



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

Luís Fernando Segala

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

São José do Rio Preto
2019

Luís Fernando Segala

**Diferenciação populacional em *Drosophila sturtevantii*
(subgrupo *sturtevantii*, 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*
sturtevanti (subgrupo *sturtevanti*, 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 sturtevantii* 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 markers 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 factors. The present results reflect the genetic differentiation in course in *D. Sturtevantii* 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>sturtevantii</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 sturtevantii</i> (Diptera, Drosophilidae, grupo <i>saltans</i> , subgrupo <i>sturtevantii</i>) após recente expansão demográfica	30
4 CAPÍTULO II - Plasticidade fenotípica e <i>clines</i> em populações geográficas de <i>Drosophila sturtevantii</i> (Diptera, Drosophilidae, grupo <i>saltans</i> , subgrupo <i>sturtevantii</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 soerguimento 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 Tarrio 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. sturtevantii 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 Sidlauskas 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 consequente 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; BRESCOVIT; 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).

2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a diferenciação populacional de *D. sturtevanti* em fragmentos de Mata Atlântica do Brasil e da Floresta Tropical Úmida da Costa Rica, por meio de estudos morfométricos das asas e edeagos, e tentar relacionar a variabilidade morfológica a fatores ambientais, tais como fitofisionomia, temperatura média anual, umidade relativa anual média, área do fragmento de mata e distribuição geográfica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar correlações entre tamanho e forma das asas e forma dos edeagos com variáveis ambientais tais como: fitofisionomia do fragmento da mata, temperatura média anual, umidade relativa média anual, área do fragmento de mata e distância geográfica entre os locais de coleta.
- Avaliar a possível existência de um *cline* latitudinal quanto aos marcadores utilizados.

Diferenciação populacional da morfologia do edeago em *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae, grupo *saltans*, subgrupo *sturtevantii*) após recente expansão demográfica

CAPÍTULO I

Nas normas da revista *Biological Journal of Linnean Society*

https://academic.oup.com/biolinnean/pages/General_Instructions

Diferenciação populacional da morfologia do edeago em *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae, grupo saltans, subgrupo *sturtevantii*) após recente expansão demográfica

Luís Fernando Segala¹, Rogério Pincela Mateus² e Lilian Madi-Ravazzi¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Campus CEDETEG, Guarapuava, PR, Brazil.

Morfometria geométrica do edeago em *Drosophila sturtevantii*.

Resumo

Evidências crescentes demonstram que a morfologia das estruturas genitais masculinas evolui mais rapidamente que outros traços em grupos de animais com fertilização interna. No presente estudo, nós investigamos o padrão de variação do edeago entre populações naturais da espécie *Drosophila sturtevanti* do Brasil e da Costa Rica. Foram detectadas diferenças significantes entre as populações e foi observado a formação de três grupos fenéticos distintos, que mostraram algum grau de associação com o isolamento geográfico, mais evidenciado para as populações do Sul do Brasil e da Costa Rica. Estas relações, em parte, estão de acordo com as obtidas para marcadores microsatélites. A ocorrência de eventos recentes de expansão populacional na história evolutiva desta espécie sugere que a sua morfologia genital deve ter divergido rapidamente neste processo de expansão demográfica.

Palavras-chave: Diferenciação morfológica. Diferenciação latitudinal. Evolução morfológica. Isolamento Reprodutivo.

Diferenciação populacional da morfologia do edeago em *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae, grupo saltans, subgrupo *sturtevantii*) após recente expansão demográfica

Luís Fernando Segala¹, Rogério Pincela Mateus² e Lilian Madi-Ravazzi¹

¹*Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.*

²*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Campus CEDETEG, Guarapuava, PR, Brazil.*

Introdução

A terminália masculina apresenta evolução rápida e divergente, e representa um dos padrões mais gerais de diversificação morfológica em animais com fertilização interna. Diferentes mecanismos podem atuar dirigindo esta evolução, tais como chave-fechadura, pleiotropia e seleção sexual (ARNQVIST, 1997; HOUSE; SIMMONS, 2005; HUBER et al., 2005). Além de constituir um caráter diagnóstico para vários organismos, como carabídeos, libélulas e besouros, medidas da diferenciação da morfologia da terminália são muito importantes em estudos evolutivos populacionais pois incompatibilidades podem impedir a cópula, podendo culminar em uma barreira reprodutiva entre populações (PAULSON, 1974; SOTA; KUBOTA, 1998; NAGATA et al., 2007; MASLY, 2011; MASLY et al., 2012; HOUSE et al., 2013; YASSIN; ORGOGOZO, 2013).

Em *Drosophila*, uma das partes da terminália que é altamente diversa em muitas espécies é a genitália masculina, denominada edeago, que é o órgão quitinoso copulador do macho que consiste de duas peças fusionadas dorsalmente. Ele é um caráter diagnóstico importante em sistemática, especialmente para grupos de espécies crípticas, nos quais é difícil identificar as espécies pela morfologia externa (VILELA, 1983). Um trabalho sobre a evolução da genitália masculina no cluster *D. buzzatii* (grupo *repleta*) utilizando sete espécies cactofílicas revelaram que fatores ecológicos e genéticos são determinantes da variação intra e interespecífica. A alta plasticidade morfológica observada deste órgão em algumas das espécies deste cluster, são contrárias a hipótese da chave e fechadura, enquanto a condição dependente observada, plasticidade fenotípica dependente dos cactos hospedeiro e a covariação com traços não genitais, estão de acordo com os argumentos da hipótese da pleiotropia (SOTO et al., 2007, 2008). Resultados similares foram obtidos para outras espécies de *Drosophila* (ANDRADE et al. 2005, 2009).

As espécies incluídas no subgrupo *sturtevanti* (*Diptera*, *Drosophilidae*, grupo *saltans*), *D. milleri*, *D. magalhaensis*, *D. dacunhai* e *D. sturtevanti*, são crípticas e identificadas somente pela estrutura do edeago, que são também muitos semelhantes. Análises dos edeagos das espécies deste subgrupo realizadas por microscopia eletrônica de varredura foi eficiente para evidenciar diferenças nesta estrutura, como a disposição e a presença ou ausência de escamas entre as espécies (SOUSA et al., 2014).

Drosophila sturtevanti Duda, 1925 é uma espécie neotropical que tem uma ampla distribuição geográfica, desde o México ao Sul do Brasil e ilhas Caribenhas (MAGALHAES, 1962), e se adaptou a diferentes climas (DAVID;

TSACAS, 1981) e diferentes biomas, tais como savanas (CHAVES; TIDON, 2008), manguezais (SCHMITZ et al., 2007) e principalmente na Mata Atlântica (MATEUS et al., 2006; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; PENARIOL, 2012).

Em um estudo pioneiro sobre isolamento reprodutivo, Dobzhansky e Pavan (1943), verificaram a existência de incompatibilidade reprodutiva entre linhagens de diferentes localidades do Brasil com linhagens da Guiana Francesa, Colômbia, Costa Rica e México. Mais recentemente, Hosaki-Kobayashi e Bicudo (1994), em cruzamentos entre 11 populações geográficas desta espécie do Brasil não detectaram nenhum tipo de isolamento, entretanto, foi observado uma grande amplitude de variação na fertilidade de muitas das populações estudadas, indicando um grau de diferenciação genética das mesmas (HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1994). Em um trabalho posterior dos mesmos autores, a ausência de espermatozoides em muitos cruzamentos estéreis indicou a existência de isolamento sexual como principal fator para o isolamento reprodutivo (HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1997).

. Além dos diversos níveis de isolamento entre as linhagens geográficas descritos acima, pesquisadores têm avaliado esta espécie quanto a vários outros fatores, dos quais destacam-se os estudos sobre valor adaptativo (CARARETO, 1999), morfologia (MAGALHAES; BJORNBERG, 1957; MAGALHAES, 1962) e elementos de transposição (CLARK et al., 1995; CLARK; KIDWELL, 1997; ALMEIDA; CARARETO, 2002; SILVA; KIDWELL, 2004; CASTRO; CARARETO, 2004; SETTA et al., 2007a, 2007b), todos eles mostrando alta variabilidade populacional.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar as populações naturais de *D. sturtevantii* quanto a variabilidade morfológica do edeago, tentando

correlacionar a variação encontrada com fatores genéticos, ambientais e a história evolutiva desta espécie na região Neotropical.

Material e Métodos

Populações investigadas

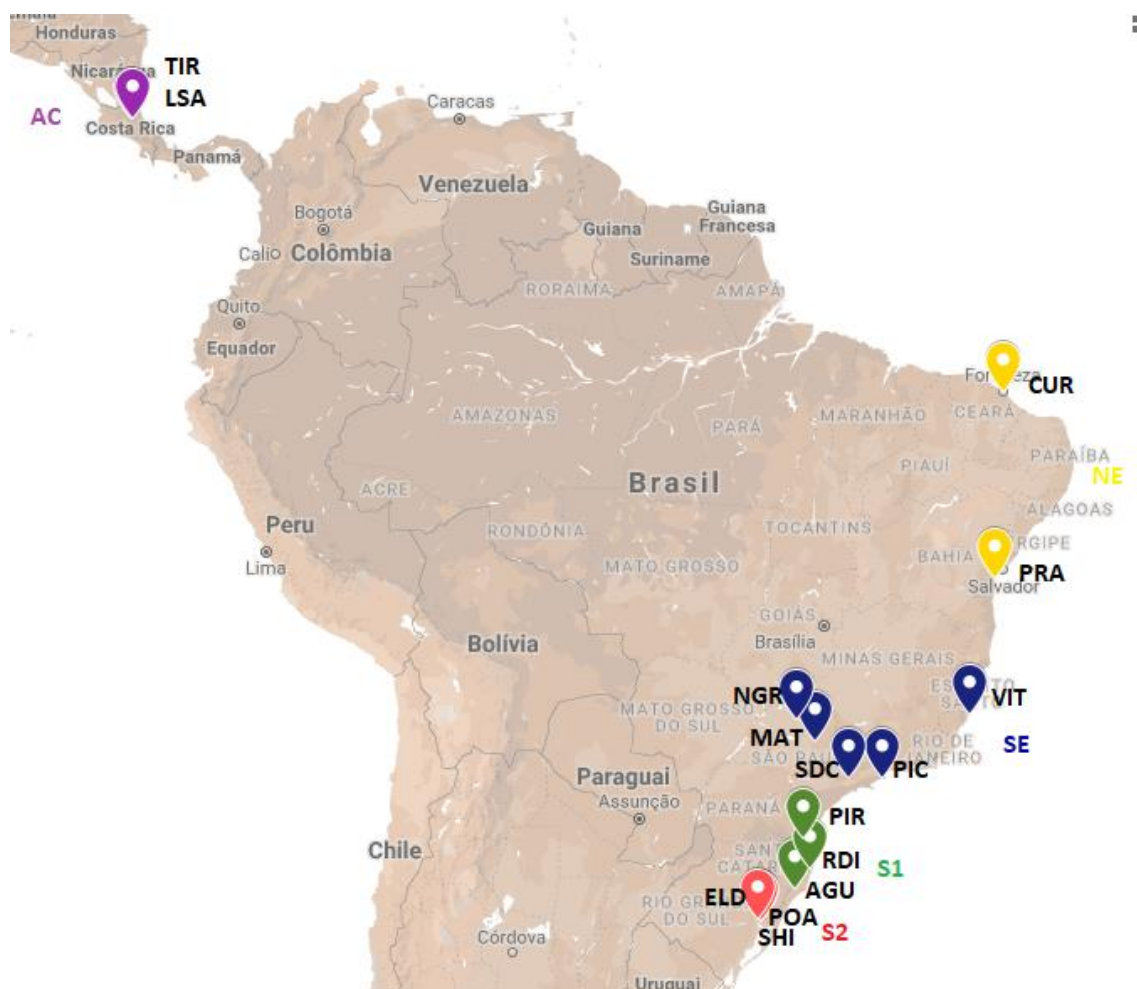
Foram analisados 604 machos recém coletados (anos 2016 a 2018) de quinze populações de *D. sturtevanti* (Tabela 1; Figura 1). Dados ambientais dos locais de coleta foram observados, tendo sido considerados para sua escolha, resultados obtidos em nosso laboratório envolvendo genes mitocondriais e experimentos reprodutivos. As coletas foram realizadas pela equipe do nosso laboratório, com exceção à população de Pratigi, cuja coleta foi realizada pela equipe do laboratório do Prof. Dr. Hermes José Schmitz e às populações da Região Sul 1 (PIR, AGU e RDI), realizadas pela equipe da Prof^a. Dr^a. Daniela Cristina De Toni.

Tabela 1. Nome e siglas das populações naturais, procedência geográfica, faixa latitudinal, coordenadas, tamanho da área do local da coleta, fitofisionomia da mata, temperatura média anual (T), umidade relativa média anual (UR) e tamanho amostral de machos utilizados no presente estudo (N).

Populações/Siglas	Procedência geográfica	Faixa latitudinal	Coordenadas	Área (ha)	Fitofisionomia	T (°C)	UR (%)	N
Tirimbina/ TIR	Sarapiquí (CR)	AC	10°23'N, 84°07'O	345	FTU	25,40	78,40	43
La Selva/ LSA	Sarapiquí (CR)	AC	10°25'N, 84°00'O	1.536	FTU	22,39	81,98	52
Curió/ CUR	Fortaleza (CE)	NE	03°29'S, 38°16'O	57,5	FOA	26,46	74,91	54
Pratigi/ PRA	Pratigi (BA)	NE	13°51'S, 39°17'O	32.000	FOD	24,33	72,78	45
Vitória/ VIT	Vitória (ES)	SE	20°10'S, 40°12'O	217	FOD	23,71	74,50	44
Nova Granada/ NGR	Nova Granada (SP)	SE	20°32'S, 49°14'O	1.359,6	FES	24,30	59,11	50
Matão/ MAT	Matão (SP)	SE	21°37'S, 48°32'O	2.189,6	FES	23,01	60,88	60
Picinguaba/ PIC	Ubatuba (SP)	SE	23°21'S, 44°51'O	47.500	FOD	22,62	72,09	38
Cantareira/ SDC	São Paulo (SP)	SE	23°26'S, 46°38'O	64.800	FOD	21,52	68,48	26
Piraí/ PIR	Joinville (SC)	S1	26°18'S, 48°50'O	982,6	FOD	20,88	73,35	35
Ribeirão da Ilha/ RDI	Florianópolis (SC)	S1	27°47'S, 48°33'O	10.000	FOD	20,70	72,92	32
Aguaí/ AGU	Siderópolis (SC)	S1	28°25'S, 49°32'O	7.652	FOD	20,94	72,72	35
Eldorado/ ELD	Eldorado do Sul (RS)	S2	30°05'S, 51°40'O	1.560	FES	19,83	70,14	27
Porto Alegre/ POA	Porto Alegre (RS)	S2	30°02'S, 51°13'O	900	FES	19,32	77,57	31
Saint'Hilaire/ SHI	Porto Alegre (RS)	S2	30°05'S, 51°06'O	1.148	FES	20,20	77,61	32

AC = América Central, NE= Nordeste, SE = Sudeste, S1 = Sul 1, S2 = Sul 2, FTU = Floresta Tropical Úmida, FOA = Floresta Ombrófila Aberta, FOD = Floresta Ombrófila Densa, FES = Floresta Estadual Semidecidual. Fitofisionomias obtidas no site <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>. Dados abióticos (temperatura média anual e umidade relativa média anual) obtidos no site <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>.

Figura 1. Locais de coleta das amostras de populações de *D. sturtevantii*. As cores indicam as faixas latitudinais. AC = América Central, NE = Região Nordeste do Brasil, SE = Região Sudeste do Brasil, S1 = Região Sul 1 e S2 = Região Sul 2.



Preparação dos edeagos

Os edeagos foram preparados para as análises segundo a técnica descrita por Kaneshiro (1969) com modificações (TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006). A terça parte inferior do abdômen dos machos de *D. sturtevantii* foi colocada em um microtubos contendo KOH (10%) que foi colocado em Banho Maria a 60° C por 12 minutos, em seguida foi transferido para um novo tubo contendo o corante Gage (80% de fucsina ácida e 20% de ácido acético glacial)

permanecendo em Banho Maria a 60°C por 5 minutos. Em seguida, a estrutura foi colocada em novo tubo contendo a substância clareadora Eugenol (Biodinâmica), por no mínimo 48 horas. Após este tempo, os edeagos foram separados das demais partes da terminália, posicionados em lâminas em vista lateral fixados em gelatina e fotografados (Figura 2A) com aumento de 400x utilizando um microscópio (Primo Star, Zeiss) com câmera 5 MP acoplada. Após a captura, as imagens foram editadas no programa Adobe Photoshop CS6 para criação de arquivos de contorno em preto e branco e, em seguida, submetidos à análise no pacote de programas SHAPE v 1.3 (IWATA; UKAI, 2002).

Análises dos edeagos

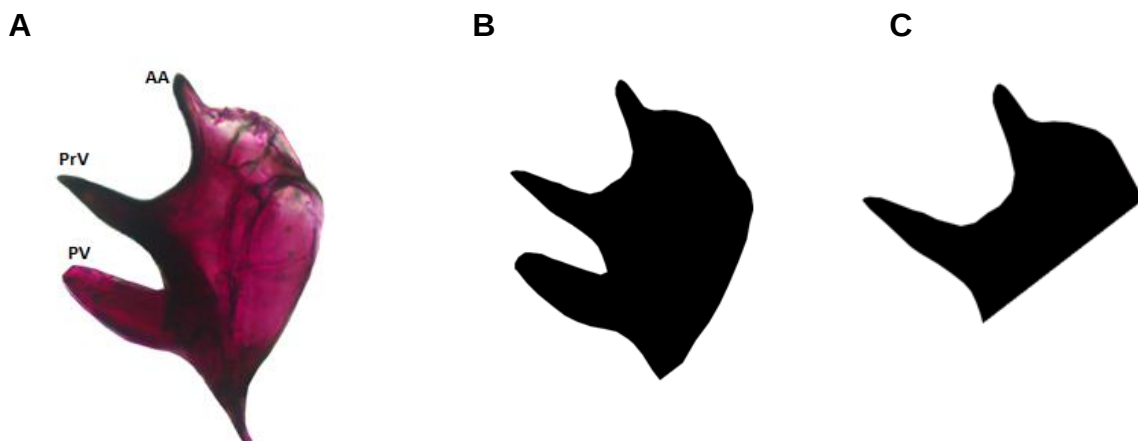
Duas análises diferentes foram efetuadas, utilizando o contorno total ou o contorno parcial dos edeagos, sendo esta última realizada utilizando somente a região frontal, onde se localizam o ápice e o processo ventral (Figuras 2B-C). Esta é a região que sofre maior variação no subgrupo *sturtevanti* (MOURÃO; BICUDO, 1967), grupo *virilis* (KULIKOV et al., 2004) e grupo *repleta* (FRANCO et al., 2006; RICHMOND et al., 2012), tendo sido classificada por Kulikov et al. (2004) como um “*hot spot*” evolutivo.

Tanto na análise total, como na parcial, utilizamos modelagens dos contornos por Descritores Elípticos de Fourier (KUHL; GIARDINA, 1982) com 25 harmônicas, ou seja, utilizando 25 segmentos de funções senos e cossenos como ajustes, e a de Análise dos Componentes Principais. Assim, selecionamos as variáveis, representadas pelos componentes principais (PC), responsáveis pela maior variação destes contornos.

Realizamos Testes de Levene com o objetivo de verificar igualdade entre as variâncias das populações. Como os PC não apresentaram normalidade (Teste de Shapiro-Wilk com $P < 0,01$), utilizamos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, considerando as variáveis “população”, “Faixa latitudinal”, “Fitofisionomia”, “Área”, “Umidade Relativa” e “Temperatura Média Anual”, conforme descritas na tabela 1.

Realizamos também Análises de Aglomerados utilizando os PC's escolhidos, seguidas de Análises de Similaridades (Anosim). Todas as análises foram feitas com o auxílio dos programas Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004) e Past3 (HAMMER et al., 2001).

Figura 2A-C. A. Vista lateral do edeago com as três estruturas principais em destaque: AA = ápice do edeago, PrV = Processo Ventral e PV = Parâmetros Ventrals. B. Contornos do edeago após edição no *software* Photoshop. C. Arco entre o ápice e o processo ventral.

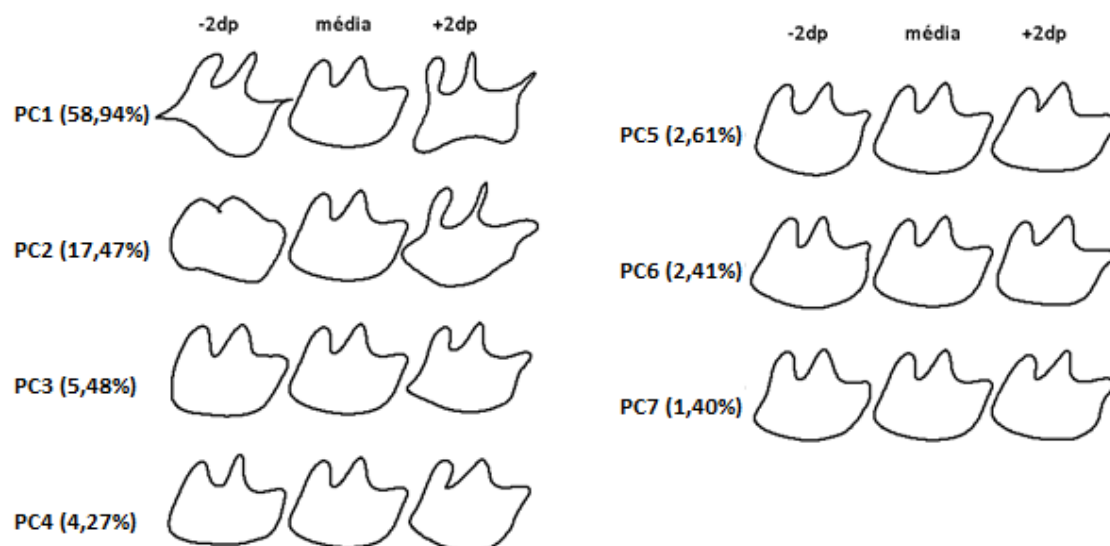


Resultados

- **Análise morfométrica do edeago total**

Para a análise dos contornos totais dos edeagos obtivemos 72 componentes principais, dos quais selecionamos os sete primeiros que concentram a maior porcentagem da variação nos contornos dos edeagos (92,57% conjuntamente). Os componentes PC1 e PC2, responsáveis respectivamente por 58,93% e 17,46% da variação, mostraram-se altamente variáveis em diversas regiões do contorno, inclusive na região que mais diferencia as espécies do subgrupo *sturtevanti*, localizada entre o ápice e o processo ventral. Esta região, entretanto, está melhor representada nos componentes PC3 a PC7 que explicam conjuntamente apenas 16,17% da variação dos edeagos (Figura 3).

Figura 3. Variações nos contornos dos edeagos para os sete primeiros PC. A coluna central apresenta o contorno médio dos edeagos, e as colunas laterais, a média menos e mais dois desvios-padrão (dp).



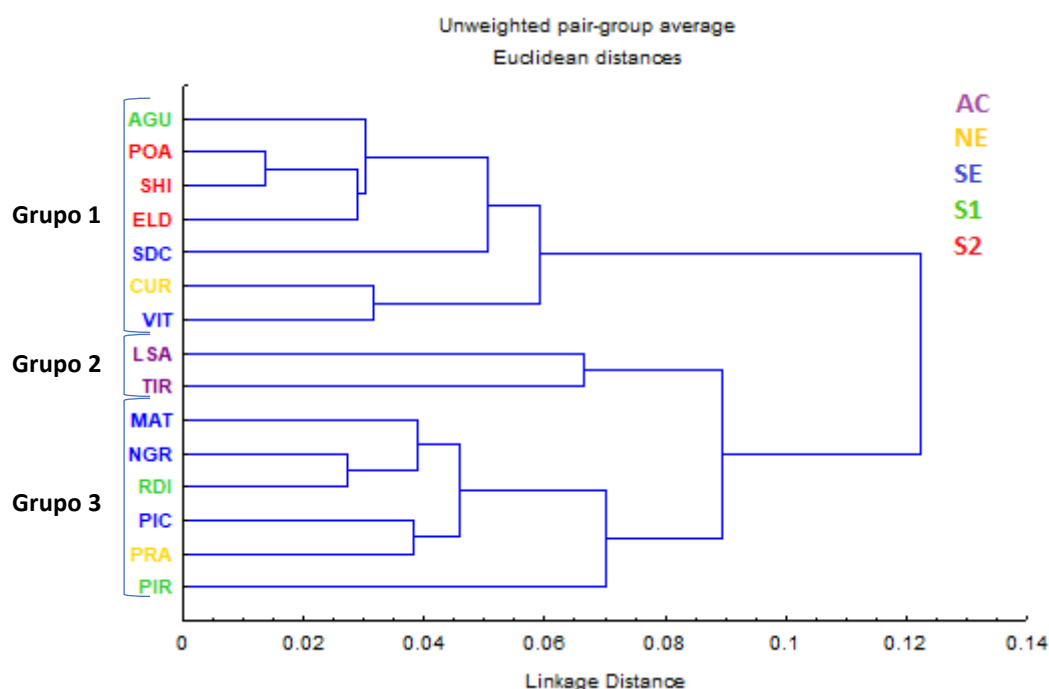
No total, foram obtidas diferenças significativas entre as populações para todos os PC nos testes de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$). Análises posteriores de comparação par-a-par entre as populações mostraram diferenças significativas entre diversas populações, com destaque às populações provenientes de Costa Rica (TIR e LSA), que se diferenciam das demais principalmente em relação aos componentes PC4, PC5 e PC6 (tabela 2). Novamente podemos ver que PC1 e PC2 contribuem menos que os demais componentes para a diferenciação das populações.

Tabela 2 Comparações par-a-par entre as populações. As siglas utilizadas para as populações estão descritas na tabela 1. Os números indicam os componentes principais para os quais houve diferença significativa entre as populações ($P < 0.05$).

		AC		NE		SE					S1			S2	
		TIR	LSA	CUR	PRA	VIT	NGR	MAT	SDC	PIC	PIR	TDI	AGU	ELD	POA
AC	TIR														
	LSA														
NE	CUR	5/6	6												
	PRA	2/3/5/6	4												
SE	VIT		6		3/7										
	NGR	2/5/6	4												
	MAT	5/6	4/5			1									
	SDC	5/6	5/6	5	5	5	5								
	PIC	2/5/6	4/5	4		3/7			6/7						
S1	PIR		4	6	3	1/6	6/7	6	5/6/7	3					
	TDI	5	4/5		3					3					
	AGU	6	4		3			1	5	3	1				
S2	ELD	5/6	4/5/6		3			1		3	1/6				
	POA	5/6	4/5		3/7			1		3/7	1/7				
	SHI	5/6	4/5		3/7		1			1/7	6/7				

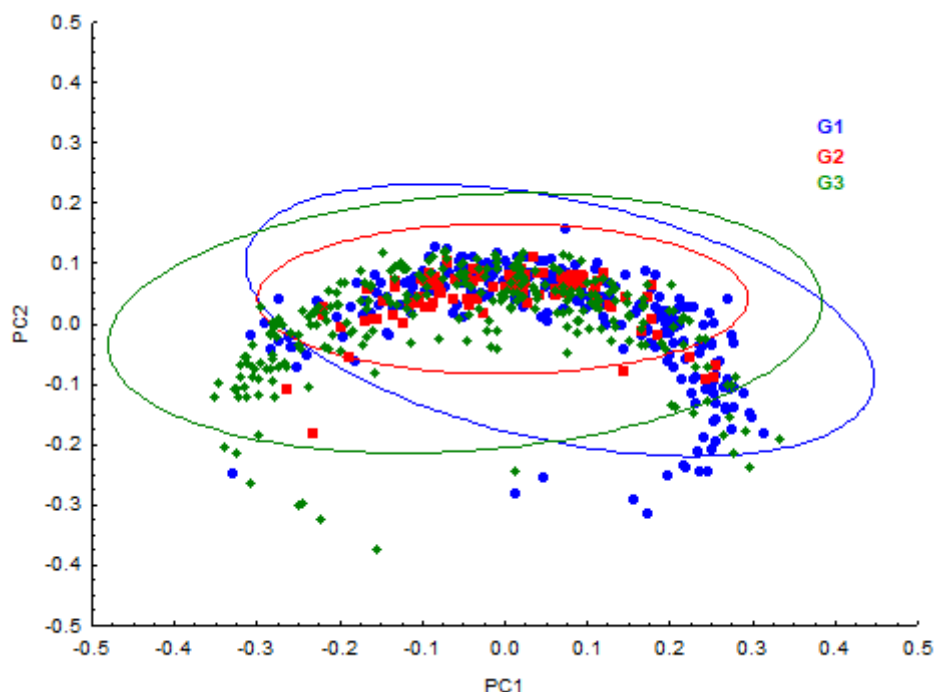
Utilizando a Análise de Aglomerados (Análise de *cluster*), obtivemos três agrupamentos que sinalizam haver alguma correlação entre forma do edeago e localização geográfica (Figura 4). O grupo 1 foi formado principalmente por populações dos extremos da distribuição no Brasil, tanto do Nordeste quanto do Sul, com exceção de SDC. O grupo 2 foi formado com as populações da América Central (LSA e TIR). E o grupo 3 concentrou principalmente as populações mais centrais da distribuição no Brasil, com exceção de PRA.

Figura 4. Análise de *cluster* para as amostras de quinze populações naturais recém-coletadas. As cores indicam as diferentes faixas latitudinais descritas na Tabela 1.



A análise de similaridades (Anosim) entre os 3 grupos apontou diferença significativa ($R = 0,9539$, $P=0,0001$) entre os grupos, assim como as análises comparativas par-a-par entre eles (Grupo 1 x Grupo 2: $P=0,035$; Grupo 1 x Grupo 3: $P=0,032$ e Grupo 2 x Grupo 3: $P=0,0006$). As porcentagens de similaridade entre os grupos apontaram que os componentes PC1 e PC2 são os maiores responsáveis pelas diferenças entre os grupos. Como pode ser observado na figura 3, estes componentes demonstram variação não somente na região frontal com em diversas outras regiões do edeago. A figura 5 mostra que apesar de PC1 e PC2 terem sido os maiores responsáveis pelas diferenças entre os grupos, eles são pouco explicativos na diferenciação dos grupos (e das populações), corroborando também os resultados das análises par-a-par (Tabela 3). Estes resultados justificam então uma análise mais detalhada da região do edeago que mais varia (arco entre o ápice e o processo ventral).

Figura 5. Distribuição das populações recém coletadas em relação aos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) do edeago total, com ênfase aos agrupamentos obtidos por Análise de *cluster*.



- **Análise morfométrica do edeago parcial**

Nesta análise, os sete primeiros PC utilizados foram responsáveis por 94,07% da variação da forma da região frontal do edeago, que contém o arco entre o ápice e o processo ventral. Testes de Levene, para diferenças entre as variâncias dos grupos apontaram diferenças significativas para todos os PC ($P < 0.01$), com exceção do componente PC4 ($P = 0.05$) (tabela 4).

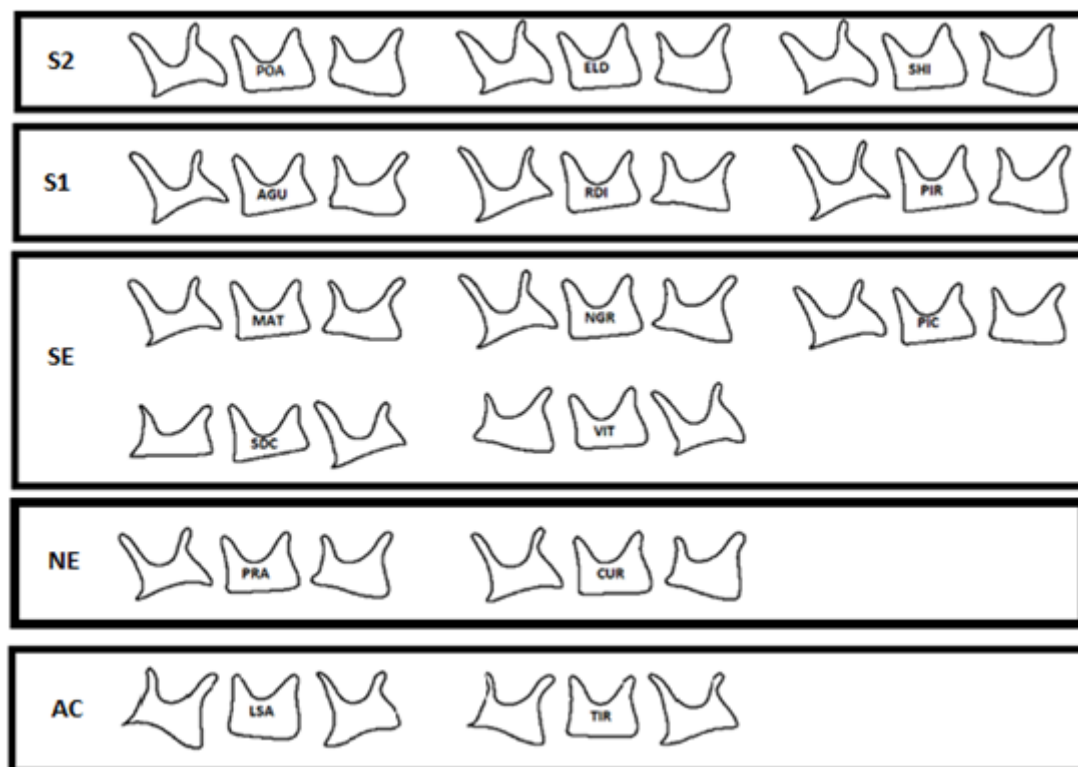
Quando testamos a normalidade dos dados, todos os componentes principais (com exceção de PC3 – $P = 0,78$) mostraram desvios da normalidade ($P < 0,01$). Assim, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis que mostrou a existência de diferenças significativas entre as populações para todos os sete componentes principais estudados (tabela 3).

Tabela 3. Resultados para o teste de Levene, para igualdade de variâncias, e de para o Teste de Kruskal-Wallis, para diferenciação entre as populações, para os sete componentes principais.

Componente	Teste de Levene		Kruskal-Wallis	
	F	p	H	p
PC1	7,65172	0,00000	192,4463	0,0000
PC2	3,04501	0,00001	160,6640	0,0000
PC3	3,55440	0,00000	166,7255	0,0000
PC4	1,58824	0,05268	113,2311	0,0000
PC5	2,24810	0,00175	87,0722	0,0000
PC6	5,14144	0,00000	78,1522	0,0000
PC7	2,24904	0,00174	169,6276	0,0000

Plotando os contornos médios dos edeagos parciais das populações, foi verificada similaridade entre os contornos médios das populações de cada faixa latitudinal, mas dissimilaridade entre as faixas latitudinais, em especial, verifica-se grande dissimilaridade entre as populações da faixa latitudinal AC e as demais populações (Figura 6).

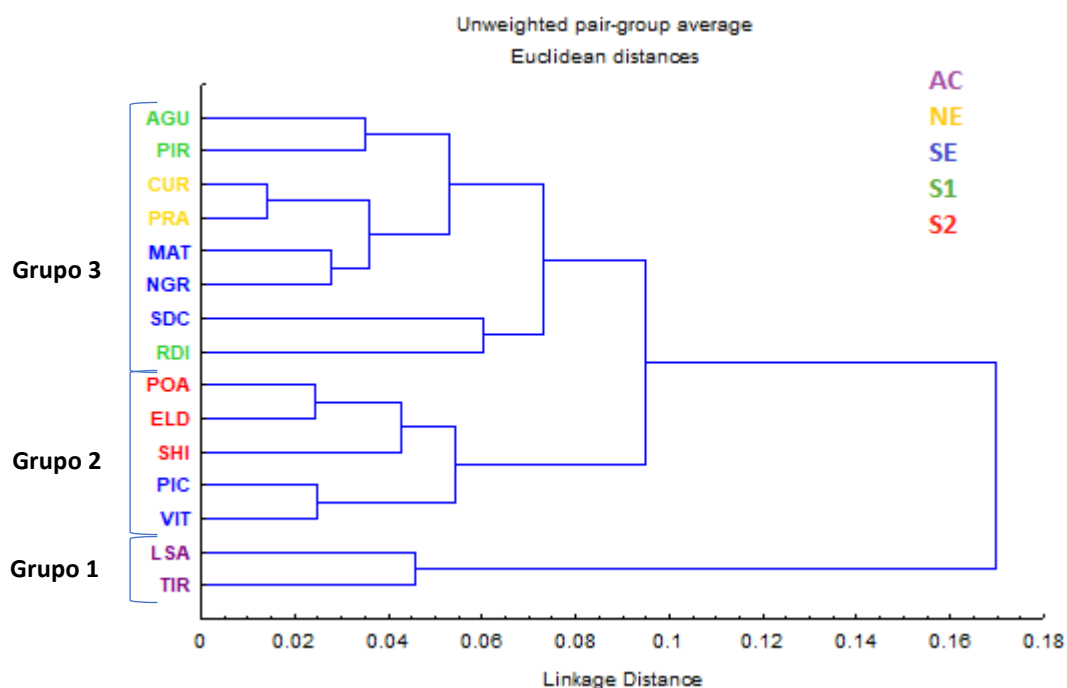
Figura 6. Contornos médios da região contendo o arco entre o ápice e o processo ventral dos edeagos das quinze populações recém coletadas. No centro, com a sigla da amostra está o contorno médio, à sua esquerda a média menos dois desvios-padrão e à sua direita, a média mais dois desvios-padrão.



Utilizando técnicas de agrupamento seguindo distâncias euclidianas entre os sete primeiros PC para as amostras de quinze populações recém-coletadas, foi possível detectar novamente que, de modo geral, ocorreu correspondência dos agrupamentos com a origem geográfica (faixa de latitude) da população (Figura 7). Mais uma vez, foi possível visualizar a formação de três grandes grupos: o primeiro formado pelas duas populações da AC (TIR e LSA), que possui grande distância de ligação com os outros dois agrupamentos; o segundo formado pelas amostras de populações do extremo sul do Brasil, faixa latitudinal S2 (POA, ELD, e SHI) e duas populações litorâneas da faixa SE (PIC e VIT), que se mostraram próximas morfologicamente; e o terceiro formado por populações

de S1 (PIR, AGU e RDI), as populações da faixa NE (CUR e PRA) e três outras populações de SE (MAT, NGR e SDC). Dentro deste agrupamento, interessante ressaltar a diferenciação entre as populações de S1, ficando RDI bem distante das demais (AGU e PIR), e a baixa diferenciação morfológica entre as populações de MAT e NGR da região SE, e entre CUR e PRA da região NE.

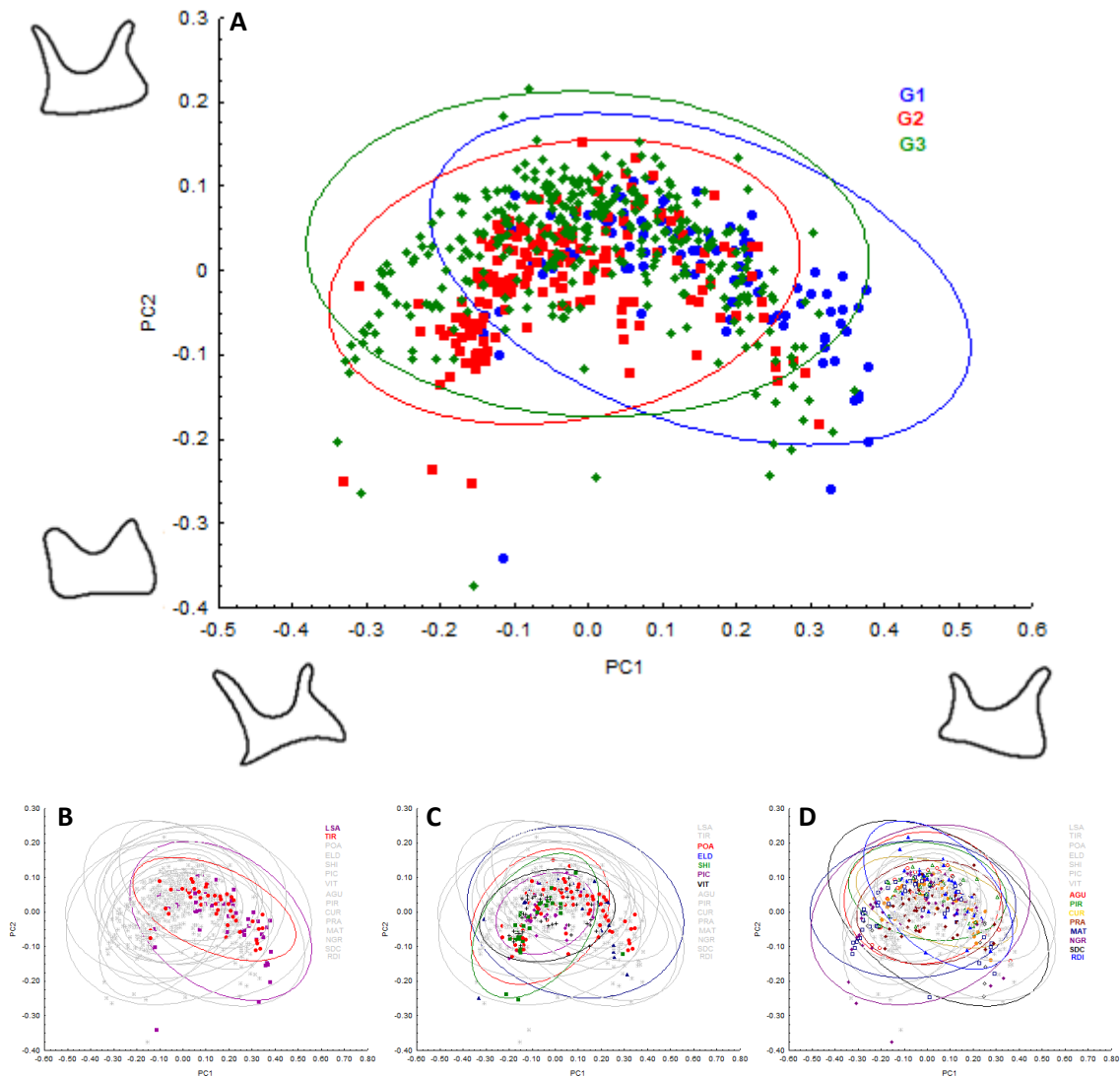
Figura 7. Análise de *cluster* das amostras de populações naturais recém-coletadas quanto à região contendo o arco dos edeagos. As faixas latitudinais (descritas na Tabela 1) estão representadas por cores diferentes.



A análise de similaridades mostrou diferença significativa entre os grupos (Anosim: $R = 0,8415$, $P = 0,0001$) e a análise dos grupos par-a-par mostrou que as diferenças entre os grupos 1 e 2 não foram significativas ($P = 0,0505$), mas ficaram próximas do limite superior de significância, e foram significantes para as demais comparações (Grupo 1 x Grupo 3: $P = 0,0214$ e Grupo 2 x Grupo 3: $P = 0,0009$).

Os dois primeiros componentes principais explicaram pelo menos 84% da diferenciação entre os grupos, e estes componentes mostram variação principalmente na região frontal, entre o ápice e o processo ventral. PC1 foi responsável pela variação no comprimento comparativo do ápice e do processo ventral, e PC2 pelo comprimento destas duas estruturas conjuntamente. As populações de AC diferenciam-se das demais por possuírem edeagos com ápice mais alongado e processo ventral mais curto, enquanto que a diferenciação entre os grupos 2 e 3 ocorre principalmente por causa de PC2, sendo que as populações do grupo 2 apresentam edeagos com ápices e processos ventrais mais curtos que as populações do grupo 3 (Figura 8 A-D).

Figura 8 A-D. Distribuição das populações em relação aos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) dos edeagos parciais. A. Agrupamentos obtidos por Análise de *cluster*. B. Populações que compõem o grupo 1. C. Populações que compõem o grupo 2. D. Populações que compõem o grupo 3.



Testes de Kruskal-Wallis mostraram que os efeitos das variáveis “Fitofisionomia” e “Faixa Latitudinal” são significativos para PC1 e PC2 ($P=0,001$ e $P=0,000$, respectivamente) e análises de regressão linear mostraram que estes dois componentes se correlacionam com as variáveis “Umidade Relativa” ($P=0,0045$) e “Temperatura Média Anual” ($P=0,0081$) mas não com a variável “Área” ($P=0,8774$).

Discussão

É fato que quando a variação é medida usando fenótipos selvagens, os efeitos ambientais podem obscurecer os níveis reais da variação, que podem ser sub ou superestimados devido a plasticidade fenotípica devido ao ambiente. Isto foi claramente demonstrado por Soto et al. (2007, 2008), em experimentos controlados em laboratório utilizando somente uma variável, dietas semi-naturais. Entretanto, há estudos em diferentes táxons que mostram que isto nem sempre é verdadeiro (LEINONEN *et al.* 2008) e que o uso de fenótipos selvagens para medidas da variabilidade genética é confiável *per se* (VILELA, 1983; ARNQVIST, 1997; SOTO *et al.*, 2007; ZANINI *et al.*, 2015).

A avaliação da diferenciação morfológica entre as populações naturais amostradas, utilizando o edeago total, mostrou relação com distribuição geográfica das mesmas. Isto foi evidenciando pelo fato de que as amostras das populações da Costa Rica se mostraram mais semelhantes entre si do que com as demais. Além disso, com relação às amostras brasileiras, a maioria das localizadas nos dois extremos da distribuição (CUR, VIT, ELD, SHI, POA e AGU) apresentaram morfologia mais próxima entre si do que com as demais amostras localizadas no centro da distribuição.

Esta relação entre a variação morfológica e a distribuição geográfica das populações ficou ainda mais clara quando foi realizada a análise parcial do edeago, utilizando somente a região entre o ápice e o processo ventral, conhecidamente uma região informativa para detectar diferenciação no subgrupo *sturtevanti* (MOURÃO; BICUDO, 1967; SOUSA et al., 2014). Assim, os nossos resultados mostraram que a escolha correta da região do edeago a ser

analisada é fator crucial em estudos de diferenciação de populações por morfometria geométrica.

Neste trabalho não foi observada correlação da forma do edeago com o tamanho do fragmento de mata de onde provém a população. Isto pode ser em parte explicado pelo fato de que embora as fitofisionomias da Mata Atlântica terem uma classificação geral, existe muita diversificação nos estados de preservação e de latitude entre elas, e também os recursos disponíveis em cada uma das áreas. Então, esta avaliação pode ser complexa em sua análise, e o tamanho da área não deve ser o único fator a ser analisado e que estaria influenciando a variação morfológica, e sim uma série de condições ecológicas e ambientais, como a temperatura e umidade, entre outras. De modo geral, estudos sobre fatores ecológicos relacionados ao grupo *saltans*, onde a espécie *D. sturtevantii* está incluída, são inexistentes. A única informação existente é que esta espécie é generalista, ou seja, utiliza diferentes fontes de alimentação e oviposição (DAVID; TSACAS, 1981; CHAVES; TIDON, 2008; SCHMITZ et al., 2007; MATEUS et al., 2006; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; PENARIOL, 2012).

Em todas as análises realizadas, as populações recém-coletadas na América Central (TIR e LSA) mostraram-se mais próximas entre si e divergentes em relação às populações recém-coletadas no Brasil. Em relação a dados dos genes mitocondriais (*COI* e *COII*), estas populações também não mostraram diferenças significativas entre si e nas análises genômicas por NGS (*New Generation Sequencing*) há também uma grande divergência em relação as demais populações brasileiras (ZORZATTO, 2019). Intercruzamentos realizados entre as populações da América Central (TIR) e as do Brasil (SDC) (dados não

mostrados) indicam a existência de um isolamento incipiente. Isolamento reprodutivo incipiente entre populações do México, Jamaica, Guatemala, Colômbia, Guiana e diversas localidades no Brasil (Belém (PA), Marabá (PA), Rio de Janeiro (RJ), Brasília (DF), Tapuruquara (AM), Manaus (AM) Olímpia (SP), São José do Rio Preto (SP), Ilha das Cobras (SP), Guarujá (SP) e Bertioga (SP)) já foram obtidos em trabalhos anteriores, indicando inclusive que o isolamento sexual pode ser o principal fator responsável (DOBZHANSKY, 1944; BICUDO, 1979; HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1997). Dados da literatura indicam que a variação na morfologia do edeago está correlacionada com o sucesso na cópula (ANDRADE et al., 2009; SOTO et al., 2013), entretanto, as barreiras à reprodução são mais complexas, e cada grupo de organismo tem sua história evolutiva, necessitando assim da avaliação de um número maior de características genéticas, ecológicas, de comportamento e, sem dúvida, reprodutivas. Por exemplo, Civetta e Gaudreau (2015) apontam que outras partes da anatomia genital, tais como a musculatura da terminália masculina, podem estar relacionadas à não transferência de esperma. Segundo Vigoder et al. (2015), os sons pré-copulatórios, obtidos durante a agitação das asas pelos machos, correlacionam-se com o sucesso da corte.

A variação obtida nos edeagos das 15 populações naturais de *D. sturtervanti* estudadas, com a formação de 3 grupos geográficos, dois mais nítidos, o grupo 1 formado pelas populações provenientes da Costa Rica, na América Central e o grupo 2, formado pelas populações da região Sul do Brasil (SHI, POA e ELD) e por duas populações litorâneas da região Sudeste (PIC e VIT) e um terceiro um pouco mais indefinido contendo uma mistura de algumas localidades, foi parcialmente observada em estudos do nosso grupo de pesquisa

com microssatélites e genes mitocondriais, utilizando a maioria das populações analisadas aqui (TRAVA, 2018; ZORZATTO).

Os resultados dos trabalhos citados anteriormente mostraram existir uma estruturação populacional e eventos de expansão demográfica para as populações de *D. sturtevantii*. A AMOVA resultou na formação de três grupos populacionais (Norte, Sudeste e Sul), o que provavelmente reflete a expansão e a retração da Floresta Atlântica dentro das fitofisionomias onde estas populações ocorrem. Estes dados indicam diferenciação genética ocorrendo nas populações de *D. sturtevantii* relacionada com a diferenciação do seu habitat, e no nosso caso, muito provavelmente refletida na diferenciação das estruturas morfológicas estudadas no presente trabalho. Assim, fatores históricos e demográficos podem estar afetando a distribuição desta espécie nos diferentes biomas em que ela ocorre.

Numa análise focada mais no marcador morfológico edeago, utilizando a comparação das amostras de populações naturais, foi possível observar que as maiores diferenças na forma dos edeagos ocorreram no comprimento do ápice e do processo ventral. Isto foi evidenciado pelo fato de que as amostras provindas da América Central se destacaram das demais por possuir ápices mais longos e processos ventrais mais curtos. Além disso, a população SDC (faixa latitudinal SE) apresentou arcos mais abertos. O distanciamento da população RDI das duas outras populações da região S1 e a proximidade morfológica das populações MAT e NGR (NE), corroboram resultados obtidos em nosso laboratório em análises de microssatélites (TRAVA, 2018).

Apesar da morfologia do edeago ser uma característica mais conservada quando comparada com outras características morfológicas no que tange à

evolução influenciada por fatores ambientais (EBERHARD, 2010; MATEUS *et.al.*, 2013), tais fatores podem estar contribuindo para favorecer a diversificação desta característica. Isto pode estar relacionado ao fato de que nossos resultados mostraram correlação entre forma do edeago e as variáveis ambientais fitofisionomia, umidade relativa e temperatura média anual, ainda que com menor correlação que com a estruturação geográfica.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Daniela De Toni e ao Prof. Dr. Hermes J. Schmitz pelo fornecimento de algumas linhagens de *D. sturtevantii*. À FAPESP pelo apoio ao projeto de pesquisa (processo número 2014/14059-0); à CAPES pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Unesp/Ibilce e à CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Referências

- Almeida, LM, Carareto CMA. 2002. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). Iheringia, Sér. Zool.92(2): 71-79.
- Andrade CAC, Hatadani LM, Klaczko LB. 2005. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*. J Therm Biol. 30: 518–523.
- Andrade CAC, Vieira RD, Ananina G, Klaczko LB. 2009. Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. Genetica 135: 13-23.

- Arnqvist G. 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol J Linn.* 60: 365–379.
- Bicudo HEMC. 1979. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV The *sturtevantii* subgroup. *Braz J Genet.* 2: 247-258.
- Briscoe DA, Malpica JM, Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks RG, Barker JSF. 1992. Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology* 6:416-425.
- Carareto CM, Lourenço MF, Mourão CA. 1999. Sensitivity of fitness to variation in its components in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia, Série Zoologia* 87:37-48.
- Castro JP, Carareto CMA. 2004. *P* elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. *J. Mol. Evol.* 32: 383-387.
- Chaves NB, Tidon R. 2008. Biogeographical aspects of drosophilids (*Diptera*, *Drosophilidae*) of the Brazilian savanna. *Rev. Bras. Entomol. São Paulo* 52(3): 340-348.
- Civetta A, Gaudreau C. 2015. Hybrid male sterility between *Drosophila willistoni* species is caused by male failure to transfer sperm during copulation. *BMC Evolutionary Biology* 15: 75-82.
- Clark JB, Altheide TK, Schlosser MJ, Kidwell MG. 1995. Molecular evolution of *P* transposable elements in genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 902-913.

- Clark JB, Kidwell MG. 1997. Phylogenetic perspective on P transposable elements evolution in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11428-11433.
- David JR, Tsacas L. 1981. Cosmopolitan, subcosmopolitan and widespread species: different strategies within the *Drosophilid* family (Diptera). C. R. Soc. Biogr. 57: 11-26.
- Dobzhansky T, Pavan C. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. Boletins da Fac. Filos., Ciênc. Letras da Universidade de São Paulo, Biologia Geral 4: 7-72.
- Dobzhansky T. 1944. Experiments on sexual isolation in *Drosophila*. III. Geographic strains of *Drosophila sturtevantii*. Proceedings of the National Academy of Sciences 30(11): 335-339.
- Eberhard WG. 2010. Rapid divergent evolution of genitalia: theory and data updated. In: Leonard JL, Córdoba-Aguilar A (eds) The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals. New York: Oxford University Press: 40–78.
- Franco FF, Prado PRR, Sene FM, Costa LF, Manfrin MH. 2006. Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related cactophilic species of *Drosophila* (Diptera; *Drosophilidae*) in South America. An. Acad. Bras. Ciênc. 78(2): 203-212.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp.
- Hosaki-Kobayashi M, Bicudo HEMC. 1994. Productivity in mass crosses of *Drosophila sturtevantii*: a comparative study of laboratory stocks and recently collected flies. Ver. Brasil. Genet. 17(4): 393-399.

- Hosaki-Kobayashi M, Bicudo HEMC. 1997. Inversion polymorphism in laboratory strains and natural samples of *Drosophila sturtevantii* (*saltans* group, *sturtevantii* subgroup). *Cytobios* 89: 7-20.
- Hosken DJ, Stockley P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol Evol* 19: 87–93.
- House CM, Simmons LW. 2005. 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* 18(5): 1281-1292.
- House CM et al. 2013. Sexual and Natural Selection Both Influence Male Genital Evolution. *PLoS ONE* 8(5): e63807.
- Huber BA, Brescovit AD, Rheims CA. 2005. 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* 36(3): 285-292.
- Iwata H, Ukai Y. 2002. Shape: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.* 93: 384-385.
- Kaneshiro KY. 1969. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. *Univ. Texas Pub.* 6918: 55-70.
- Kuhl FP, Giardina CR. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Images Processing* 18: 236-258.
- Kulikov AM, Melnikov AI, Gornostaev NG, Lazebny OE, Mitrofanov VG. 2004. Morphological analysis of male mating organ in the *Drosophila virilis* species group: a multivariate approach. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 42: 135–144.

- Leinonen T, O'Hara RB, Cano JM, Merilä J. 2008. Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology* 21:1–17.
- Machado LPB, Alves NS, Prestes JO, Salomon GR, Biegai D, Wouk T, Mateus RP. 2017. Esterase profile in *Drosophila mercatorum pararepleta* (Diptera; *Drosophilidae*), a non-cactophilic species of the *repleta* group: development patterns and aspects of genetic variability. *Zoological Studies* 56:21.
- Magalhães LE, Bjomberg AJS. 1957. Estudo da terminália masculina de *Drosophila*, (Drosophilidae, Diptera). *Braz. J. Biol.* 16: 273-280.
- Magalhães LE. 1962. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. *UT Publications*, 6205: 135-154.
- Masly JP, Dalton JE, Srivastava S, Chen L, Arbeitman MN. 2011. The genetic basis of rapidly evolving male genital morphology in *Drosophila*. *Genetics* 189(1): 357– 374.
- Masly JP. 2012. 170 Years of “Lock-and-Key”: Genital morphology and reproductive isolation. *International Journal of Evolutionary Biology*. doi:10.1155/2012/247352.
- Mateus RP, Buschini MLT, Sene FM. 2006. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana–Paraguay River Basin. *Braz J Biol*, 66: 719–729.
- Mateus RP, Moura MO, Manfrin MH, Monteiro SG, Sene FM. 2013. Contrasting patterns of within-species morphological variation in two cactophilic *Drosophila* species (Diptera: *Drosophilidae*). *Neotrop. Entomol.* 42: 384-392.

- Mourão CA, Bicudo HEMC. 1967. Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo “*saltans*” (*Drosophilidae*, *Diptera*). Papéis avulsos de Zoologia 20(12): 123-134.
- Nagata N, Kubota K, Yahiro K, Sota T. 2007. Mechanical barriers to introgressive hybridization revealed by mitochondrial introgression patterns in *Ohomopterous* ground beetle assemblages. Molecular Ecology 16(22): 4822-4836.
- Paulson DR. 1974. Reproductive isolation in Damselflies. Systematic Biology 23: 40-49.
- Penariol L. 2012. Traços quantitativos e abundância de drosofilídeos como indicadores de impacto ambiental em fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
- Richmond MP, Johnson S, Markow TA. 2012. Evolution of reproductive morphology among recently diverged taxa in the *Drosophila mojavensis* species cluster. Ecology and Evolution 2(2): 397-408.
- Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP. 2007. Taxonomic survey of *Drosophilidae* (*Diptera*) from mangrove forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. Neotrop. Entomol. 36(1): 53-64.
- Setta N, Loreto ELS, Carareto CMA. 2007a. Is the evolutionary history of the O-type *P* element in the *saltans* and *willistoni* groups of *Drosophila* similar to that of the canonical *P* element? J. Mol. Evol. 65: 715-724.
- Setta N, Costa APP, Lopes FR, Carareto CMA. 2007b. Transposon display supports transpositional activity of *P* elements in species of the *saltans* group of *Drosophila*. Journal of Genetics 86(1): 37-43.

- Silva JC, Kidwell MG. 2004. Evolution of P elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. *Genetics* 168(3): 1323-1335.
- Sota T, Kubota K. 1998. Genital lock-and-key as a selective agent against hybridization. *Evolution* 52: 1507-1513.
- Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ, Hasson E. 2007. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affecting genital morphology in sibling *Drosophila* species and their hybrids. *BMC Evol. Biol.* 7: 77.
- Soto IM, Manfrin MH, Hasson E. 2008. Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic *Drosophila*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46, 368–373.
- Soto IM, Carreira VP, Soto EM, Márquez F, Lipko P, Hasson E. 2013. Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology* 40(3): 395-407.
- Sousa TAJ, Noll FB, Bicudo HMC, Madi-Ravazzi L. 2014. Scanning electron microscopy of male terminalia and its application to species recognition and phylogenetic reconstruction in the *Drosophila saltans* group. *PlosOne* 9: 1-12.
- Statsoft Inc. 2004. Statistica (data analysis software system). version 7. www.statsoft.com.
- Trava BM. 2018. Estrutura populacional de *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biociências, UNESP, São José do Rio Preto-SP.

- Torres FR, Madi-Ravazzi L. 2006. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp (*Diptera*) in two woodland in the state of São Paulo, Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.* 96(4): 437-444.
- Vilela CR. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (*Diptera*, *Drosophilidae*). *Revista Bras Ent.* 27: 1–114.
- Vigoder FM, Souza NA, Brazil RP, Bruno RV, Costa PL, Ritchie MG, Klaczko LB, Peixoto AA. 2015. Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longripalpis* complex in Brazil. *Parasites & Vectors* 8: 290-301.
- Yassin A, Orgogozo V. 2013. Coevolution between Male and Female Genitalia in the *Drosophila melanogaster* Species Subgroup. *Plos One* 8(2): e57158.
- Zanini R, Deprá M, Valente VLS. 2015. Can sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup be recognized through combined microscopy techniques? *Revista Brasileira de Entomologia* 59: 323–331.
- Zorzato SV. 2019. Filogeografia de *Drosophila sturtevantii* (*Diptera: Drosophilidae*) em domínios da Mata Atlântica. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biociências, UNESP, São José do Rio Preto-SP.

Plasticidade fenotípica e *clines* em populações geográficas de *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae, grupo *saltans*, subgrupo *sturtevantii*) avaliadas pela morfometria das asas

CAPÍTULO II

Nas normas da revista *Biological Journal of Linnean Society*
https://academic.oup.com/biolinnean/pages/General_Instructions

Plasticidade fenotípica e *clines* em populações geográficas de *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae, grupo *saltans*, subgrupo *sturtevantii*) avaliadas pela morfometria das asas

Luís Fernando Segala¹, Rogério Pincela Mateus² e Lilian Madi-Ravazzi¹

¹*Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.*

²*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Campus CEDETEG, Guarapuava, PR, Brazil.*

Morfometria geométrica da asa em *Drosophila sturtevantii*.

Resumo

A asa é uma das características mais utilizadas em estudos evolutivos e de diferenciação populacional em drosofilídeos por ser altamente sensível a variações genéticas e principalmente ambientais. *Drosophila sturtevantii* é uma das espécies crípticas do subgrupo *sturtevantii* abundantemente encontrada em diferentes biomas, o que a faz um excelente organismo modelo em estudos populacionais. Neste trabalho, utilizamos técnicas de morfometria geométrica para avaliar a variabilidade na forma e no tamanho de asas de machos de quinze populações recém-coletadas de *D. sturtevantii*. Nossos resultados evidenciaram que o tamanho da asa se correlaciona mais com a localização geográfica e a forma mais com a fitofisionomia da mata e com fatores ambientais. A interação entre tamanho e forma da asa mostrou-se contrária à obtida em outras espécies de drosófilas, apresentando asas maiores e mais arredondadas em regiões com temperaturas mais frias, resultado aparentemente observado até o momento para esta espécie.

Palavras-chave: Evolução morfológica. Diferenciação populacional. Interação ambiente e fenótipo.

Plasticidade fenotípica e *clines* em populações geográficas de *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae, grupo *saltans*, subgrupo *sturtevantii*) avaliadas pela morfometria das asas

Luís Fernando Segala¹, Rogério Pincela Mateus² e Lilian Madi-Ravazzi¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Campus CEDETEG, Guarapuava, PR, Brazil.

Introdução

A variabilidade fenotípica presente nas populações naturais é a matéria prima para a ação de fatores seletivos e estocásticos que são os principais mecanismos da evolução dos organismos. Qualquer traço, adaptativo ou não, que varia dentro e entre espécies é de interesse na perspectiva evolutiva. Traços morfométricos são geralmente fáceis para se avaliar em uma grande quantidade de indivíduos, tendo sido estudados em táxons tão distintos como cães (DRAKE; KLINGENBERG, 2008, 2010), estruturas florais (GOMES et al., 2006; STRELIN et al., 2016) e humanos (BULYGINA et al., 2006; BASTIR et al., 2007, 2015). Todos eles são geneticamente variáveis dentro e entre populações e também muito plásticos e sensíveis a condições ambientais. Muitas espécies de *Drosophila* têm sido utilizadas como organismo modelo para este tipo de estudo

por apresentar uma série de características favoráveis para sua análise, destacando-se os estudos com *D. melanogaster* (DAVID et al., 1994, 2006; PITCHERS et al., 2013; RAY et al., 2016) *D. simulans* (DEBAT et al., 2003; MATTA; BITNER-MATHÉ, 2004; CHAKIR et al., 2007) e espécies cactofílicas (MORAES; SENE, 2004; FRANCO et al., 2006; SOTO et al., 2008, 2013; RICHMOND et al., 2012). A asa é um dos marcadores morfológicos mais estudados em *Drosophila* por apresentar elevados níveis de homologia entre espécies (DEBAT et al., 2003; YASSIN et al., 2009), altos níveis de plasticidade fenotípica em relação a diferentes fontes de variação ambiental (WEBER, 1990; DAVID et al., 1994; MONTEIRO; REIS, 1999; MORIN et al., 1999; CARREIRA et al., 2006; SOTO et al., 2008) e existe evidência de que a variabilidade da morfologia da asa é alvo da seleção natural (POWELL, 1997; GILCHRIST et al., 2004).

Estudos demonstraram a alta plasticidade da asa, especialmente em função da temperatura (BITNER-MATHÉ; KLACZKO, 1999; DEBAT et al., 2003; SHEARER et al., 2016).

Diversos trabalhos com drosofilídeos chegaram à conclusão que variações na temperatura ambiental se correlacionam com a forma e com o tamanho da asa de maneira inversa (CAVICHI et al., 1985;1991; IMASHEVA et al.,1994; GILCHRIST et al., 2000). Em geral, observa-se a regra temperatura/tamanho, segundo a qual em temperaturas mais altas observa-se corpos menores, e conseqüentemente, asas menores (ANGILLETTA; DUNHAM, 2003; ANGILLETTA et al., 2004).

Loh et al. (2008) observaram asas mais alongadas em temperaturas mais baixas em *Zaprionus indianus*. Resultados similares foram encontrados em *D.*

melanogaster (AZEVEDO et al., 1998), *D. aldrichi*, *D. buzzatii* (LOESCHEKE et al., 2000) e *D. simulans* (MATTA; BITNER-MATHÉ, 2004).

A espécie neotropical *D. sturtevantii* Duda, 1925 (subgrupo *sturtevantii*, grupo *saltans*) é uma das poucas espécies de *Drosophila* que se adaptam a diferentes climas (DAVID; TSACAS, 1981) tendo sido abundantemente coletada em savanas (CHAVES; TIDON, 2008), manguezais (SCHMITZ et al., 2007) e principalmente na Mata Atlântica (MATEUS et al., 2006; TORRES; MADIRAVAZZI, 2006; PENARIOL, 2012). As populações dessa espécie têm sido avaliadas de longa data em diversos estudos quanto ao isolamento reprodutivo (DOBZHANSKY; PAVAN, 1943; BICUDO, 1979; HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1994, 1997), polimorfismos de inversões (BICUDO, 1973; HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1997), valor adaptativo (CARARETO, 1999), morfologia (MAGALHAES; BJORNBERG, 1957; MAGALHAES, 1962), esterases (NASCIMENTO; BICUDO, 2002, 2006; BERNARDO; BICUDO, 2009), elementos de transposição (CLARK et al., 1995; CLARK; KIDWELL, 1997; ALMEIDA; CARARETO, 2002; SILVA; KIDWELL, 2004; CASTRO; CARARETO, 2004; SETTA et al., 2007a, 2007b), sequências moleculares de genes estruturais (O'GRADY et al., 1998, RODRIGUEZ-TRELLIS et al., 1999) e mais recentemente a morfologia da terminália masculina utilizando a microscopia eletrônica de varredura (SOUSA et al., 2014). Foi verificada uma alta variabilidade genética em suas populações para a maioria dos marcadores considerados, o que a torna um excelente modelo para estudos de genética populacional.

As características apontadas acima para *D. sturtevantii*, associadas à inexistência de um amplo estudo populacional utilizando a técnica da

morfometria motivou-nos a realizar este trabalho, em que o objetivo principal foi avaliar a diferenciação populacional utilizando a morfometria geométrica das asas e verificar a associação dos resultados com as diferentes fitofisionomias da Mata Atlântica do Brasil e da Floresta tropical úmida da Costa Rica de onde procedem as populações.

Material e Métodos

Populações geográficas de *D. sturtevanti*

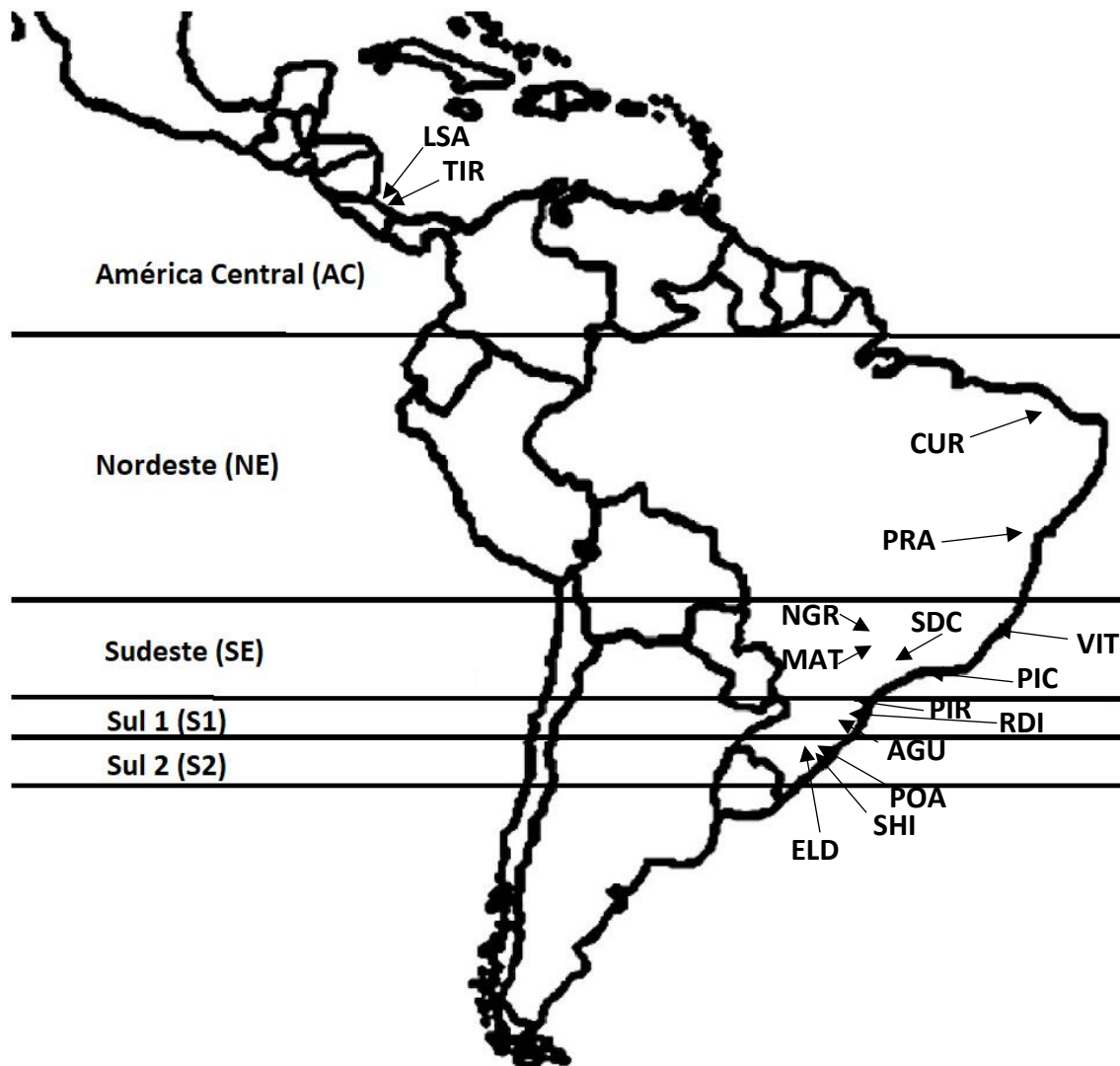
Foram analisados 604 machos recém coletados (anos 2016 a 2018) de quinze populações naturais de *D. sturtevanti* (tabela 1 e figura 1). As variáveis estão melhor descritas no capítulo anterior deste trabalho.

Tabela 1. Nome e siglas das populações naturais recém-coletadas, procedência geográfica, faixa latitudinal, coordenadas, tamanho da área do local da coleta, fitofisionomia da mata, temperatura média anual (T), umidade relativa média anual (UR) e tamanho amostral de machos utilizados no presente estudo (N).

Populações/Siglas	Procedência geográfica	Faixa latitudinal	Coordenadas	Área (ha)	Fitofisionomia	T (°C)	UR (%)	N
Tirimbina/ TIR	Sarapiquí (CR)	AC	10°23'N, 84°07'O	345	FTU	25,40	78,40	43
La Selva/ LSA	Sarapiquí (CR)	AC	10°25'N, 84°00'O	1.536	FTU	22,39	81,98	52
Curió/ CUR	Fortaleza (CE)	NE	03°29'S, 38°16'O	57,5	FOA	26,46	74,91	54
Pratigi/ PRA	Pratigi (BA)	NE	13°51'S, 39°17'O	32.000	FOD	24,33	72,78	45
Vitória/ VIT	Vitória (ES)	SE	20°10'S, 40°12'O	217	FOD	23,71	74,50	44
Nova Granada/ NGR	Nova Granada (SP)	SE	20°32'S, 49°14'O	1.359,6	FES	24,30	59,11	50
Matão/ MAT	Matão (SP)	SE	21°37'S, 48°32'O	2.189,6	FES	23,01	60,88	60
Picinguaba/ PIC	Ubatuba (SP)	SE	23°21'S, 44°51'O	47.500	FOD	22,62	72,09	38
Cantareira/ SDC	São Paulo (SP)	SE	23°26'S, 46°38'O	64.800	FOD	21,52	68,48	26
Piraí/ PIR	Joinville (SC)	S1	26°18'S, 48°50'O	982,6	FOD	20,88	73,35	35
Ribeirão da Ilha/ RDI	Florianópolis (SC)	S1	27°47'S, 48°33'O	10.000	FOD	20,70	72,92	32
Aguaí/ AGU	Siderópolis (SC)	S1	28°25'S, 49°32'O	7.652	FOD	20,94	72,72	35
Eldorado/ ELD	Eldorado do Sul (RS)	S2	30°05'S, 51°40'O	1.560	FES	19,83	70,14	27
Porto Alegre/ POA	Porto Alegre (RS)	S2	30°02'S, 51°13'O	900	FES	19,32	77,57	31
Saint'Hilaire/ SHI	Porto Alegre (RS)	S2	30°05'S, 51°06'O	1.148	FES	20,20	77,61	32

AC = América Central, NE= Nordeste, SE = Sudeste, S1 = Sul 1, S2 = Sul 2, FTU = Floresta Tropical Úmida, FOA = Floresta Ombrófila Aberta, FOD = Floresta Ombrófila Densa, FES = Floresta Estadual Semidecidual. Fitofisionomias obtidas no site <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>. Dados abióticos (temperatura média anual e umidade relativa média anual) obtidos no site <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>.

Figura 1. Locais de coleta, com faixas latitudinais.



Análises das asas

A asa direita de cada macho foi removida e montada em lâminas contendo uma gota de álcool 70%. As imagens das asas foram capturadas usando um microscópio estereoscópico LEICA MZ16 com aumento de 3,2 X com câmera LEICA DFC295 de 5 MP acoplada. Em seguida, foram obtidos dez marcos anatômicos do tipo I (Figura

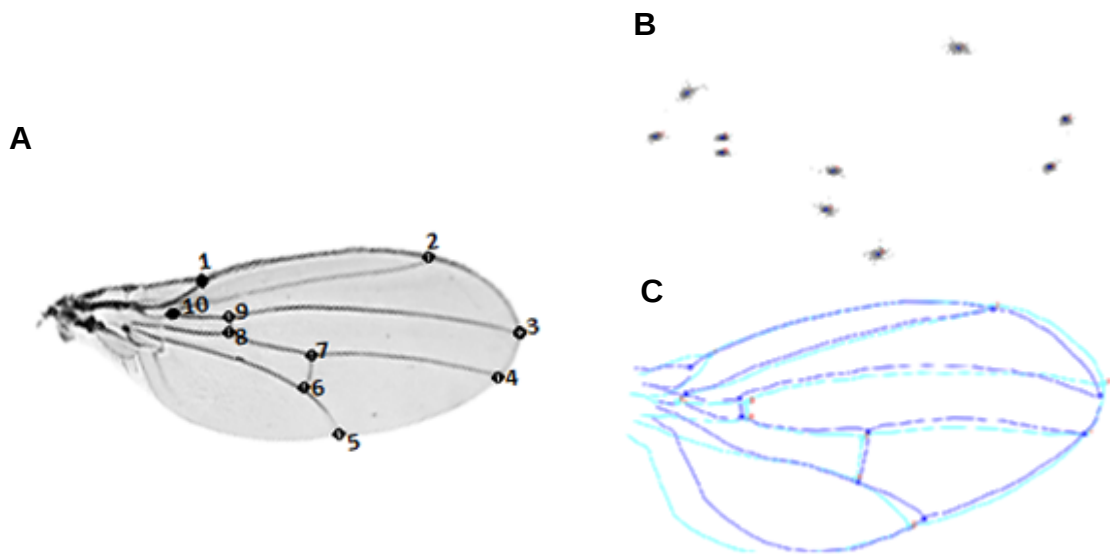
2) utilizando o programa TPSDig 2 (ROHLF, 2005). Os dez marcos anatômicos estão localizados nas intersecções de veias ou onde a veia encontra as margens da asa (HOFFMANN; SHIRRIFFS, 2002). Para testar a precisão das marcações, fizemos duas marcações em cada asa em períodos diferentes e inserimos em todas as análises a variável “repetição” com duas categorias de resposta: marcação 1 e marcação 2 (ARNQVIST; MARTENSSON, 1998).

Foram consideradas as variáveis “população” como efeito principal e “fitofisionomia”, “faixa latitudinal”, “temperatura anual média”, “umidade relativa” e “área do fragmento de mata coletado” como efeitos secundários. As características das populações estudadas, relativamente a essas variáveis são mostradas na tabela 1.

Os tamanhos médios das asas das vinte populações foram comparados pelo Método de Análise de Centroides, que mede a distância quadrática de cada marcador ao centro de gravidade da asa. Para a análise da forma, utilizamos Análises de Procrustes (GOODALL, 1991) que fazem o alinhamento dos marcadores em três etapas: remoção da variação do tamanho, translação das imagens a uma mesma localização e rotação para um ajuste que otimiza a superposição. Utilizamos Análises de Componentes Principais para reduzir as variáveis. Análises multivariadas foram empregadas para descrever a variação das variáveis “tamanho” e “forma”. As correlações entre o tamanho e a forma das asas e as variáveis ambientais foram testadas por correlações lineares múltiplas. Por fim, realizamos Análises Discriminantes que buscam reclassificar os indivíduos de cada população, de acordo com suas principais características e comparar os percentuais de acertos nesta reclassificação (KLINGENBERG, 2010; MARDIA, 1979). Para as Análises Discriminantes, utilizamos tanto Distâncias de Procrustes, como Distâncias de

Mahalanobis. Todas as análises foram processadas utilizando os *softwares* MorphoJ (KLINGENBERG, 2011) e Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Figura 2A-C. Marcos anatômicos da asa. A. Imagem lateral da asa. B. Dez marcos anatômicos após superposição de todas as asas, ajuste de tamanhos e rotação. C. Contornos das asas para análise entre o contorno médio (contorno mais claro) e as variações de acordo com os componentes principais (mais escuro).



Resultados

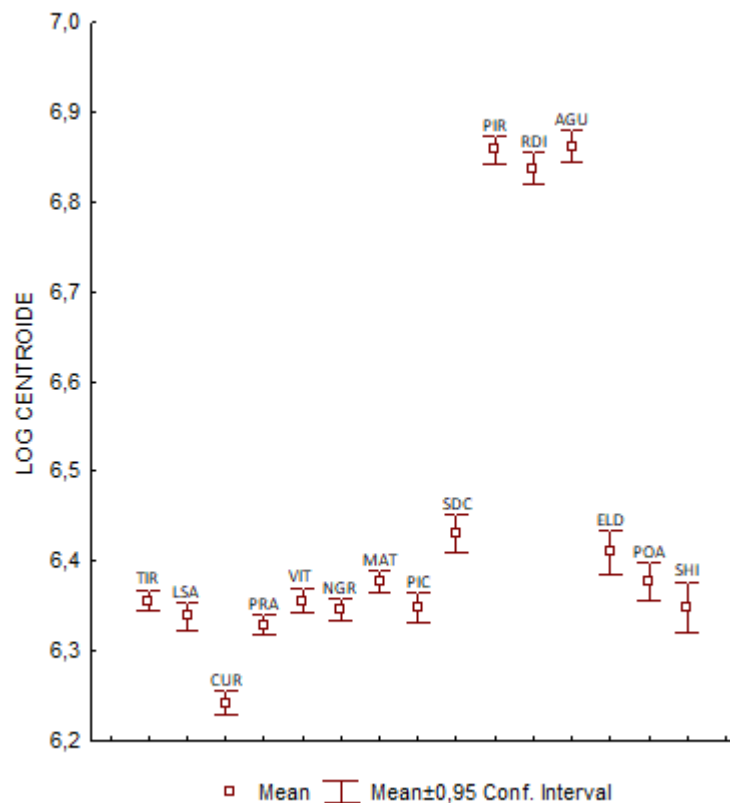
Nas análises para o tamanho (Centroides) e para a forma (Distâncias de Procrustes), a marcação dos marcos anatômicos foi realizada duas vezes em cada asa e não foi observada diferença estatística em todas as análises realizadas ($P > 0,9$).

Foi feita uma análise de componentes principais (PC), tendo sido gerados 16 PC's dos quais escolhemos os dois (PC1 e PC2) com maior percentual de explicação

da variação da asa para apresentação dos resultados (38,89%; Tabela 1 em material suplementar).

Quando analisamos o tamanho das asas pelos valores dos centroides verificamos que as populações da região S1 (PIR, AGU e RDI), provenientes de fragmentos de Floresta ombrófila densa, apresentaram asas maiores e a população do Ceará (CUR), proveniente do único fragmento de Floresta ombrófila aberta, as menores asas. Os tamanhos das asas das demais populações foram semelhantes (Figura 3).

Figura 3. Médias e intervalos de confiança (95%) para os tamanhos dos centroides das amostras populacionais de *D. sturtevantii*. Siglas das populações em Materiais e Métodos.



Nas análises de variâncias (Anovas) utilizando os componentes principais para tamanho (Centroides) e forma (Distâncias de Procrustes) os fatores “população”, faixa

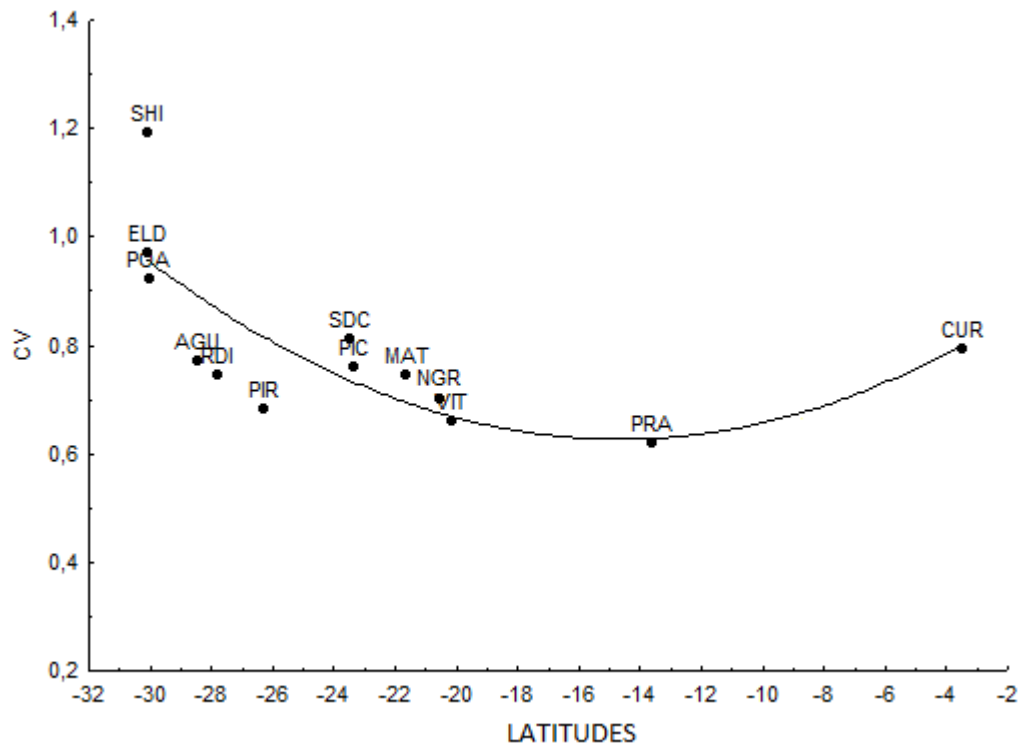
latitudinal” e “fitofisionomia” apresentaram efeito significativo, no entanto, entre os dois fatores ambientais, “fitofisionomia” explica melhor a forma das asas e “faixa latitudinal”, o tamanho (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de F e p da ANOVA para tamanho e forma das asas, considerando os efeitos “Fitofisionomia”, “Faixa Latitudinal” e “População”.

Tamanho (Centroide)					
Efeito	SS	MS	df	F	P
Fitofisionomia	3923280,80	1307760,27	3	5,04	0,0360
Faixa Latitudinal	6676829,50	1669207,38	4	6,43	0,0170
População	633259,47	259587,30	7	241,44	<0,0001
Forma (Procrustes)					
Efeito	SS	MS	df	F	P
Fitofisionomia	0,061	0,001	48	5,05	<0,0001
Faixa Latitudinal	0,028	0,0002	64	1,72	0,0059
População	0,028	0,00005	112	5,11	<0,0001

Nas análises de correlação entre os coeficientes de variação dos logaritmos dos centroides e a latitude verificou-se que existe um ajuste polinomial relativamente bom se excluirmos as duas populações provenientes de Costa Rica (TIR e LSA) (Figura 4).

Figura 4. Diagrama de dispersão das populações de *D. sturtevantii* entre latitudes e coeficiente de variação dos logaritmos dos centroides. Siglas das populações em Materiais e Métodos.

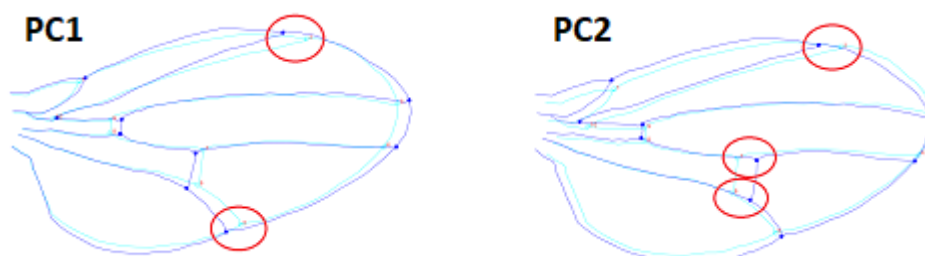


Através de modelos lineares generalizados foram testados os efeitos das variáveis ambientais sobre o tamanho das asas. Considerando o logaritmo do centroide como variável dependente, as variáveis categóricas fitofisionomia e faixa latitudinal apresentaram efeito significativo ($P = 0.000$ para ambas), assim como as variáveis contínuas umidade relativa média anual ($P = 0.000$) e temperatura média anual ($P = 0.000$), porém a variável contínua área do fragmento de mata não apresentou efeito significativo ($P = 0.148$). Os testes dois a dois para os grupos obtidos de acordo com a variável fitofisionomia indicaram diferença significativa entre todos os grupos ($P < 0.001$ para todas as comparações). Para os agrupamentos por faixa latitudinal, apenas os grupos SE e S2 não apresentaram diferença significativa ($P = 0.112$ para SE *versus* S2 e $P < 0.001$ para as demais comparações).

Na análise comparativa entre as populações quanto à forma das asas, observou-se que a diferenciação entre os contornos médios de cada população é muito pequena, mas a variação intrapopulacional diferencia umas populações das outras, destacando-se a população SDC cuja variação é bem maior que a das demais (Figura 1 em material suplementar).

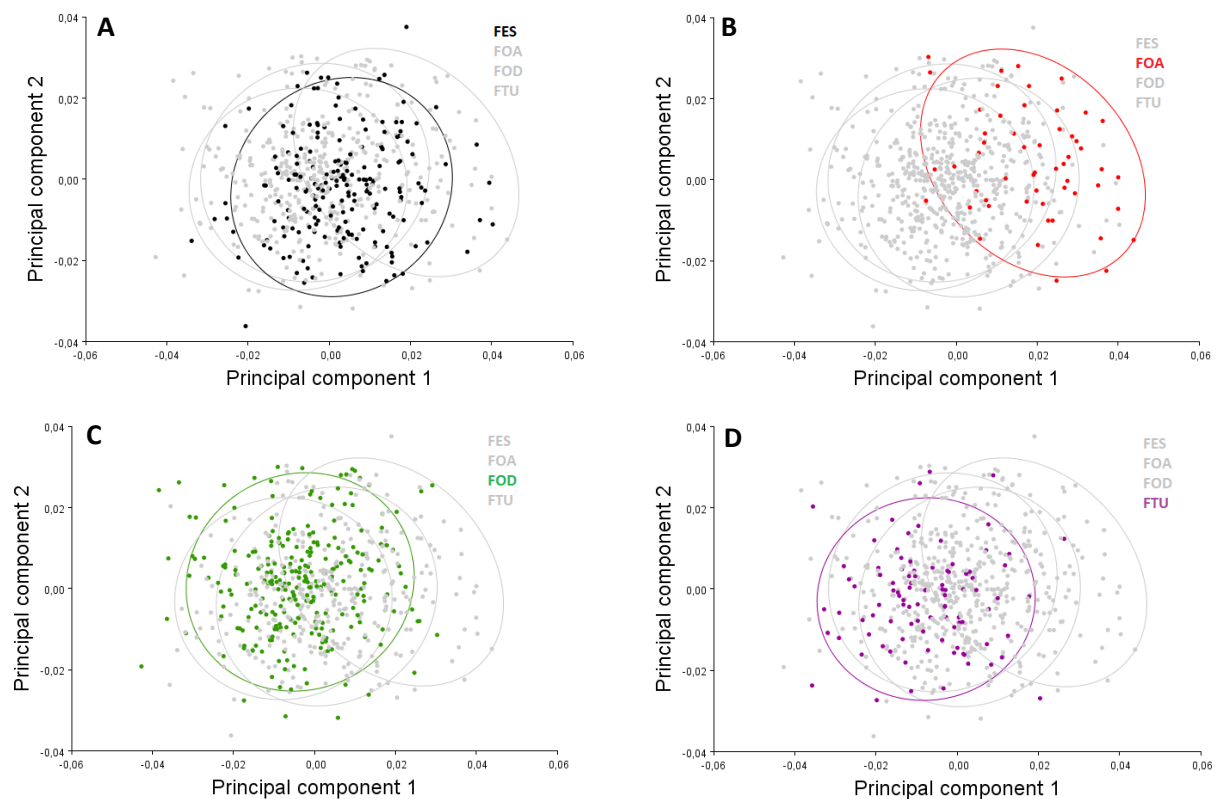
Os marcadores que compõem os dois componentes principais com maior participação na variação dos contornos das asas (PC1 e PC2) são 2 e 5 (PC1) e 2, 6 e 7 (PC2). Os marcadores 2 e 5 são responsáveis pela variação da forma da asa, enquanto que os marcadores 6 e 7 mostram divergência na parte interna da asa (Figura 5).

Figura 5. Marcadores mais variáveis nos dois componentes principais estudados.



A forma da asa mostrou-se mais correlacionada com a fitofisionomia do que o tamanho, com a população CUR, provinda de Floresta ombrófila aberta (faixa latitudinal NE) apresentando asas mais alongadas quando se analisa o componente PC1 (Figura 6A-D a seguir e Figura 2A-B em material suplementar).

Figura 6A-D. Diagrama de dispersão comparando as variações na forma das asas indicadas pelos componentes principais PC1(20,63%) e PC2(18,25%), dando destaque para as populações procedentes de diferentes fitofisionomias. A. Floresta estacional semidecidual; B. Floresta ombrófila aberta; C. Floresta ombrófila densa; D. Floresta tropical úmida.



As porcentagens de reclassificação errônea, obtidas por Análise de Função Discriminante, apontam para a formação de um grupo com as populações da faixa latitudinal S1, provenientes de Floresta ombrófila densa, outro grupo com as duas populações da faixa latitudinal AC, provenientes de Floresta tropical úmida. A população CUR, coletada em Curió (faixa latitudinal NE, Floresta ombrófila aberta), distingue-se de todas as outras, não apresentando porcentagens significativas de reclassificação errônea com nenhuma outra população (Tabela 2, em material suplementar).

As Distâncias de Mahalanobis e as distâncias de Procrustes (Tabelas 4 e 5, em material suplementar) apontam diferenças na forma das asas entre quase todas as populações com exceção das populações da faixa latitudinal AC (LSA = TIR, Floresta tropical úmida), de S1 (AGU = PIR = RDI, Floresta ombrófila densa) e de S2 (SHI = POA, Floresta estacional semidecidual). A população ELD, com local de coleta próximo a Porto Alegre (12 quilômetros), não se agrupou com nenhuma das duas populações analisadas desta região (SHI e POA). Também podemos notar que as populações de Serra da Cantareira (SDC, faixa SE, Floresta ombrófila densa), Porto Alegre (POA, faixa S2, Floresta estacional semidecidual) e Vitória (VIT, faixa SE, Floresta ombrófila densa), apesar de distantes geograficamente, apresentaram igualdade entre si e no caso de Serra da Cantareira, com duas populações de S1 (SDC = POA, SDC = VIT, SDC = PIR, SDC = RDI e VIT = POA), ainda que os valores de *P* não sejam tão grandes em alguns casos.

Como em todas as análises feitas notamos que o fator localização geográfica aparentemente influencia na forma da asa, fizemos testes de correlação entre porcentagens de reclassificação errônea entre as populações recém-coletadas e as diferenças entre as latitudes dos locais de coleta (distância geográfica) obtendo correlação negativa ($r = -0,3318$, $P = 0,0005$), indicando que as populações mais distantes geograficamente apresentam padrões distintos de asa.

As análises de modelos lineares generalizados testando os efeitos das variáveis ambientais sobre a forma das asas, considerando os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), mostraram que as variáveis categóricas fitofisionomia e faixa latitudinal apresentaram efeito significativo ($P = 0.000$ para ambas), assim como as variáveis contínuas umidade relativa média anual, temperatura média anual e área do fragmento de mata ($P < 0.000$ para todas).

Discussão

- **Morfometria das asas**

A maioria das populações de *D. sturtevantii* não apresentou diferenças significativas em relação ao tamanho das asas pela análise do centroide, entretanto, as populações da faixa latitudinal S1 (PIR, AGU e RDI) apresentaram as maiores asas e a população do Ceará (CUR) as menores asas, destacando-se das demais populações. Verificou-se que as diferenças observadas no tamanho das asas ocorreram em populações de extremos geográficos, e também com extremos de temperatura. Este achado corrobora dados da literatura, em especial a regra temperatura/tamanho, segundo a qual em temperaturas mais altas observam-se corpos menores, e consequentemente, asas menores (DAVID, et al., 1994; ANGILLETTA; DUNHAM, 2003; ANGILLETTA et al., 2004).

Em trabalhos anteriores com outras espécies de *Drosophila* foi verificado que o tamanho da asa é altamente sensível a mudanças climáticas (SHEARER et al., 2016) e em nossas análises, está evidente que fatores como temperatura média anual e área do fragmento coletado fazem parte de uma gama de covariáveis explicativas na diferenciação populacional por tamanho de asa. O fator “área do fragmento coletado” foi significativo na explicação da variabilidade da forma das asas, mas não do tamanho destas, o que pode estar relacionado à diversificação da composição faunística dos fragmentos e a outros fatores que influenciam componentes seletivos que atuam direta ou indiretamente nesta característica.

Na análise dos fatores “faixa latitudinal” e “fitofisionomia”, o tamanho da asa correlaciona-se mais com “faixa latitudinal”, evidenciando que populações mais distantes geograficamente apresentam padrões mais distintos de asas.

Na análise da forma das asas, a variável fitofisionomia mostrou-se mais adequada na explicação da diferenciação populacional, apresentando a população de Floresta ombrófila aberta (CUR) com asas mais similares à uma elipse.

As variáveis ambientais (temperatura média anual, umidade relativa e área do fragmento) correlacionam-se com a forma das asas, corroborando a hipótese de plasticidade desta característica, ou seja, a forma da asa é muito influenciada por fatores ambientais (CAVICHÍ et al., 1985; DEBAT et al., 2003; MATTA; BITNER-MATHÉ, 2004).

A população CUR (Nordeste brasileiro, Floresta ombrófila aberta) apresentou asas com formato distinto das demais, não apresentando porcentagem de reclassificação errônea alta nas análises discriminantes com nenhuma outra população. Esta diferenciação também fora obtida em outros estudos de nosso laboratório envolvendo genes mitocondriais (ZORZATO, 2019).

A coleta realizada em Eldorado do Sul (ELD) foi realizada pelo fato de que nesta região foi coletada outra espécie do subgrupo *sturtevanti*, *D. magalhaesi* (PAVAN, 1950; MAGALHÃES, 1962), que esperaríamos também coletar, o que não ocorreu. Mas esta população (ELD) diferiu significativamente quanto à forma das asas das outras duas populações coletadas em áreas próximas (POA e SHI), indicando diferenciação entre elas que será investigado em maiores detalhes.

Na análise de função discriminante, as populações SDC e POA apresentaram porcentagens de reclassificação errônea significativas em relação a diferentes populações, procedentes de fitofisionomias distintas das suas e com localizações

geográficas distantes. A alta variabilidade observada para estas populações pode estar relacionada com o bom estado de conservação dos locais de onde procedem as populações, onde pressões seletivas ou ambientais menores possam estar atuando, favorecendo a ampla plasticidade fenotípica para esta característica.

A relação entre tamanho e forma das asas tem sido estudada por muitos pesquisadores (WEBER, 1990; BITNER-MATHÉ; KLACZKO, 1999; HOFFMANN; SHIRRIFS, 2002; CARREIRA et al., 2006; SOTO et al., 2008) com conclusões da presença de alometria entre estas duas características. Os resultados do presente trabalho mostraram que o tamanho da asa esteve mais relacionado à latitude, enquanto que a forma, à fitofisionomia e aos fatores ambientais.

A análise dos marcadores para a forma das asas que apresentaram maior variação em relação ao contorno médio nos mostra grande variação nos marcadores 2, 5, 6 e 7 para os dois componentes principais. Trabalhos anteriores apontam que variações no marcador 5 são correlacionadas à variação de temperatura (CAVICHI et al., 1985), enquanto o marcador 2 está mais relacionado ao estresse (DEBAT et al., 2003; MATTA; BITNER-MATHÉ, 2004). A variação destes dois marcadores é decisiva para a configuração mais arredondada ou mais alongada das asas.

As duas características estudadas nas populações recém-coletadas no Brasil indicaram haver uma relação entre a forma e o tamanho das asas e a localização geográfica, com asas menores e mais alongadas (em forma de elipse) em localidades mais próximas do Equador e asas maiores e mais arredondadas em localidades mais distantes do Equador. O resultado de que asas menores são mais alongadas contraria os resultados obtidos na literatura com outras espécies (AZEVEDO et al., 1998; LOESCHEKE et al., 2000; MATTA; BITNER-MATHÉ, 2004; LOH et al., 2008) e indicam uma característica até agora observada unicamente em *D. sturtevanti*.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Daniela De Toni e ao Prof. Dr. Hermes J. Schmitz pelo fornecimento de algumas linhagens de *D. sturtevantii*. À FAPESP pelo apoio ao projeto de pesquisa (processo número 2014/14059-0); à CAPES pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Biociências da UNESP/Ibilce e pela bolsa de doutorado.

Referências

- Almeida, LM, Carareto CMA. 2002. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). Iheringia, Sér. Zool.92(2): 71-79.
- Angilletta MJ, Dunham AE. 2003. The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. Am. Nat. 162: 332-342.
- Angilletta MJ, Steury TS, Sears MW. 2004. Temperature, growth rate and body size in ectotherms: fitting pieces of a life history puzzle. Integr. Comp. Biology 44: 498-509.
- Arnqvist G, Martensson T. 1998. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. Acta Zoologica Academia Scientiarum Hungaricae 44: 73-96.
- Azevedo RBR, James AC, McCabe J, Partridge L. 1998. Latitudinal variation of wing: thorax size ratio and wing-aspect ratio in *Drosophila melanogaster*. Evolution 52: 1353-1362.
- Bastir M, O'higgins P, Rosas A. 2007. Facial ontogeny in neanderthals and modern humans. Proc R Soc Lond Biol Sci. 274: 1125–1132.
- Bastir M, et al. 2015. The relevance of the first ribs of the el sidrón site (Asturias, Spain) for the understanding of the neandertal thorax. J. Hum. Evol. 80: 64–73.

- Bernardo AA, Bicudo HEMC. 2009. Variability of esterase patterns in adult flies of the *saltans* species group of *Drosophila* (subgenus *Sophophora*). *Genetica*. 137: 111-124.
- Bicudo HEMC. 1979. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV The *sturtevantii* subgroup. *Braz J Genet*. 2: 247-258.
- Bitner-Mathé BC, Klaczko L. 1999. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105(2): 203-210.
- Bulygina E., Mitteroecker P, Aiello I. 2006. Ontogeny of facial dimorphism and patterns of individual development within one human population. *Am J Phys Anthropol*. 131: 432–443.
- Carareto CM, Lourenço MF, Mourão CA. 1999. Sensitivity of fitness to variation in its components in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia, Série Zoologia* 87:37-48.
- Carreira V, Soto IM, Fanara JJ, Hasson E. 2006. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 1275–1282.
- Castro JP, Carareto CMA. 2004. *P* elements in the *saltans* group of *Drosophila*: a new evaluation of their distribution and number of genomic insertion sites. *J. Mol. Evol.* 32: 383-387.
- Cavicchi S, Guerra D, Giorgi G, Pezzoli C. 1985. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. *Genetics* 109: 665-689.
- Cavicchi S, Giorgi G, Vanna N, Guerra D. 1991. 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* 4(1): 141-159.
- Chakir M, Moreteau B, Capy P, David JR. 2007. Phenotypic variability of wild living and laboratory grown *Drosophila*: Consequences of nutritional and thermal heterogeneity in growth conditions. *Journal of Thermal Biology* 32 1–11.
- Chaves NB, Tidon R. 2008. Biogeographical aspects of drosophilids (*Diptera*, *Drosophilidae*) of the Brazilian savanna. *Rev. Bras. Entomol. São Paulo* 52(3): 340-348.
- Clark JB, Altheide TK, Schlosser MJ, Kidwell MG. 1995. Molecular evolution of *P* transposable elements in genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 902-913.
- Clark JB, Kidwell MG. 1997. Phylogenetic perspective on P transposable elements evolution in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11428-11433.
- Costa M, Mateus RP, Moura M. 2015. Constant fluctuating asymmetry but not directional asymmetry along the geographic distribution of *Drosophila antonietae* (*Diptera*, *Drosophilidae*). *Revista Brasileira de Entomologia* 59(4): 337-342.
- David JR, Tsacas L. 1981. Cosmopolitan, subcosmopolitan and widespread species: different strategies within the *Drosophilid* family (*Diptera*). *C. R. Soc. Biogr.* 57: 11-26.
- David JR, Moreteau B, Gauthier JP, Pétavy G, Stockel A, Imasheva AG. 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. *Genetics, Selection, Evolution* 26: 229–251.

- David JR, Legout H, Moreteau B. 2006. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *J. Genet.* 85, 9–23.
- Debat V, Bégin M, Legout H, David JR. 2003. Allometric and non allometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution* 57: 2773–2784.
- Debat V, Debelle A, Dworkin I. 2009. Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. *Evolution* 63:2864–2876.
- Dobzhansky T, Pavan C. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Boletins da Fac. Filos., Ciênc. Letras da Universidade de São Paulo, Biologia Geral* 4: 7-72.
- Drake AG, Klingenberg CP. 2008. The pace of morphological change: historical transformation of skull in St. Bernard dogs. *Proc. R. Soc. Lond.* 275: 71-76.
- Drake AG, Klingenberg CP. 2010. Large-scale diversification of skull shape in domestic dog: disparity and modularity. *Am. Nat.* 175: 289-301.
- Flatt T. 2005. The evolutionary genetics of canalization. *Quart. Rev. Biol.* 80:287–316.
- Franco FF, Prado PRR, Sene FM, Costa LF, Manfrin MH. 2006. Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related cactophilic species of *Drosophila* (*Diptera; Drosophilidae*) in South America. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78(2): 203-212.
- Gilchrist AS, Azevedo RBR, Partridge L, O'higgins P. 2000. Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. *Evolution & Development* 2(2): 114-124.
- Gilchrist GW, Huey RB, Balanya J, Pascual M, Serra L. 2004. A time series of evolution in action: a latitudinal cline in wing size in South American *Drosophila suboscuro*. *Evolution* 58: 768-780.

- Gomes JM, Perfectti F, Camacho JPM. 2006. Natural selection on *erysimum mediohispanicum* flower shape: insights into the evolution of zygomorphy. *Am. Nat.* 168: 531-545.
- Goodall CR. 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society B* 53: 285–339.
- Hoffmann AA, Shirriffs J. 2002. Geographic Variation For Wing Shape In *Drosophila Serrata*. *Evolution*, 56(5): 1068–1073.
- Hosaki-Kobayashi M, Bicudo HEMC. 1994. Productivity in mass crosses of *Drosophila sturtevantii*: a comparative study of laboratory stocks and recently collected flies. *Ver. Brasil. Genet.* 17(4): 393-399.
- Hosaki-Kobayashi M, Bicudo HEMC. 1997. Inversion polymorphism in laboratory strains and natural samples of *Drosophila sturtevantii* (*saltans* group, *sturtevantii* subgroup). *Cytobios* 89: 7-20.
- Imasheva AO, Bubli OA, Lazebny, OE. 1994. Variation in wing length in Eurasian natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 72: 508-514.
- Klingenberg CP. 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics* 11: 623-635.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- Loeschcke V, Bundgaard J, Barker JSF. 2000. Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia. *Heredity* 85: 423-433.
- Loh R, David JR, Debat V, Bitner-Mathé BC. 2008. Adaptation to different climates results in divergent phenotypic plasticity of wing size and shape in an invasive drosophilid. *J. Genetics* 87(3): 209-217.

- Machado LPB, Alves NS, Prestes JO, Salomon GR, Biegai D, Wouk T, Mateus RP. 2017. Esterase profile in *Drosophila mercatorum pararepleta* (Diptera; Drosophilidae), a non-cactophilic species of the *repleta* group: development patterns and aspects of genetic variability. *Zoological Studies* 56:21.
- Magalhães LE, Bjomberg AJS. 1957. Estudo da terminália masculina de *Drosophila*, (Drosophilidae, Diptera). *Braz. J. Biol.* 16: 273-280.
- Magalhães LE. 1962. Notes on the taxonomy, morphology and distribution of *saltans* group of *Drosophila*, with description of four new species. *UT Publications*, 6205: 135-154.
- Mardia KV, Kent JT, Bibby JM. 1979. *Multivariate Analysis*. New York: Academic Press.
- Mateus RP, Buschini MLT, Sene FM. 2006. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana–Paraguay River Basin. *Braz J Biol*, 66: 719–729.
- Matta BP, Bitner-Mathé BC. 2004 Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila simulans* and an analysis of temperature effects on genetic parameter estimates. *Heredity* 93: 330–341.
- Monteiro LR, Reis SF. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Ribeirão Preto: Holos.
- Moraes EM, Sene FM. 2004. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. *Genetica* 121: 119-123.
- Morin JP, Moreteau B, Petavy G, David JR. 1999. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster*. *Evol. Biol.* 12: 329-339.

- Nascimento AP, Bicudo HEMC. 2002. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). *Genetica* 114: 41-51.
- Nascimento AP, Bicudo HEMC. 2006. Further study on the esterase patterns of sibling species in the *Drosophila saltans* subgroup (*saltans* group): intraspecific and interespecific variations in the development. *Genetica* 126: 265-276.
- O' Grady PM, Clark JB, Kidwell MG. 1998. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol* 15: 656-664.
- Pavan C. 1950. Espécies brasileiras de *Drosophila*. II. *Biol. Geral (Univ. São Paulo)*. 8: 1-37.
- Penariol L. 2012. Traços quantitativos e abundância de drosofilídeos como indicadores de impacto ambiental em fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
- Pitchers W, Pool JE, Dworkin I. 2013. Altitudinal Clinal Variation in Wing Size & Shape in African *Drosophila melanogaster*: One Cline or Many? *Evolution*, 67(2): 438-452.
- Powell JR. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model. New York: Oxford University Press.
- Ray RP, Nakata T, Henningsson P, Bompfrey RJ. 2016. Enhanced flight performance by genetic manipulation of wing shape in *Drosophila*. *Nature Communications* 7(10851): 1-8.
- Richmond MP, Johnson S, Markow TA. 2012. Evolution of reproductive morphology among recently diverged taxa in the *Drosophila mojavensis* species cluster. *Ecology and Evolution* 2(2): 397-408.

- Rodriguez-Trelles F, Tarrio R, Ayala FJ. 1999. Molecular evolution and phylogeny of the *Drosophila saltans* species group inferred from the *Xdh* gene. *Mol Phylogenet Evol* 13: 110-121.
- Rohlf FJ. 2005. TpsDig version 2.05. Digitize landmarks and outlines. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP. 2007. Taxonomic survey of *Drosophilidae* (*Diptera*) from mangrove forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. *Neotrop. Entomol.* 36(1): 53-64.
- Setta N, Loreto ELS, Carareto CMA. 2007a. Is the evolutionary history of the O-type *P* element in the *saltans* and *willistoni* groups of *Drosophila* similar to that of the canonical *P* element? *J. Mol. Evol.* 65: 715-724.
- Setta N, Costa APP, Lopes FR, Carareto CMA. 2007b. Transposon display supports transpositional activity of *P* elements in species of the *saltans* group of *Drosophila*. *Journal of Genetics* 86(1): 37-43.
- Shearer PW, West JD, Walton VM, Brown PH, Svetec N, Chiu JC. 2016. Seasonal cues induce phenotypic plasticity of *Drosophila suzukii* to enhance winter survival. *BMC Ecol.* 16(11): 1-18.
- Silva JC, Kidwell MG. 2004. Evolution of *P* elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. *Genetics* 168(3): 1323-1335.
- Soto IM, Hasson E, Manfrin MH. 2008. Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (*Diptera*, *Drosophilidae*). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 95: 655-665.
- Soto IM, Carreira VP, Soto EM, Márquez F, Lipko P, Hasson E. 2013. Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology* 40(3): 395-407.

- Sousa TAJ, Noll FB, Bicudo HMC, Madi-Ravazzi L. 2014. Scanning electron microscopy of male terminalia and its application to species recognition and phylogenetic reconstruction in the *Drosophila saltans* group. PlosOne 9: 1-12.
- Statsoft Inc. 2004. Statistica (data analysis software system). version 7. www.statsoft.com.
- Strelin MM, Benitez-Vieyra S, Fornoni J, Klingenberg CP, Cocucci AA. 2016. Exploring the ontogenetic scaling hypothesis during the diversification of pollination syndromes in *Caiophora* (Loasaceae, subfam. Loasoideae). Annals of Botany 117: 937–947.
- Trava BM. 2014. Morfometria da Asa e do Edeago de Duas Espécies de *Drosophila* Endêmicas da América do Sul. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, UNICENTRO, Guarapuava-PR.
- Trava BM. 2018. Estrutura populacional de *Drosophila sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; grupo *saltans*) por meio de microssatélites espécie-específicos e biodiversidade de drosofilídeos em domínios da Mata Atlântica. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biociências, UNESP, São José do Rio Preto-SP.
- Torres FR, Madi-Ravazzi L. 2006. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp (*Diptera*) in two woodland in the state of São Paulo, Brazil. Iheringia, Sér. Zool. 96(4): 437-444.
- Weber KE. 1990. Selection on wing allometry in *Drosophila melanogaster*. Genetics 126: 975-989.
- Yassin A, David JR, Bitner-Mathé BC. 2009. Phenotypic variability of natural populations of an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus*, on different continents: Comparison of wild-living and laboratory-grown flies. C. R. Biologies 332: 898–908.

Zorzato SV. 2019. Filogeografia de *Drosophila sturtevantii* (Diptera: Drosophilidae) em domínios da Mata Atlântica. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biociências, UNESP, São José do Rio Preto-SP.

Material suplementar

Tabela 1. Coeficientes dos dois componentes principais estudados. Entre parênteses estão as porcentagens de explicação da variação das asas de cada variável. Em negrito estão os maiores valores dos coeficientes dos componentes.

	PC1 (20,63%)	PC2 (18,26%)
x1	0,140	-0,063
y1	0,072	0,217
x2	-0,583	-0,556
y2	0,156	0,048
x3	0,294	-0,065
y3	0,074	-0,099
x4	0,307	-0,094
y4	-0,006	-0,155
x5	-0,360	0,163
y5	-0,168	-0,081
x6	-0,261	0,459
y6	-0,082	-0,175
x7	-0,176	0,486
y7	-0,069	-0,050
x8	0,255	-0,080
y8	-0,010	0,087
x9	0,286	-0,054
y9	0,011	0,079
x10	0,098	-0,194
y10	0,022	0,129

Tabela 2. Porcentagens de reclassificação errônea obtidas por Análise de Função Discriminante com as populações recém-coletadas tomadas duas a duas. As cores indicam as fitofisionomias.

%	AGU	PIR	RDI	MAT	NGR	SDC	PIC	POA	SHI	ELD	VIT	PRA	CUR	LSA
PIR	28,57													
RDI	23,19	28,99												
MAT	3,16	7,37	7,45											
NGR	3,53	3,53	9,52	20,91										
SDC	8,33	16,67	15,25	15,29	6,67									
PIC	2,74	4,11	11,11	11,22	12,50	12,70								
POA	10,61	7,58	10,77	7,69	4,94	21,43	10,14							
SHI	7,75	5,97	6,06	5,43	4,88	21,05	4,29	17,46						
ELD	3,22	1,61	1,64	4,60	3,90	11,54	6,15	12,07	13,56					
VIT	5,13	8,97	15,58	4,85	5,38	13,24	11,11	14,86	24,00	10,00				
PRA	5,00	3,75	8,86	10,48	12,63	5,71	27,71	9,21	6,49	4,17	7,95			
CUR	3,37	0,00	4,54	6,14	7,69	6,33	5,43	9,41	13,95	7,41	4,12	7,07		
LSA	3,45	1,15	3,49	4,46	2,94	6,49	3,33	13,25	7,14	21,52	12,63	4,12	10,38	
TIR	1,28	0,00	0,00	1,94	2,15	0,00	1,23	6,76	13,33	12,86	10,47	0,00	5,15	26,32

Tabela 3. Distâncias de Mahalanobis entre as populações recém-coletadas. * $P>0,05$; ** $P>0,01$. As cores indicam as fitofisionomias.

	AGU, S1	POA, S2	CUR, NE	ELD, S2	LSA, AC	MAT, SE	NGR, SE	PIC, SE	PIR, S1	PRA, NE	RDI, S1	SDC, SE	SHI, S2	TIR, AC
POA, S2	2,2383													
CUR, NE	3,6755	2,2589												
ELD, S2	3,5918	1,9323	2,675											
LSA, AC	3,4006	2,1522	2,5091	1,5297										
MAT, SE	3,4355	2,8328	3,317	3,631	3,558									
NGR, SE	3,1505	2,5255	2,8612	3,5438	3,3386	1,3444								
PIC, SE	2,7555	2,0809	2,9386	3,3311	3,0541	2,3044	1,6293							
PIR, S1	1,0445*	1,9641	3,5242	3,0585	3,148	3,1784	2,9786	2,5229						
PRA, NE	2,764	2,5564	3,0234	3,9531	3,477	2,6825	2,1274	1,4226	2,8396					
RDI, S1	1,3589**	1,933	3,138	3,1889	3,1332	3,0019	2,5969	2,0595	0,9945*	2,4289				
SDC, SE	2,1459	1,2681*	2,7551	2,406	2,544	2,0748	2,1545	2,0633	1,7374	2,6326	1,7466			
SHI, S2	2,5541	1,3231*	1,9255	2,2558	2,382	3,1373	2,613	2,3901	2,3675	2,7447	2,1707	1,8968		
TIR, AC	3,3562	2,3701	2,9614	1,9912	1,1234**	3,9128	3,5868	3,1812	3,1835	3,507	3,2024	2,8922	2,4955	
VIT, SE	2,7892	1,6622	2,3556	2,39	2,1983	3,2123	2,6263	1,9625	2,4326	2,5587	1,9628	2,0049	1,6476	2,3027

Tabela 4. Distâncias de Procrustes entre as populações recém-coletadas. * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$. As cores indicam as fitofisionomias.

	AGU, S1	POA, S2	CUR, NE	ELD, S2	LSA, AC	MAT, SE	NGR, SE	PIC, SE	PIR, S1	PRA, NE	RDI, S1	SDC, SE	SHI, S2	TIR, AC
POA, S2	0,0155													
CUR, NE	0,0303	0,0193												
ELD, S2	0,0241	0,0140	0,0251											
LSA, AC	0,0186	0,0145	0,0270	0,0117										
MAT, SE	0,0238	0,0226	0,0273	0,0264	0,0236									
NGR, SE	0,0232	0,0212	0,0234	0,0274	0,0246	0,0099								
PIC, SE	0,0133	0,0154	0,0260	0,0248	0,0196	0,0170	0,0143							
PIR, S1	0,007*	0,0145	0,0304	0,0198	0,0163	0,0226	0,0230	0,0143						
PRA, NE	0,0174	0,0209	0,0256	0,0317	0,0262	0,0225	0,0200	0,0127	0,0212					
RDI, S1	0,007*	0,0141	0,0276	0,0216	0,0178	0,0211	0,0201	0,0114	0,006*	0,0179				
SDC, SE	0,0142	0,010*	0,0238	0,0156	0,0143	0,0157	0,0173	0,0136	0,011**	0,0213	0,011**			
SHI, S2	0,0197	0,009*	0,0153	0,0191	0,0203	0,0244	0,0219	0,0180	0,0199	0,0199	0,0183	0,0150		
TIR, AC	0,0165	0,0172	0,0316	0,0163	0,008*	0,0268	0,0274	0,0198	0,0145	0,0262	0,0166	0,0168	0,0227	
VIT, SE	0,0134	0,009**	0,0224	0,0184	0,0152	0,0222	0,0198	0,0110	0,0125	0,0176	0,0105	0,011**	0,0122	0,0154

Figura 1. Forma das asas de cada uma das populações em relação à variável PC1. No centro está o contorno médio, à sua direita o contorno médio acrescido de um desvio padrão de variação e à sua esquerda, diminuído de um desvio padrão.

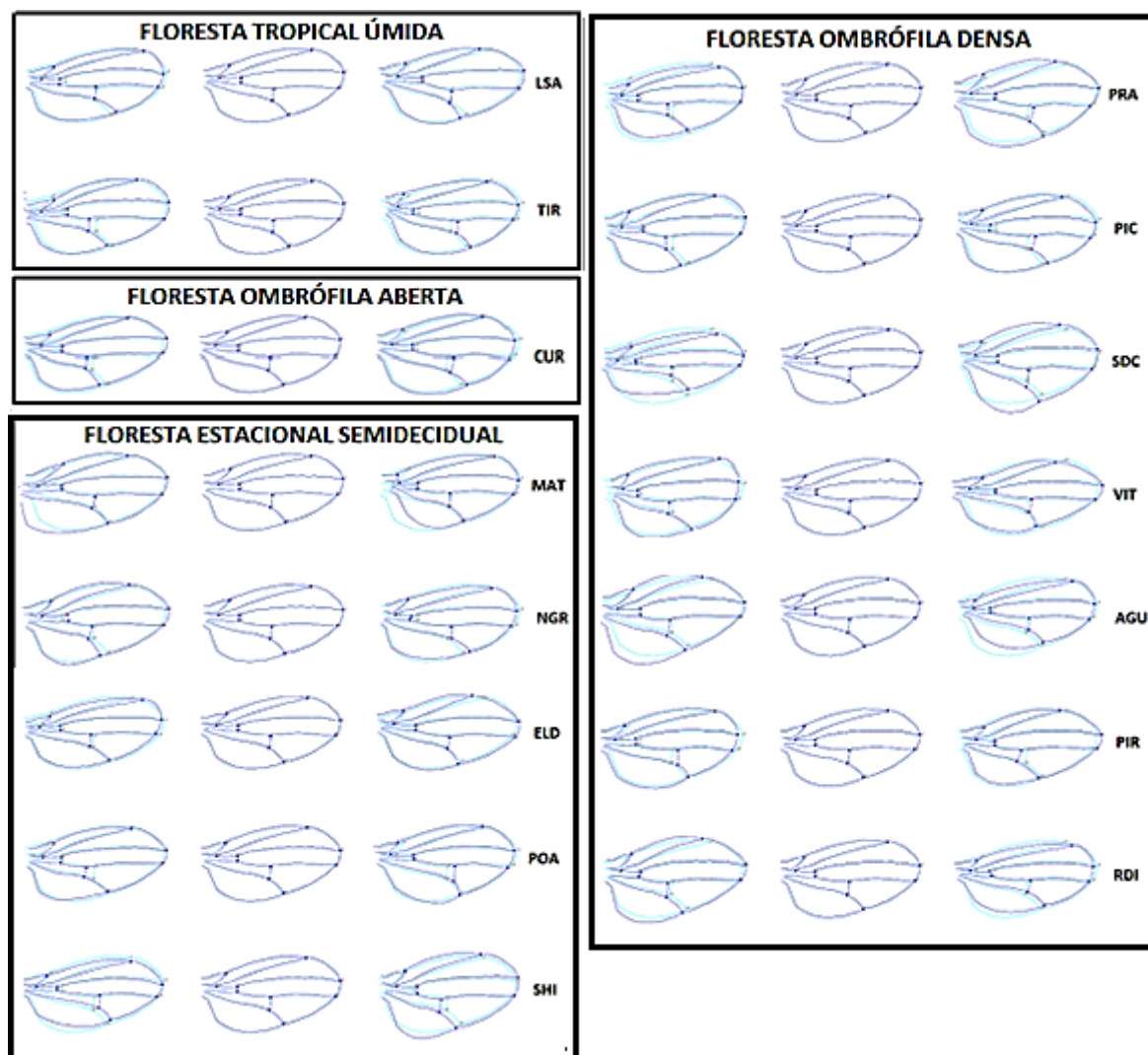
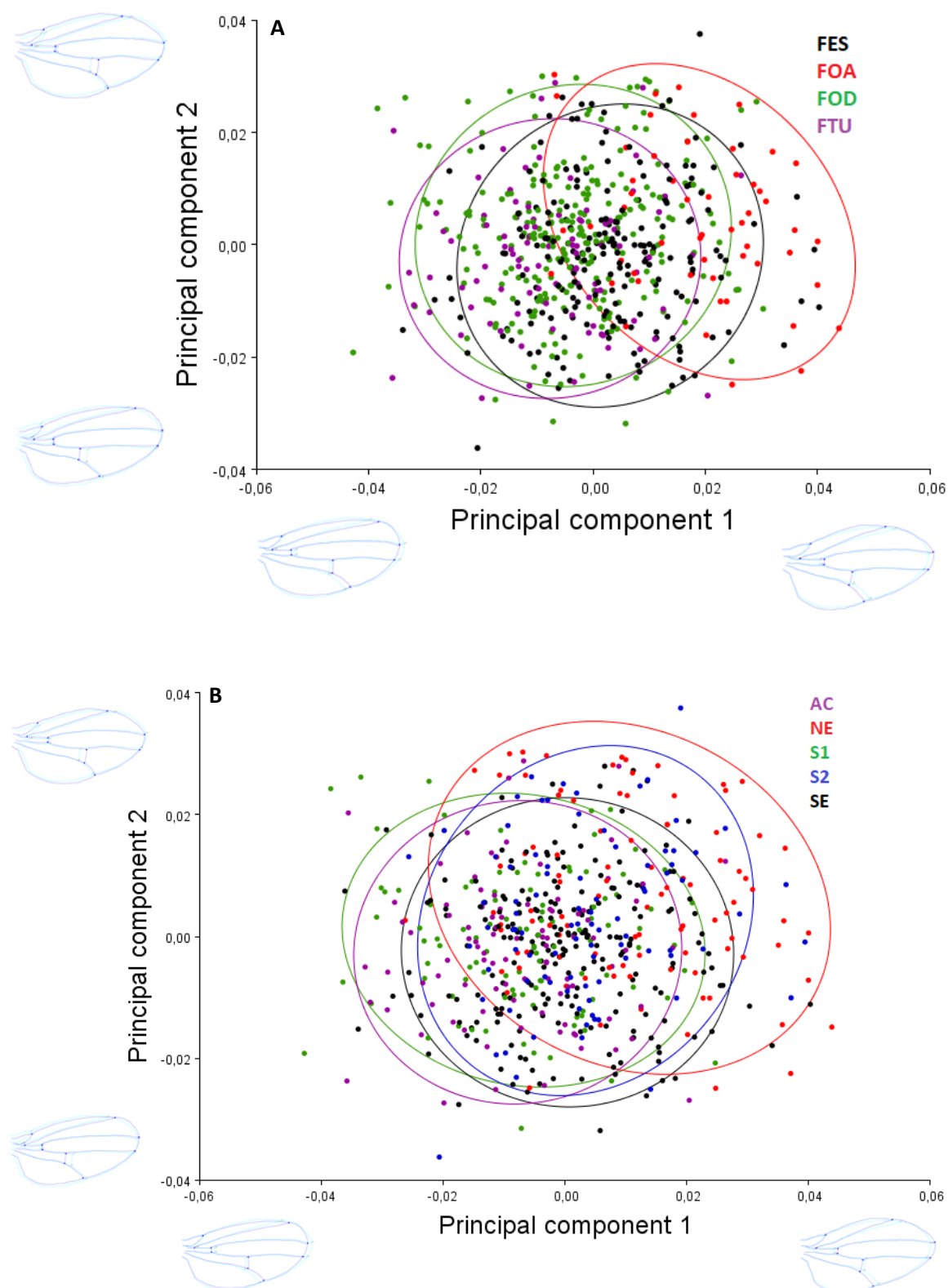


Figura 2A-B. Diagrama de dispersão comparando as variações na forma das asas indicadas pelos componentes principais PC1(20,63%) e PC2(18,25%). A. Segundo a variável “Fitofisionomia”; B. Segundo a variável “Faixa Latitudinal”.



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 *sturtevanti* 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 sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*; 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 sturtevantii* (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.