

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 18/03/2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Luís Fernando Segala

**Diferenciação populacional em *Drosophila sturtevanti*
(subgrupo *sturtevanti*, grupo *saltans*) avaliada por
morfometria geométrica da asa e do edeago**

São José do Rio Preto
2019

Luís Fernando Segala

**Diferenciação populacional em *Drosophila sturtevanti*
(subgrupo *sturtevanti*, grupo *saltans*) avaliada por
morfometria geométrica da asa e do edeago**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética junto ao Conselho do Programa de Pós-graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Madi Ravazzi
Coorientador: Prof. Dr. Rogério P. Mateus

São José do Rio Preto
2019

S454d Segala, Luís Fernando.
Diferenciação populacional em *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*, grupo *saltans*) avaliada por morfometria geométrica da asa e do edeago / Luís Fernando Segala. -- São José do Rio Preto, 2019
106 p. : tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Lilian Madi-Ravazzi
Coorientador: Rogério Pincela Mateus

1. Evolução. 2. *Drosophila*. 3. Morfometria Geométrica. 4. Diferenciação Populacional. 5. Mata Atlântica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a). Essa ficha não pode ser modificada.

Luís Fernando Segala

**Diferenciação populacional em *Drosophila sturtevanti*
(subgrupo *sturtevanti*, grupo *saltans*) avaliada por
morfometria geométrica da asa e do edeago**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a Dr^a Blanche Cristine Pires de Bitner-Mathé
UFRJ – Rio de Janeiro

Prof^a Dr^a Maura Helena Manfrin
USP – Ribeirão Preto

Prof^a Dr^a Mary Massumi Itoyama
UNESP- São José do Rio Preto

Prof Dr Eduardo Fernando Santos
UNESP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
18 de março de 2019

A meus pais Antonio e Luiza (*in memoriam*), à milha esposa Deise e às minhas filhas Camila e Ana Luísa, dedico.

AGRADECIMENTOS

Pesquisa é algo que não se faz sozinho. Precisa de gente, ainda que para um papo amigo. Quando comecei a estudar drosófilas, apesar de ter me preparado alguns anos estudando a rotina do *Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de Drosophila*, não sabia ao certo quão específica era esta área. Não imaginava que houvesse até um simpósio bienal apenas para se falar desta mosquinha. Mas as coisas foram acontecendo e um bocado de gente me ajudando a formatar o pensamento deste trabalho todo, assim, preciso agradecer tanta gente que talvez alguns acabem sendo esquecidos. De toda forma, agradeço a todos os que contribuíram nesta minha etapa.

Agradeço a compreensão da minha família nas muitas vezes que estive ausente ao convívio das coisas simples (e que são as mais importantes), para correr atrás de minhas moscas. Principalmente agradeço à minha esposa Deise Regis Segala e às minhas filhas Camila Regis Segala e Ana Luísa Regis Segala pelo convívio diário.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra Lilian Madi-Ravazzi, por acreditar na possibilidade de alguém com formação em exatas tornar-se doutor em Biologia. Agradeço ao meu coorientador, Professor Dr Rogério Pincela Mateus, pelas inúmeras sugestões. Ao pessoal do *Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de Drosophila*, pelo companheirismo em todas as fases deste trabalho. Muito devo a eles e talvez fosse mais correto inserir seus nomes como coautores, tão grandes foram suas colaborações. Obrigado Bruna Memari Trava, Samara Videira Zorzato, Bruna Emília Roman, Gabriel Accioly Trípode, Rafael Miyazaki, Jéssica Fernanda Paixão e Larissa Gonçalves dos Santos.

Devo agradecer imensamente ao Sebastião “Tião” Dias Barbosa e sua equipe que faz com que seja possível a manutenção do estoque, organizando as garrafas, as rolhas e fazendo o meio de cultura, sem esquecer da panelinha de pipoca, de vez em quando.

Agradeço ainda aos companheiros do Laboratório do Professor Dr. Classius de Oliveira e do Laboratório da Professora Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pelo empréstimo dos microscópios e lupas com câmeras fotográficas e pela enorme disponibilidade em me acompanhar na obtenção das

imagens das asas e edeagos. Agradeço especialmente à Maysa Succi Domingues que não poupou esforços para me auxiliar neste sentido.

Agradeço ainda aos companheiros de trabalho e alunos das escolas onde leciono (Coopec, Invictus, Unirp e Doutor Concursos), por tantas vezes suportarem meus papos sobre drosófilas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

*Minha mãe achava estudo
a coisa mais fina do mundo.
Não é.
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.
Aquele dia de noite, o pai fazendo serão,
ela falou comigo:
"Coitado, até essa hora no serviço pesado".
Arrumou pão e café,
deixou tacho no fogo com água quente.
Não me falou em amor.
Essa palavra de luxo.*

(Adélia Prado, 2015, p. 87)

RESUMO

A morfometria da asa e do edeago tem sido amplamente utilizada para estudar a evolução das espécies do gênero *Drosophila* pois são caracteres altamente sensíveis a variação genética e ambiental. No presente trabalho utilizamos esta técnica em um estudo populacional de *Drosophila sturtevanti* com ênfase em moscas procedentes de áreas de Mata Atlântica do Brasil e da Floresta Tropical Úmida da Costa Rica. Para isto utilizamos as asas e edeagos de machos destas populações e analisamos o nível de diferenciação quanto a estes marcadores discutindo sua associação com sua localização geográfica, a fitofisionomia do fragmento de mata, a umidade relativa média anual, a temperatura média anual e a área do fragmento de mata. Os resultados indicaram a existência de uma estruturação latitudinal tanto para o tamanho e a forma da asa como para a forma do edeago, além de correlação entre estas características e algumas variáveis ambientais. A diferenciação quanto à forma do edeago, entretanto, foi menos significativa que a diferenciação da forma e do tamanho da asa. A relação entre forma e tamanho das asas obtida foi divergente dos resultados encontrados para outras espécies de *Drosophila*, apresentando asas maiores e mais arredondadas nas populações da faixa latitudinal Sul 1 (PIR, AGU e RDI) e asas menores mais alongadas em uma população da faixa latitudinal Nordeste (CUR). As populações da Costa Rica (TIR e LSA) e as populações do Sul mostraram divergência significativa para os marcadores avaliados, entretanto, as populações da faixa latitudinal Sudeste (MAT, NGR, SDC, PIC e VIT) não apresentaram estruturas congruentes e foram melhor agrupadas por fitofisionomias. Os resultados apresentados refletem a diferenciação genética em curso nas populações de *D. sturtevanti*, sendo acentuada para as procedentes da América Central e as do Sul do Brasil, indicando a ocorrência de diferenciação populacional quanto aos marcadores estudados e que podem ser um reflexo da existência de novas espécies deste subgrupo, que já tinha sido sinalizado em estudos anteriores e também em estudos recentes do nosso laboratório com marcadores moleculares para estas mesmas populações.

Palavras-chave: Diferenciação populacional. Plasticidade fenotípica. *Cline* latitudinal. Evolução morfológica. Especiação.

ABSTRACT

Wing and aedeagus morphometry have been widely used to study the evolution of species of the genus *Drosophila* because they are highly sensitive characters to genetic and environmental variation. In this present research we use this technique in a populational study of *Drosophila sturtevanti* with emphasis on flies coming from Atlantic Forest areas of Brazil and the Tropical Rainforest of Costa Rica. For that we use the wings and aedeagus of males of these populations and we analyzed the level of differentiation regarding these markers discussing their association with its geographic location, the phytophysiology of the forest fragment, the average annual relative humidity, the annual average temperature and the area of the forest fragment. The results indicated the existence of a latitudinal structure for both the size and shape of the wing and the shape of the aedeagus, besides the correlation between these characteristics and some environmental variables. The differentiation in the form of aedeagus, however, was less significant than the differentiation of the shape and size of the wing. The relation obtained between the shape and size of the wings was divergent from the results found for other *Drosophila* species, presenting bigger and more rounded wings in the populations of South 1 latitude (PIR, AGU and RDI) and smaller and elongated wings in a population from the Northeast latitude range (CUR). The populations of Costa Rica (TIR and LSA) and the South population showed significant divergence for the markets evaluated, however, the populations of the Southeast latitudinal range (MAT, NGR, SDC, PIC and VIT) did not present congruent structures and were better grouped by phytophysiological variables. The present results reflect the genetic differentiation in course in *D. Sturtevanti* populations, being accentuated for those coming from Central America and those from Southern Brazil, indicating the occurrence of an differentiation in relation to markers studied and that may reflect the existence of new species of this subgroup, which had already been signaled in previous studies and in recent studies of our laboratory with molecular markers for these same populations.

Keywords: Populational differentiation. Phenotypic plasticity. Latitudinal cline.
Morphological evolution. Speciation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Locais de coleta	38
Figura 2: Vista lateral do edeago e do arco entre o ápice e o processo ventral	40
Figura 3: Variações dos contornos dos edeagos para os sete componentes principais estudados	42
Figura 4: Análise de <i>cluster</i> para o edeago total	44
Figura 5: Distribuição das 15 populações em relação ao edeago total	45
Figura 6: Contornos médios da região contendo o arco entre o ápice e o processo ventral	47
Figura 7: Análise de <i>cluster</i> para o edeago parcial	48
Figura 8: Distribuição das 15 populações em relação ao edeago parcial	50

CAPÍTULO II

Figura 1: Locais de coleta	71
Figura 2: Imagem lateral da asa com os marcos anatômicos	73
Figura 3: Médias e intervalos de confiança (95%) para os tamanhos dos centroides	74
Figura 4: Diagrama de dispersão entre latitudes e coeficiente de variação dos logaritmos dos centroides	76
Figura 5: Marcadores mais variáveis nos dois componentes principais estudados	77
Figura 6: Diagrama de dispersão comparando as variações na forma das asas	78

Material suplementar

Figura 1: Forma das asas de cada uma das populações em relação à variável PC1	97
Figura 2: Diagrama de dispersão comparando as variações na forma das asas segundo as variáveis fitofisionomia e faixa latitudinal	98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Dados das populações estudadas	37
Tabela 2: Comparações par-a-par entre as populações	43
Tabela 3: Resultados para o teste de Levene, para igualdade de variâncias, e de para o Teste de Kruskal-Wallis	46

CAPÍTULO II

Tabela 1: Dados das populações estudadas	70
Tabela 2: Valores de F e p da ANOVA para tamanho e forma das asas	75

Material suplementar

Tabela 1: Coeficientes dos dois componentes principais estudados	93
Tabela 2: Porcentagens de reclassificação errônea obtidas por Análise de Função Discriminante	94
Tabela 3: Distâncias de Mahalanobis entre as populações recém-coletadas	95
Tabela 4: Distâncias de Procrustes entre as populações recém-coletadas	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O grupo <i>saltans</i> e o subgrupo <i>sturtevanti</i>	16
1.2 Morfometria	19
1.3 Marcadores morfológicos: asa e edeago	23
2 OBJETIVOS	29
3 CAPÍTULO I - Diferenciação populacional da morfologia do edeago em <i>Drosophila sturtevanti</i> (Diptera, Drosophilidae, grupo <i>saltans</i> , subgrupo <i>sturtevanti</i>) após recente expansão demográfica	30
4 CAPÍTULO II - Plasticidade fenotípica e <i>clines</i> em populações geográficas de <i>Drosophila sturtevanti</i> (Diptera, Drosophilidae, grupo <i>saltans</i> , subgrupo <i>sturtevanti</i>) avaliadas pela morfometria das asas	63
4.1 Material Suplementar	93
5 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 O grupo *saltans* e o subgrupo *sturtevanti* de *Drosophila*

Segundo a base de dados *online* Taxodros (<https://www.taxodros.uzh.ch>), a família *Drosophilidae* possui aproximadamente 4500 espécies sendo aproximadamente 1000 na subfamília *Steganinae* e 3500 na subfamília *Drosophilinae*. A subfamília *Drosophilinae* subdivide-se em 48 gêneros, dentre os quais o gênero *Drosophila* com aproximadamente 2000 espécies.

O grupo *saltans* pertencente ao subgênero *Sophophora* forma juntamente com o grupo *willistoni* os dois grupos da radiação do Novo Mundo (STURTEVANTI, 1942; THROCKMORTON, 1975). A literatura menciona que o grupo é constituído por 21 espécies incluídas em cinco subgrupos: *cordata* (2 espécies), *elliptica* (4 espécies), *parasaltans* (2 espécies), *sturtevanti* (5 espécies) e *saltans* (7 espécies) (MAGALHÃES; BJÖRNBERG, 1957, MAGALHÃES, 1962, MOURÃO; BICUDO, 1967).

As espécies do grupo *saltans* são distribuídas do México ao Rio Grande do Sul - Brasil (MAGALHÃES, 1962; MOURÃO; BICUDO, 1967; SOUZA et al., 2014). Os subgrupos *parasaltans* e *cordata* são encontrados na região Neotropical e os subgrupos *elliptica*, *sturtevanti* e *saltans* são encontrados em ambas regiões, Neotropical e Neoártica (MAGALHÃES, 1962).

Alguns trabalhos discutiram a filogenia do grupo *saltans*, com a utilização de diversos tipos de marcadores. A primeira filogenia do grupo foi proposta com base no acúmulo do pigmento pteridina no corpo dos indivíduos das espécies do grupo *saltans* (THROCKMORTON; MAGALHÃES, 1962). Outros trabalhos

utilizando marcadores morfológicos foram realizados (THROCKMORTON, 1975; YASSIN, 2009; SOUZA et al., 2014), assim como a utilização de outros marcadores, como isolamento reprodutivo (BICUDO, 1973a; BICUDO, 1979), polimorfismo cromossômico (BICUDO, 1973b), padrões de esterases (NASCIMENTO; BICUDO, 2002; BERNARDO; BICUDO, 2009), análises moleculares (O' GRADY et al., 1998; RODRIGUEZ-TRELLES et al., 1999; TARRIO et al., 2000, O' GRADY; KIDWELL, 2002) e elementos transponíveis (CLARK et al., 1995; SILVA; KIDWELL, 2000; CASTRO; CARARETO, 2004). Os resultados das análises destes trabalhos algumas vezes foram incongruentes em relação à filogenia e origem do grupo.

O trabalho de Throckmorton (1975) foi pioneiro na discussão da origem do grupo *saltans*. O autor utilizou os resultados da filogenia sugerida por Throckmorton e Magalhães (1962) e propôs que o grupo se originou na América do Norte, devido à ocorrência das espécies dos subgrupos mais primitivos, subgrupos *cordata* e *elliptica*, do México ao Brasil. O grupo ancestral teria então colonizado o continente sul-americano, dando origem aos subgrupos *sturtevanti*, *parasaltans* e *saltans*, possivelmente antes da formação do Istmo do Panamá. E após o soergimento do Istmo, as espécies destes subgrupos invadiram e se dispersaram para o norte. Algumas espécies do subgrupo *saltans* se dispersaram na América Central e México há aproximadamente 4,5 milhões de anos. Entretanto, estudos realizados por Rodríguez-Trelles et al. (1999) e Tarrío et al. (2000) com o gene *Xdh* sugerem que o grupo *saltans* teria se originado na América do Sul e não na América do Norte, devido à ocorrência no Brasil das espécies do subgrupo *parasaltans*, considerado o mais primitivo pelas análises

efetuadas. Assim, a origem do grupo e as relações entre seus subgrupos e espécies permanecem uma questão em aberto.

O grupo *saltans* é composto por espécies crípticas, que são distinguidas principalmente pela morfologia da terminália masculina, apresentando grande variação na mesma. Entretanto, a morfologia da terminália feminina é bem semelhante entre os subgrupos. Em muitas espécies de animais com fertilização interna, a genitália externa masculina é uma estrutura com rápida evolução (EBERHARD, 1985).

D. sturtevanti é uma espécie neotropical e uma das poucas espécies que se adaptam a diferentes climas (DAVID; TSACAS, 1981) tendo sido coletada em savanas (CHAVES; TIDON, 2008), manguezais (SCHMITZ, et al., 2007) e principalmente na Mata Atlântica (PENARIOL, 2012; MATEUS et al., 2013). Entre as espécies do subgrupo *sturtevanti* é a que possui maior extensão geográfica, ocorrendo desde o México até o sul do Brasil, inclusive sendo frequente nas Ilhas do Caribe (BICUDO, 1979). Foi descrita por Duda em 1925, mas sua melhor descrição foi feita por Dobzhansky e Pavan (1943), em um trabalho no qual os autores descrevem sistematicamente 31 espécies encontradas no estado de São Paulo e em Brasília, incluindo a morfologia externa e a anatomia dos adultos, ovos, larvas, pupas e cromossomos.

A espécie foi avaliada quanto ao isolamento reprodutivo por Bicudo (1979), em testes de cruzamento com *D. milleri* e *D. magalhaesi*, e foi observado isolamento reprodutivo entre as três espécies. A autora sugeriu que o isolamento ocorre predominantemente no nível de inseminação, já que a morfologia genital dos machos das três espécies é bem semelhante.

Hosaki-Kobayashi e Bicudo (1994) estudaram isolamento reprodutivo intraespecífico, cruzando moscas de 24 linhagens mantidas em estoque de laboratório com 67 isolinhagens obtidas de moscas recém-coletadas, de 11 localidades distintas no Brasil. Os resultados mostraram diferenciação populacional quanto a fertilidade, entretanto, não foi detectado nenhum grau de isolamento reprodutivo entre estas populações.

Em outro trabalho semelhante, das mesmas autoras, ((HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1997), foi observado isolamento reprodutivo entre as populações da Guiana e da Colômbia e entre as populações de São José do Rio Preto/SP e do México. A ausência de esperma nas espermatecas das fêmeas dos cruzamentos estéreis, indica a existência de isolamento sexual entre estas espécies.

D. sturtevanti apresenta uma ampla variabilidade genética observada por diferentes marcadores e também foi detectado isolamento reprodutivo incipiente entre alguma de suas populações. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa por marcadores microssatélites e genes mitocondriais demonstraram que esta espécie está em expansão demográfica. Estas características associadas a sua ampla distribuição geográfica e sua ocorrência em diferentes fitofisionomias da mata Atlântica fazem desta espécie um organismo apropriado para estudos de diferenciação e estrutura populacional.

1.2 Morfometria

Quantificar a variação morfológica tem sido uma ferramenta eficaz em estudos de Biologia Evolutiva, principalmente após o surgimento da morfometria

geométrica nos anos 80 e 90. Trabalhos utilizando diferentes organismos valeram-se desta técnica para analisar a forma e o tamanho dos mais variados marcadores anatômicos.

Estudos comparando crânios de cães domésticos e de cães selvagens utilizaram morfometria geométrica para diferenciar as espécies e mostraram que a seleção artificial por oferta de alimentação é determinante e pode facilitar a especiação (DRAKE; KLINGENBERG, 2010).

A morfometria também tem sido utilizada em pesquisas da evolução humana como por exemplo em estudos comparativos entre a morfologia craniofacial e do tórax de neandertais e humanos modernos (BASTIR et al., 2007; BASTIR et al., 2015) e em estudos sobre dimorfismo craniofacial (BULYGINA et al., 2006)

Para ilustrar ainda mais a importância do desenvolvimento das técnicas de morfometria e as vantagens de utilização de morfometria geométrica em relação às técnicas lineares, podemos citar o trabalho de Sidlaukas et al. (2011) que aplicaram diferentes técnicas de morfometria na identificação de espécies de peixes do grupo *Leporinus cylindriformis*. Ambas as abordagens (linear e geométrica) retornaram padrões congruentes de separação entre espécies putativas, mas a abordagem geométrica distinguiu quatro pares de espécies a mais do que a abordagem linear fornecendo um pouco mais de poder estatístico. Com base em morfometria, merística e coloração distintas, uma nova espécie foi descrita (*Leporinus apollo sp. nov.*).

Em estudos com insetos, a morfometria geométrica é aplicada em diferentes partes anatômicas e com finalidades variadas. Patterson *et al.* (2001) realizaram análises quantitativas de caracteres morfológicos da cabeça para

reconstruir a história evolutiva de *Triatoma rubrofasciata* (Hemiptera: Reduviidae) e compará-la com sete outras espécies, observando que *T. rubrofasciata* apresenta similaridade com as espécies de triatoma da região Neoártica implicando uma ancestralidade comum para esses grupos. Em sua tese de doutorado, Patterson avalia a possibilidade de se utilizar morfometria geométrica em estudos de dinâmica populacional de *T. rubrofasciata*, concluindo que a variação da forma das asas apresentou maior congruência com os padrões de variação obtidos por sequenciamento do DNA mitocondrial que a variação da forma da cabeça. O autor sugere a utilização da forma da asa em avaliações morfométricas de dinâmica populacional. Uma das maiores preocupações do autor, no entanto, é a atuação da plasticidade fenotípica como fator de confusão em estudos de estrutura populacional. De fato, diversos estudos utilizam morfometria geométrica com a intenção de estudar a plasticidade fenotípica e sua interação com variabilidade genética, sendo que em sua maioria, a asa é o marcador escolhido para análise (PATTERSON et al., 2001).

Outro exemplo de aplicação com sucesso de técnicas de morfometria geométrica é o estudo de Garnier *et al.* (2005), no qual os pesquisadores utilizaram resultados morfométricos do pronoto e do edeago de *Carabus solieri* (Coleoptera, Carabidae) conjuntamente a resultados moleculares. A correlação entre estes marcadores e a localização geográfica permitiu inferir o cenário filogeográfico, propondo que duas populações de *C. solieri* se dividiram antes do último período de glaciação, diferenciando-se em dois grupos distintos (um com coloração esverdeada ao norte e outro com coloração azulada ao sul). Com o fim do período de glaciação, as duas populações se reaproximaram formando

um grupo de transição ao centro do local de incidência da espécie (GARNIER et al., 2005).

No que se refere à utilização de asa como marcador, Sontigun et al. (2017), aplicaram a morfometria geométrica baseada em 19 pontos de referência para a identificação de 12 espécies de moscas varejeiras da Tailândia com interesses clínicos (disseminação de doenças) e forenses (estágios de decomposição de cadáveres). Eles concluíram que o tamanho das asas não é adequado para a discriminação das espécies, mas a forma sim, desta forma, recomenda o uso desta técnica por ser um método simples, confiável e barato.

Em geral, estudos morfológicos exigem menor custo e tempo que estudos moleculares (WORTLEY; SCOTLAND, 2006; YASSIN, 2009; TRAVA, 2014), desta forma, constituem-se em uma excelente opção de trabalho e fornecem resultados bastante confiáveis, desde que se aplique corretamente as técnicas de instrumentação, análise gráfica e estatística (BITNER-MATHÉ; DAVID, 2015).

Em especial, técnicas de morfometria geométrica têm sido aplicadas para a análise da morfologia da asa e do edeago de drosofilídeos. Destacam-se as análises de marcadores com conseqüente análise de Distâncias de Procrustes nas intersecções das veias e das bordas das asas (KLINGENBERG, 2011; MATEUS et al., 2013; TRAVA, 2014; COSTA et al. 2015), ajuste de uma elipse no contorno da asa (BITNER-MATHÉ; KLACZKO, 1999) e em edeagos, utilização de Descritores Elípticos de Fourier (KUHL; GIARDINA, 1982; CAVICHI, et al., 1991; DEBAT, et al. 2003; ANDRADE, et al. 2005; ANDRADE, et al. 2009).

1.3 Marcadores morfológicos: Asa e Edeago

Entre os marcadores morfológicos mais estudados em espécies do gênero *Drosophila* estão a asa e o edeago. Estudos anteriores indicam, que a asa apresenta plasticidade fenotípica em relação a diferentes fontes de variação ambiental (WEBER, 1990; DAVID et al., 1994; MONTEIRO; REIS, 1999; MORIN et al., 1999; DEBAT et al., 2003; CARREIRA et al., 2006; SOTO et al., 2008) e existe evidência de que os diferentes aspectos da morfologia da asa (tanto o tamanho quanto à forma) são alvos da seleção natural (POWELL, 1997; GILCHRIST et al., 2004).

A técnica de morfometria geométrica mais utilizada para análise de asas é a Análise das Distâncias de Procrustes (GOODALL, 1991; SOTO et al., 2008; KLINGENBERG, 2010; KLINGENBERG, 2011) que consiste na marcação de marcos anatômicos, localizados na intersecção de veias ou no encontro entre a veia e a borda da asa, a superposição de todas as asas e a análise da variação dos pontos em torno do centroide (ponto médio).

Esta técnica foi utilizada por Debat et al. (2003) em estudos sobre componentes alométricos e não-alométricos em asas de *D. simulans*. Concluíram que 24% da variação da forma da asa se deve a componentes alométricos e 76% a componentes não-alométricos e sugeriram que o estresse, ao invés da temperatura, é o principal fator que afeta a forma da asa.

Soto et al. (2008) utilizaram esta técnica para estudar a morfologia das asas de *D. gouveai* e *D. antonietae*, obtendo divergência entre as espécies e associando esta divergência a fatores ecológicos e genéticos. A principal correlação obtida por estes pesquisadores refere-se à forma da asa e o cacto

hospedeiro (local de alimentação e oviposição). Conclui que a diminuição do estresse ambiental gera aumento na asa, mas o aumento de estresse gera diminuição e variação na forma.

Pitchers et al. (2013) associaram a variação da forma e tamanho das asas a um *cline* altitudinal. Trabalhando com asas de *D. melanogaster*, analisadas segundo distâncias de Procrustes, propuseram um modelo linear generalizado misto com as variáveis altitude, sexo, latitude e longitude. Os resultados mostraram que além da esperada adaptação termal, a seleção responsável pela formação de *clines* latitudinais, longitudinais e altitudinais deve ser muito mais complexa.

Ainda sobre a forma das asas, Ray et al. (2016) usaram manipulação genética para alterar a expressão do gene *narrow* relacionado à forma das asas em *D. melanogaster*. Em seguida, analisaram 15 marcadores através de Análise de Procrustes e mostraram que a forma da asa altera significativamente a performance do voo, ou seja, a manobrabilidade e a agilidade.

Utilizando uma técnica de morfometria geométrica plana que consiste em ajustar uma elipse ao contorno da asa (BITNER-MATHÉ; KLACZKO, 1999), Moraes e Sene (2004) estudaram herdabilidade da forma e do tamanho da asa em populações selvagens *versus* populações mantidas em laboratório em *D. gouveai*. A herdabilidade foi significativamente maior para as populações selvagem apenas em três parâmetros, ligados aos marcadores do final da terceira e da quarta veia longitudinal das asas, mas ainda assim, concluem que a herdabilidade é maior em populações selvagens que em populações de laboratório. Concluem ainda que parâmetros morfométricos são apropriados para estudar a variação morfológica entre populações e que os parâmetros

referentes à terceira e à quarta veia longitudinal são os mais importantes para explicar a maior herdabilidade das moscas selvagens (MORAES; SENE, 2004).

A mesma técnica de ajuste de uma elipse ao contorno da asa foi utilizada por Matta e Bitner-Mathé (2010) na análise de asas de *D. simulans* e *D. sechellia* (*Diptera*), correlacionando os resultados com variações em 12 *locos* de traços quantitativos (*QTL*) que relacionam-se ao tamanho e à forma das asas identificados pelos autores. A comparação possibilitou o mapeamento das bases genéticas para a divergência no tamanho das asas das duas espécies, a identificação de que esta divergência em tamanho não é acompanhada por divergência em forma e que o dimorfismo sexual ocorre em relação à forma e ao tamanho, apresentando machos com asas menores e mais arredondadas (MATTA; BITNER-MATHÉ, 2010).

A terminália masculina é formada por um conjunto de apêndices (edeago, hipândrio e arcos genitais), apresenta evolução rápida e divergente e é um dos padrões mais gerais de diversificação morfológica em animais com fertilização interna (ARNQVIST, 1997; HOUSE; SIMMONS, 2005; HUBER; BRESOVIT; RHEIMS, 2005). Medidas da diferenciação da morfologia genital são muito utilizadas em estudos evolutivos populacionais, pois além de constituir um caráter diagnóstico para várias espécies, como carabídeos, libélulas e besouros, diferenças na morfologia da terminália podem gerar o isolamento reprodutivo entre populações (PAULSON, 1974; SOTA; KUBOTA, 1998; NAGATA et al., 2007).

Estudos com diversas espécies do gênero *Drosophila* utilizam análises morfométricas do edeago com finalidades variadas. Franco et al. (2006), por exemplo, estudaram a morfologia do edeago de espécies cactofílicas (*D.*

antonietae e *D. buzzatti*) focando em quatro regiões do edeago. Obtiveram que a região entre o ápice e o processo ventral é a mais variada, corroborando resultados anteriores que consideram esta região do edeago como um *hot spot* evolutivo (KULIKOV et al. 2004). Atribuíram a variação desta região a fatores epigenéticos e ambientais agindo conjuntamente.

O mesmo grupo de pesquisadores, em 2008, apresentaram um estudo com a espécie *D. serido*, analisando os edeagos de 8 populações e encontrando divergências na forma dos edeagos correlacionadas à distância geográfica das populações. Sugeriram três possibilidades de explicação para a variação: hipótese chave-fechadura, pleiotropia e seleção sexual.

Richmond et al. (2012), realizaram estudos comparativos dos edeagos *D. arizonae* e de quatro subespécies de *D. mojavensis* utilizando Descritores Elípticos de Fourier. As análises por morfometria geométrica utilizadas foram eficazes na distinção das duas espécies e de três das quatro subespécies de *D. mojavensis* e concluíram que *D. mojavensis sonorensis* apresenta um padrão diferente de evolução. Os autores sugeriram duas hipóteses para explicação deste fato: pressões seletivas agindo no sistema pré-copulatório causadas por simpatria entre *D. m. sonorensis* e *D. arizonae*, ou, alternativamente, fluxo gênico entre *D. m. sonorensis* e *D. m. baja*, pois as condições climáticas e geográficas são favoráveis.

Algumas pesquisas ainda utilizaram a morfometria aplicada aos dois marcadores (asas e edeagos) para descrever a diferenciação entre espécies e intraespecíficas. Soto et al. (2010) analisaram a variação dos dois marcadores em *D. gouveai* e *D. antonietae* buscando correlação com o cacto hospedeiro. Por meio de hibridização experimental, mostraram que a morfologia genital e da asa

dos híbridos depende da planta onde a mãe se hospeda, mas concluíram que a extensão da diferenciação morfológica entre híbridos e espécies puras bem como os padrões de plasticidade variaram entre os órgãos, sugerindo uma arquitetura genética complexa para as características estudadas.

Populações geográficas da região neotropical de *D. sturtevantii* têm sido estudadas por nosso grupo de pesquisa há algum tempo utilizando marcadores morfológicos (SOUSA et al., 2014) e genéticos, como por exemplo, os microssatélites e genes mitocondriais (ZORZATO, 2019).

Os dados de microssatélites mostraram, no geral, diferenciação genética de baixa (AMOVA, G_{ST} e D – distância de Nei) a moderada (F_{ST}) entre as populações estudadas, e, conseqüentemente, elevada identidade (N_m). Porém, indícios de estruturação populacional foram encontrados em análises como a Bayesiana, implementada no programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000), e da genética da paisagem (*landscape genetics*), realizada pelo programa GENELAND (GUILLOT et al., 2005). Na primeira análise foram detectados dois grupos, um formado pelas populações do Sul do Brasil (Aguai/SC, Ribeirão da Ilha-Florianópolis/SC e Piraí/SC), separado das demais, que formaram o segundo grupo. Na segunda análise, foram encontrados cinco grupos. Um com as três populações do sul do Brasil (igual ao primeiro grupo observado na análise do STRUCTURE). O segundo grupo foi formado pelas populações localizadas próximas ao litoral do sudeste do Brasil (Serra da Cantareira/SP e Picinguaba/SP). O terceiro foi formado pelas populações do interior do sudeste (Matão/SP e Nova Granada/SP). Este agrupamento foi consistentemente observado em diversas outras análises (G_{ST} , D de Nei, e N_m). O quarto foi formado pela população do interior do nordeste brasileiro (Pratigi/BA). E o quinto

foi representado pela população de Guaribas/PB. Além da consistente proximidade entre as populações do interior do sudeste, a população insular de Ribeirão da Ilha (Florianópolis/SC) mostrou-se também consistentemente mais diferenciada das demais (TRAVA, 2018).

5 CONCLUSÃO

Quando analisamos os dois marcadores (asas e edeagos) conjuntamente, podemos ver que as populações de *D. sturtevanti* apresentam variações que seguem alguns padrões por proximidade geográfica. A divergência obtida para as asas pode ser explicada em grande parte por fatores ambientais, já que são mais suscetíveis a estes fatores que os edeagos, mas efeitos de fundação da população, de gargalos populacionais e diminuição do fluxo gênico correlacionados à fragmentação da Mata Atlântica não podem ser descartados.

De forma geral, as diferenciações morfométricas das asas e dos edeagos mostraram certos pontos de convergência. Destacamos a diferenciação latitudinal com o agrupamento das populações da América Central diferindo com bastante intensidade das populações do sul do Brasil. Esta divergência pode ser um reflexo da existência de uma nova espécie na Costa Rica, que está sendo testado em nosso laboratório com marcadores moleculares e testes de isolamento reprodutivo. Também houve dificuldades em se estabelecer critérios de associação para as populações do Sudeste brasileiro, mostrando que tais caracteres podem estar sendo influenciados por fatores ambientais e genéticos e outros a serem explorados. Além disso, a relação entre tamanho e forma das asas em *D. sturtevanti* foi divergente dos resultados encontrados para outras espécies de *Drosophila*, o que demonstra um aspecto intrínseco desta espécie que necessita ser melhor investigado em projetos futuros.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.; HATADANI, L.; KLACZKO, L. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: Effect of the temperature. **Journal of Thermal Biology**, v. 30(7), p. 518-523, 2005.
- ANDRADE, C.A.C; VIEIRA, R.D.; ANANINA, G.; KLACZKO, L.B. Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. **Genetica**, v. 135, p. 13-23, 2009.
- ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biol J Linn.**, v. 60, p. 365–379, 1997.
- BASTIR M.; O'HIGGINS, P.; ROSAS, A. Facial ontogeny in Neanderthals and modern humans. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 274, p. 1125–1132, 2007.
- BASTIR, M. et al. The relevance of the first ribs of the El Sidrón site (Asturias, Spain) for the understanding of the Neandertal thorax. **J. Hum. Evol.**, v. 80, p. 64–73, 2015.
- BERNARDO A.A., BICUDO H.E.M.C. Variability of esterase patterns in adult flies of the *saltans* species group of *Drosophila* (subgenus *Sophophora*). **Genetica**. 137: 111-124, 2009.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. **Genetica**, v. 44, p. 313-329, 1973a.
- BICUDO, H. E. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. **Genetica**, v. 44, p. 520-552, 1973b.
- BICUDO, H.E.M.C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV The *sturtevantii* subgroup. **Braz J Genet**, v. 2, p. 247-258, 1979.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: Effects of sex, temperature and density. **Genetica**. v. 105(2), p. 203-210, 1999.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; DAVID, J.R. Genetic variability and phenotypic plasticity of metric thoracic traits in an invasive drosophilid in America. **Genetica**, v. 143, p. 441-451, 2015.
- BULYGINA, E.; MITTEROECKER, P.; AIELLO, L. Ontogeny of facial dimorphism and patterns of individual development within one human population. **Am J Phys Anthropol**, v. 131, p. 432–443, 2006.
- CARREIRA, V.; SOTO, I.M.; FANARA, J.J.; HASSON, E. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1275–1282, 2006.
- CASTRO, J. P.; CARARETO, C. M. A. P elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion

sites. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 32, p. 383-387, 2004.

CAVICCHI, S.; GIORGI G.; VANNA, N.; GUERRA, D. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. III. Fourier and centroid analysis of wing shape and relationship between shape variation and fitness. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 4(1), p. 141-159. 1991.

CHAVES, N. B.; TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (*Diptera, Drosophilidae*) of the Brazilian savanna. **Rev. Bras. Entomol.** v. 52(3), p. 340-348, 2008.

CLARK, J. B.; ALTHEIDE, T. K.; SCHLOSSER, M. J.; KIDWELL, M. G. Molecular evolution of P transposable elements in genus *Drosophila*. I. The saltans and willistoni species groups. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 902–913, 1995.

COSTA, M.; MATEUS, R.P.; MOURA, M. Constant fluctuating asymmetry but not directional asymmetry along the geographic distribution of *Drosophila antonietae* (*Diptera, Drosophilidae*). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59(4), p. 337-342, 2015.

DAVID, J.R.; TSACAS, L. Cosmopolitan, subcosmopolitan and widespread species: different strategies within the Drosophilid family (*Diptera*). **C. R. Soc. Biogr.** 57, p. 11-26. 1981.

DAVID, J.R.; MORETEAU, B.; GAUTHIER, J.P.; PÉTAVY, G.; STOCKEL, A.; IMASHEVA, A.G. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 26, p. 229–251, 1994.

DEBAT, V.; BÉGIN, M.; LEGOUT, H.; DAVID, J.R. Allometric and non allometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. **Evolution**, v. 57, p. 2773–2784, 2003.

DOBZHASKY, T.; PAVAN, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Boletins da Fac. Filos., Ciênc. Letras da Universidade de São Paulo, Biologia Geral**, v. 4, p. 7-72, 1943.

DRAKE, A.G.; KLINGENBERG, C.P. Large-scale diversification of skull shape in domestic dog: disparity and modularity. **Am. Nat.**, v. 175, p. 289-301, 2010.

FRANCO, F.F.; PRADO, P.R.R.; SENE, F.M.; COSTA, L.F.; MANFRIN, M.H. Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related Cactophilic species of *Drosophila* (*Diptera; Drosophilidae*) in South America. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v 78(2), p. 203-212, 2006.

GARNIER, S., MAGNIEZ-JANNIN, F., RASPLUS, J-Y., ALIBERT P. When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. **Journal of Evolutionary Biology** v. 18, p. 269–280, 2005.

GILCHRIST, G.W.; HUEY, R.B.; BALANYA, J.; PASCUAL, M.; SERRA, L. A time series of evolution in action: a latitudinal cline in wing size in South American *Drosophila suboscuro*. **Evolution**, v. 58, p. 768-780, 2004.

GOODALL, C.R. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. **Journal of the Royal Statistical Society B**, v. 53, p. 285–339, 1991.

GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. Geneland: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 712-715, 2005.

HOSAKI-KOBAYASHI, M.; BICUDO, H. E. M. C. Productivity in mass crosses of *Drosophila sturtevantii*: a comparative study of laboratory stocks and recently collected flies. **Ver. Brasil. Genet.** v. 17(4), p. 393-399, 1994.

HOSAKI-KOBAYASHI, M.; BICUDO, H. E. M. C. Inversion polymorphism in laboratory strains and natural samples of *Drosophila sturtevantii* (saltans group, sturtevantii subgroup). **Cytobios.** v. 89, p. 7-20, 1997.

HOUSE, C. M.; SIMMONS, L. W. The evolution of male genitalia: patterns of genetic variation and covariation in the genital sclerites of the dung beetle *Onthophagus taurus*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, n. 5, p. 1281-1292. 2005.

HUBER, B. A.; BRESCOVIT, A. D.; RHEIMS, C. A. Exaggerated female genitalia in two new spider species (*Araneae: Pholcidae*), with comments on genital evolution by female choice versus antagonistic coevolution. **Insect Systematics and Evolution**, v. 36(3), p. 285-292, 2005.

KLINGENBERG, C.P. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 623-635, 2010.

KLINGENBERG, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 353-357, 2011.

KUHL, F.P.; GIARDINA, C.R. Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. **Computer Graphics and Images Processing**, v. 18, p. 236-258. 1982.

KULIKOV, A.M.; MELNIKOV, A.I.; GORNOSTAEV, N.G.; LAZEBNY, O.E.; MITROFANOV, V.G. Morphological analysis of male mating organ in the *Drosophila virilis* species group: a multivariate approach. **J. Zool. Syst. Evol. Research**, v. 42, p. 135–144, 2004.

MAGALHÃES, L.E.; BJOMBERG, A.J.S. Estudo da genitália masculina de *Drosophila*, *Drosophilidae*, *Diptera*). **Braz J Biol**, v. 16, p. 273-280, 1957.

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

MATEUS, R.P.; MOURA, M.O.; MANFRIN, M.H.; MONTEIRO, S.G.; SENE, F.M. Contrasting patterns of within-species morphological variation in two cactophilic

Drosophila species (Diptera: Drosophilidae). **Neotrop Entomol**, v. 42, p. 384-392, 2013.

MATTA, B.P.; BITNER-MATHÉ, B.C. Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila simulans* and an analysis of temperature effects on genetic parameter estimates. **Heredity**, v. 93, p. 330–341, 2004

MONTEIRO, L. R.; REIS, S.F. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto: Holos. 1999.

MORAES, E.M.; SENE, F.M. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. **Genetica** 121: 119. doi.org/10.1023/B:GENE.0000040380.19645.87, 2004.

MORIN, J.P.; MORETEAU, B.; PETAVY, G.; DAVID, J.R. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster*. **Evol. Biol.**, v. 12, p. 329-339, 1999.

MOURÃO, C.A.; BICUDO, H.E.M.C. Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo “*saltans*” (Drosophilidae, Diptera). **Papéis avulsos de Zoologia**, v. 20, art.12, p. 123-134, 1967.

NAGATA, N.; KUBOTA, K.; YAHIRO, K.; SOTA, T. Mechanical barriers to introgressive hybridization revealed by mitochondrial introgression patterns in *Ohomopterous* ground beetle assemblages. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 22, p. 4822-4836, 2007.

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

O' GRADY, P.M.; CLARK, J.B.; KIDWELL, M.G. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Mol Biol Evol**, v. 15, p. 656-664, 1998.

O'GRADY, P. M.; KIDWELL, M.G. Phylogeny of the subgenus *sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 22, p. 442-453, 2002.

PAULSON, D. R. Reproductive isolation in Damselflies. **Systematic Biology**, v. 23, p. 40-49, 1974.

PATTERSON J.S.; SCHOFIELD C.J.; DUJARDIN J.P.; MILES M.A. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old World species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. **Med Vet Entomol**. v. 15, p. 443–451, 2001.

PENARIOL, L. 2012. **Traços quantitativos e abundância de drosofilídeos como indicadores de impacto ambiental em fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual**. 2012. 117 f. Tese (Doutorado em Genética), Instituto de Biociência,

Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2012

PITCHERS, W.; POOL, J.E.; DWORKIN, I. Altitudinal Clinal Variation in Wing Size & Shape in African *Drosophila melanogaster*: One Cline or Many? **Evolution**, v. 67(2), p. 438-452, 2013.

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

PRADO, A. **Poesia Reunida**. Editora Record, Rio de Janeiro, 2015.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155(2), p. 945-959, 2000.

RAY, R.P.; NAKATA, T.; HENNINGSSON, P.; BOMPHREY, R.J. Enhanced flight performance by genetic manipulation of wing shape in *Drosophila*. **Nature Communications**, v. 7, p. 10851, 2016.

RICHMOND, M. P.; JOHNSON, S., MARKOW, T.A. Evolution of reproductive morphology among recently diverged taxa in the *Drosophila mojavensis* species cluster. **Ecology and Evolution**, v. 2(2), p. 397-408, 2012.

RODRIGUEZ-TRELLES, F.; TARRIO, R.; AYALA, F.J. Molecular evolution and phylogeny of the *Drosophila saltans* species group inferred from the *Xdh* gene. **Mol Phylogenet Evol**, v.13, p. 110-121. 1999.

SCHMITZ, H.J.; VALENTE, V.L.S.; HOFMANN, P.R.P. Taxonomic survey of *Drosophilidae* (*Diptera*) from mangrove forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 53-64, 2007.

SIDLAUSKAS, B.L.; MOL, J.H.; VARI, R.P. Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriformis* group (*Characiformes: Anostomidae*) with description of a new species from Suriname. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 162, p. 103–130, 2011.

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

SILVA, J.C.; KIDWELL, M.G. Evolution of P elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. **Genetics**, v. 168(3), p. 1323-1335, 2004.

SONTIGUN, N.; SUKONTASON, K. L.; ZAJAC, B. K.; ZEHNER, R.; SUKONTASON, K.; WANNASAN, A.; AMENDT, J. Wing morphometrics as a tool in species identification of forensically important blow flies of Thailand. **Parasites & vectors**, v. 10(1), p. 229. doi:10.1186/s13071-017-2163-z, 2017.

SOTA, T.; KUBOTA, K. Genital lock-and-key as a selective agent against hybridization. **Evolution**, v. 52, p. 1507-1513, 1998.

SOTO, I.M.; HASSON, E.; MANFRIN, M.H. Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biol. J. Linn. Soc. Lond.**, v. 95, p. 655-665, 2008.

SOTO, I.M.; CARREIRA, V.P.; CORIO, C.; SOTO, E.M.; HASSON, E. Host use and developmental instability in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *D. antonietae*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 137, p. 165–175, 2010.

SOUSA, T.A.J.; NOLL, F.B.; BICUDO, H.M.C.; MADI-RAVAZZI, L. Scanning Electron Microscopy of Male Terminalia and Its Application to Species Recognition and Phylogenetic Reconstruction in the *Drosophila saltans* Group. **PlosOne**, v. 9, p. 1-12, 2014.

STURTEVANT, A.H. The classification of the genus *Drosophila* with description of nine new species. **Univ. Texas Public.**, nº 4213, p. 5-51, 1942.

THROCKMORTON, L. H.; MAGALHAES, L. E. Changes with evolution of pteridine accumulations in species of the saltans group of the genus *Drosophila*. **University of Texas Publications**, v. 6205, p. 489-505, 1962.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. **Handbook of genetics**, v. 3, p. 421 – 469, 1975.

TARRIO, R., RODRIGUEZ-TRELLES, F., AYALA, F.J. Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: the *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. **Molec. Phylog. Evol.**, v. 16(3), p. 344-349, 2000.

TRAVA, B.M. **Morfometria da Asa e do Edeago de Duas Espécies de *Drosophila* Endêmicas da América do Sul**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva), Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava, 2014.

TRAVA, B.M. **Estrutura populacional de *Drosophila sturtevanti* (subgrupo *sturtevanti*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica**. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Genética), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2018.

WEBER, K.E. Selection on wing allometry in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 126, p. 975-989, 1990.

WORTLEY A.H.; SCOTLAND R.W. The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses[J]. **Systematic Biology**, v. 55, p. 677-685, 2006.

YASSIN, A. Phylogenetic Relationships Among Species Subgroups in the *Drosophila saltans* Group (Diptera: Drosophilidae): SDC Morphology Solve a Molecular Conflict? **Zoological Research**, v. 30(3), p. 225-232, 2009.

ZORZATO, S.V. **Filogeografia de *Drosophila sturtevanti* (Diptera: Drosophilidae) em domínios da Mata Atlântica.** 2019, Tese (Doutorado em Biociências), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2019.