIRA, L. V.; MALHI, Y.; METCALFE, D. B.; MENCUCCINI, M.; GRACE, J.; MEIR, P. Shock and stabilization following long term drought in tropical forest from 15 years of litterfall dynamics. Journal of Ecology, 106, p. 1673–1682, 2018.

RYVARDEN, L. Genera of Polypores: nomenclature and taxonomy. Synopsis Fungorum, 5, p. 1–373, 1991.

RYVARDEN, L. Neotropical Polypores. Part 1. Synopsis Fungorum, 19, p. 1–227, 2004.

RYVARDEN, L.; JOHANSEN, I. A preliminary Polypore Flora of East Africa. Oslo: Fungiflora, 1980.

SANTA-BRÍGIDA, R. Estrutura da interação dos Drosophilidae micófagos na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil. 2015. p. 94. MSc Dissertation, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 2015.

SANTA-BRÍGIDA, R.; WARTCHOW F.; MEDEIROS P. S. GOTTSCHALK, M. S., MARTINS, M. B.; DE CARVALHO, C. J. B. Mycophagous Drosophilidae (Diptera) guild and their hosts in the Brazilian Amazon. Papéis Avulsos de Zoologia., 59, p. 1–10, 2019.

STURTEVANT, A. H. The North American species of *Drosophila*. Carnegie Institution of Washington Publication, 301, p. 1–150, 1921.

SHORROCKS, B.; CHARLESWORTH, P. The distribution and abundance of the British fungal breeding *Drosophila*. Ecological Entomology, 5, p. 61–78, 1980.

SNODGRASS, R. E. Principles of insects morphology. Cornell: Cornell University Press, 1953.

TEIXEIRA, A. R. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual no. 6, São Paulo: Instituto de Botânica, 1995.

TODA, M. J.; KIMURA, M. T., TUNO, N. Coexistence mechanisms of mycophagous drosophilids on multispecies fungal hosts: Aggregation and resource partitioning. Journal of Animal Ecology, 68, p. 794–803, 1999.

THÉBAULT, E.; FONTAINE, C. Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks, Science, 329, p. 853–856, 2010.

THOMPSON, J. N. Natural Selection, Coevolution, and the Web of Life. American Society of Naturalists, 183: ivv, 2014.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: KING, R.C. (Ed.). Handbook of Genetics. New York: Plenum Press, 1975, p. 421–469.

TUNO, N. Insect feeding on spores of a bracket fungus, *Elfvingia applanata* (Pers.) Karst. (Ganodermataceae, Aphyllophorales). Ecological Research, 14, p. 97–103, 1999.

VALER, F. B.; BERNARDI, E.; MENDES, M. F.; BLAUTH, M. L.; GOTTSCHALK, M. S. Diversity and associations between Drosophilidae (Diptera) species and Basidiomycetes in a Neotropical forest. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88, p. 1–14, 2016.

VAN KLINKEN, R. D.; WALTER, G. H. Larval hosts of Australian Drosophilidae (Diptera): A field survey in subtropical and tropical Australia. Australian Journal of Entomology, 40, p. 163–179, 2001.

VAZQUEZ, D.P.; CHACOFF, N.P.; CAGNOLO, L. Evaluating multiple determinants of the structure of plant-animal mutualistic networks. Ecology, 90, p. 2039–2046, 2009.

VERDÚ, M.; VALIENTE-BANUET, A. The relative contribution of abundance and phylogeny to the structure of plant facilitation networks. Oikos, 120, p. 1351–1356, 2011.

VIDAL, M. C.; SENDOYA, S. F.; OLIVEIRA, P. Mutualism exploitation: predatory drosophilid larvae sugar trap ants and jeopardize facultative ant-plant mutualism. Ecology, 97, p. 1650–1657, 2016.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft, 63, p. 1–332, 1990.

VILELA, C.R.; BÄCHLI, G. On the identities of nine Neotropical species of *Hirtodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft, 77, p. 161–195, 2004.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Revision of the Neotropical genus *Paraliodrosophila* (Diptera, Drosophilidae). Mitteilungen der Schweizerische Entomologischen Gesellschaft, 80, p. 291–317, 2007.

WERTHEIM, B.; SEVENSTER, J. G.; EIJS, I.E.M.; VAN ALPHEN, J.J.M. Species diversity in a mycophagous insect community: The case of spatial aggregation vs. resource partitioning. Journal of Tropical Ecology, 69, p. 335–351, 2000.

WHEELER, M. R.; TAKADA, H. A revision of the American Species of *Mycodrosophila* (Diptera; Drosophilidae). Annals of the Entomological Society of America, 36, p. 391–399, 1963.

WORTHEN, W.B.; BLOODWORTH, B.R.; HOBBS, M.B. Habitat variability in the effects of predation and microclimate on mycophagous fly communities. Ecography, 18, p. 248–258, 1995.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

YAMASHITA, S.; HIJII, N. Effects of mushroom size on the structure of a mycophagous arthropod community: Comparison between infracommunities with different types of resource utilization. Ecological Research, 18, p. 131–143, 2003.

YAMASHITA, S.; HIJII, N. Relationships between seasonal appearance and longevity of fruitbodies of Agaricales and meteorological factors in a Japanese red pine forest. Journal of Forest Research, 9, p. 165–171, 2004.

YAMASHITA, S.; HIJII, N. The role of fungal taxa and developmental stage of mushrooms in determining the composition of the mycophagous insect community in a Japanese forest. European Journal of Entomology,104, p. 225–233, 2007.