



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



Ana Carolina Pires das Dôres

**Respostas transcriptômicas a dietas alternativas de cactos em *Drosophila*
mojavensis (*Drosophila*)**

São José do Rio Preto (SP)
2024

Ana Carolina Pires das Dôres

**Respostas transcriptômicas a dietas alternativas de cactos em *Drosophila*
mojavensis (*Drosophila*)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao 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 (SP).

Financiadora: CAPES: 88887.715220/2022-00
FAPESP: 2020/06238-2
CNPq: 308020/2021-9

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto

São José do Rio Preto (SP)
2024

D695r Dôres, Ana Carolina Pires
Respostas transcriptômicas a dietas alternativas de cactos em
Drosophila mojavensis (Drosophila) / Ana Carolina Pires das
Dôres. -- São José do Rio Preto, 2024
70 f. 8 il., 2 tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São
José do Rio Preto
Orientador: Claudia Marcia Aparecida Carareto

1.Metabolismo 2.Cactos 3.Plantas hospedeiras 4. Drosophila
I. Título

Ana Carolina Pires das Dôres

**Respostas transcriptômicas a dietas alternativas de cactos em *Drosophila*
mojavensis (*Drosophila*)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao 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 (SP).

Financiadora: CAPES, CnPq, FAPESP

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Maura Helena Manfrin
Universidade de São Paulo - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus
Universidade Estadual do Centro-Oeste

São José do Rio Preto
11 de Outubro de 2024

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha maior incentivadora. Agradeço por sempre me apoiarem a nunca perder uma oportunidade de aprender algo novo e com isso, me tornar cada vez mais independente. A mim, por ter aproveitado a oportunidade de me qualificar enquanto pesquisadora e me dedicado para fazê-lo da melhor forma possível.

Aos tantos profissionais que contribuíram com minha formação em pesquisa e na realização do presente trabalho. Sebastião, Tamara, Joice, Sônia, Zainab, Hélène, Mariana, Gerardine, Daniel, William, Bianca, Luciano e tantos outros. Agradeço por compartilharem comigo seu conhecimento e tempo, além do exemplo de como ser uma boa profissional.

À minha orientadora Claudia Carareto a qual tenho como um exemplo de professora e cientista, de dedicação à Ciência, ao conhecimento e ao ensino. Agradeço por sempre estar disponível para ensinar ou, juntas, aprendermos algo novo. Agradeço também por me possibilitar oportunidades grandiosas como a de realizar parte deste projeto no exterior, um sonho até então muito distante da minha realidade. Conjuntamente, agradeço a professora Cristina Vieira por me receber em seu laboratório e me apresentar uma realidade diferente de se fazer pesquisas. Agradeço também pelas oportunidades e perspectivas.

À Educação Pública e de qualidade que recebi durante toda minha jornada acadêmica a qual me possibilitou chegar à UNESP-IBILCE. Às políticas públicas e de ação afirmativa que permitiram que eu seja a primeira de minha família a estudar em uma universidade pública e ter um diploma de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.715220/2022-00, do programa Capes PrInt – Código de Financiamento - 88887.916278/2023-00, da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) - Código de Financiamento - 2020/06238-2 e do CNPq – Código de Financiamento 308020/2021-9.

*"A natureza é grande nas coisas grandes,
mas é grandíssima nas pequeninas."*

Bernardin de Saint-Pierre (1788, p. 52)

RESUMO

As espécies cactófilas do grupo *repleta* (gênero *Drosophila*) são um exemplo notável de adaptação a ambientes áridos. Esses insetos toleram o estresse hídrico e os compostos químicos tóxicos produzidos por seus cactos hospedeiros que os habilitam a deter a herbivoria. Propõe-se que a especiação dentro do grupo ocorreu por meio de uma radiação adaptativa em resposta ao uso de novas espécies de cactos como sítios para alimentação e reprodução. *Drosophila mojavensis*, que ocupa o sudoeste dos Estados Unidos e México, faz parte dessa radiação. Suas quatro subespécies utilizam como hospedeiros primários diferentes tipos de cactos, dos quais o uso de espécies do gênero *Opuntia* constituem o estado de caráter ancestral e, o de cactos colunares, o estado derivado. *Drosophila mojavensis wrigleyi*, uma subespécie insular, utiliza o cacto palmado *Opuntia litorallis*. Por outro lado, as subespécies *D. m. mojavensis*, *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*, embora capazes de utilizar *Opuntia spp.*, preferem cactos colunares, dos gêneros *Stenocereus* e *Ferocactus*. Os cactos do gênero *Opuntia* têm uma composição química menos complexa em comparação aos cactos colunares, que contêm maior quantidade de metabólitos secundários capazes de inibir o desenvolvimento das moscas. A capacidade de destoxificar ou metabolizar esses compostos é uma vantagem evolutiva na exploração de novos hospedeiros. Dados de transcriptoma de RNA-seq de larvas e de fêmeas adultas (cabeças) criados em meio de cultura à base de fubá-ágar foram analisados para identificar genes diferencialmente expressos (DEG) entre *D. m. wrigleyi* e as outras subespécies em relação a 128 genes associados à localização, aceitação e uso do hospedeiro. Os dois conjuntos de dados apresentaram maior proporção DEGs associados às etapas de metabolismo e destoxificação, como também em redes de interação Proteína-Proteína (PPI). Por outro lado, apresentaram diferenças quanto ao enriquecimento funcional: os termos GO associados ao metabolismo e destoxificação foram mais enriquecidos em larvas, e os associados à localização e aceitação do hospedeiro em cabeças. Variações nos padrões de expressão entre as subespécies e interações nas redes PPI, indicaram ser os genes *Cyp18a1*, *Cyp12d1* e *Cyp12e1*, associados à destoxificação e ao metabolismo, bons candidatos a genes associados ao uso do hospedeiro. Essa hipótese foi testada por meio da quantificação da expressão gênica via RT-qPCR em larvas criadas em meios de cultura à base de *Opuntia ficus-indica* ou do cacto colunar *Cereus hildmaniannus*. A expressão gênica das subespécies, e de *D. arizonae*, em comparação à *D. m. wrigleyi*, adaptada a *Opuntia spp.*, apresentou maior número de diferenças significativas quando em meio de cultura à base de *Opuntia*, com destaque para o gene *Cyp12d1*. Por outro lado, a exposição das linhagens ao meio de cultura à base *Cereus hildmaniannus*, um cacto colunar da América do Sul, provocou aumento significativo da expressão do gene *Cyp12d1* nas três subespécies adaptadas ao uso dos colunares; do gene *Cyp12e1* em *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*; e do *Cyp18a1* em *D. m. sonorensis*. A similaridade entre as subespécies adaptadas a cactos colunares pode ser explicada por suas adaptações associadas ao metabolismo e destoxificação de compostos tóxicos específicos de seus respectivos hospedeiros. Esses resultados revelam a plasticidade na expressão gênica associada à destoxificação em espécies que passaram por uma mudança de hospedeiro. Além disso, demonstram expressão constitutiva de genes específicos na presença de seus cactos hospedeiros primários e alternativos.

Palavras-chave: Metabolismo – Cactos – Interação planta-hospedeiro – *Drosophila*

ABSTRACT

The cactophilic species of *repleta* group of the *Drosophila* genus provides a notable example of adaptation to arid environments. These insects are capable of tolerating water stress and the toxic chemical compounds produced by their host cacti, which enable them to deter herbivory. It is proposed that speciation within the group occurred through adaptive radiation in response to the use of new cactus species as feeding and breeding sites. *Drosophila mojavensis*, which inhabits the southwestern United States and Mexico, is part of this radiation. Its four subspecies utilize different types of cacti as primary hosts, with the use of species from the genus *Opuntia* representing the ancestral state, and that of columnar cacti representing the derived state. *Drosophila m. wrigleyi*, an island subspecies, uses the prickly pear cactus *Opuntia litorallis*. On the other hand, the subspecies *D. m. mojavensis*, *D. m. baja*, and *D. m. sonorensis*, while capable of utilizing *Opuntia spp.*, prefer columnar cacti from the genera *Ferocactus* and *Stenocereus*. Cacti from the genus *Opuntia* have a less complex chemical composition compared to columnar cacti, which contain higher amounts of secondary metabolites capable of inhibiting the development of the flies. The ability to detoxify or metabolize these compounds is an evolutionary advantage in exploring new hosts. RNA-seq transcriptome data from larvae and adult females (heads) reared on cornmeal-agar culture media were analyzed to identify differentially expressed genes (DEGs) between *D. m. wrigleyi* and the other subspecies concerning 128 genes associated with host localization, acceptance, and usage. The two datasets showed a higher proportion of DEGs associated with metabolic and detoxification processes, as well as in protein-protein interaction (PPI) networks. However, they displayed differences in functional enrichment: GO terms related to metabolism and detoxification were more enriched in larvae, while those associated with host localization and acceptance were more enriched in heads. Variations in expression patterns among the subspecies and interactions within the PPI networks indicated that the genes *Cyp18a1*, *Cyp12d1*, and *Cyp12e1*, associated with detoxification and metabolism, are good candidates for genes related to host use. This hypothesis was tested by quantifying gene expression via RT-qPCR in larvae reared on culture media based on *Opuntia ficus-indica* or *Cereus hildmannianus*, a columnar cactus that is native to South America. The gene expression of the subspecies and *D. arizonae*, compared to *D. m. wrigleyi*, which is adapted to *Opuntia spp.*, showed a greater number of significant differences when on *Opuntia*-based media, particularly for the gene *Cyp12d1*. Conversely, exposure of the strains to the *Cereus hildmannianus* culture media resulted in a significant increase in the expression of the gene *Cyp12d1* in the three subspecies adapted to columnar cacti; of the gene *Cyp12e1* in *D. m. baja* and *D. m. sonorensis*; and of *Cyp18a1* in *D. m. sonorensis*. The similarity among the subspecies adapted to columnar cacti may be attributed to their adaptations related to the metabolism and detoxification of toxic compounds present in their respective hosts. These results reveal the plasticity in gene expression associated with detoxification in species that have undergone a host shift. Furthermore, they demonstrate constitutive expression of specific genes in the presence of their primary and alternative host cacti.

Keywords: Metabolism – Cactus – *Drosophila* – Plant-host interaction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação filogenética entre as quatro subespécies de <i>D. mojavensis</i> e <i>D. arizonae</i> , distribuições geográficas e principais cactos hospedeiros	16
Figura 2 - Etapas do uso do hospedeiro por <i>Drosophila</i> : localização, aceitação e uso	18
Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental	21
Figura 4 - Diagramas de Venn de DEGs nas comparações <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. mojavensis</i> , <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. baja</i> , <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. sonorensis</i> , em larvas (A) e cabeças de fêmeas (B)	27
Figure 5 - Redes de PPI de DEG em larvas: (A) <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. mojavensis</i> (B) <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. baja</i> (C) <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. sonorensis</i>	30
Figure 6 - Redes de PPI de DEG em cabeças: (A) <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. mojavensis</i> (B) <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. baja</i> (C) <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. sonorensis</i>	33
Figura 7 - Enriquecimento funcional dos DEGs presentes nas redes PPI de larvas (A) e cabeças (B)	35
Figura 8 - Quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes <i>Cyp</i> entre larvas de <i>D. mojavensis</i> e <i>D. arizonae</i> expostas a meios de cultura a base de cactos <i>Opuntia</i> (verde claro) e <i>Cereus</i> (verde escuro)	37
Figura 9 - Quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes <i>Cyp</i> em larvas de <i>D. mojavensis</i> e <i>D. arizonae</i> expostas a meios à base de cactos <i>Opuntia</i> (verde claro) e <i>Cereus</i> (verde escuro)	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para a realização das reações de RT-qPCR. **24**
- Tabela 2 - Número de DEGs associados às diferentes etapas de utilização do hospedeiro em transcriptomas de larvas e de cabeças. **26**

LISTA DE SÍMBOLOS

- ABC** – ATP-Binding cassette
- CoV** – Compostos orgânicos voláteis
- CYP** – Cytochrome monooxygenase P450
- DEG** – Genes diferencialmente expressos
- EST** – Esterase
- GR** – Gustatory receptor
- GST** – Glutathione S-transferase
- HLAU** – **H**ost **L**ocalization, **A**ceptance and **U**sage
- IR** – Ionotropic receptor
- OBP** – Odorant-binding protein
- OR** – Odorant receptor
- PPI** – Interação proteína-proteína
- RNA-seq** – Sequenciamento de RNA
- RQ** – Relative quantification
- UDP** - Uridine diphosphate
- UGT** - UDP-Glycosyltransferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1. Evolução de <i>Drosophila</i> e seus cactos hospedeiros	13
1.2. Etapas do uso hospedeiro e suas bases genéticas	17
1.3. Respostas transcriptômicas à mudança de hospedeiro em <i>Drosophila</i>	19
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Dados transcriptômicos e de expressão gênica	21
3.2. Predição de redes de Interação Proteína-Proteína	21
3.2.1. Redes de interação proteína-proteína (PPI)	22
3.2.2. Anotação funcional	22
3.3. Quantificação relativa de expressão gênica por RT-qPCR	23
3.3.1. Meios de cultura	23
3.3.2. Material biológico e cruzamentos	23
3.3.3. RT-qPCR (<i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i>)	24
4 RESULTADOS	25
4.1. Abundância de DEGs em transcriptomas de larvas e cabeças	25
4.2. Redes PPI de DEGs associados às etapas de uso do hospedeiro	28
4.3. Análise de enriquecimento funcional das redes PPI	33
4.4. Expressão relativa de genes <i>Cyp</i> em resposta às dietas alternativas de cactos	35
4.4.1. Variação transcricional da resposta às dietas entre espécies	36
4.4.2. Variação transcricional da resposta de cada espécie às diferentes dietas	38
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE	57
Expressão gênica diferencial em larvas das comparações <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. mojavenensis</i> , <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. baja</i> e <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. sonorensis</i> mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)	57
Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. mojavenensis</i> , <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. baja</i> e <i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. sonorensis</i> mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)	63

1. INTRODUÇÃO

A evolução de insetos fitófagos e saprófagos é frequentemente marcada por mudanças de hospedeiros. Em um cenário de mudança ambiental, os genótipos mais capazes de modular a expressão gênica e que maximizem o valor adaptativo tendem a ser favorecidos. A análise global de transcriptomas fornece uma visão abrangente dos padrões de expressão gênica e suas variações em diferentes condições, permitindo a compreensão das bases genéticas e moleculares da mudança de hospedeiro. Este estudo investiga, por meio de análises transcriptômicas, a variação da resposta transcricional às mudanças de cactos hospedeiros utilizando as quatro subespécies de *Drosophila mojavensis* e sua espécie irmã *D. arizonae* como modelo.

1.1. O grupo *repleta* de *Drosophila* e seus cactos hospedeiros

Drosophila, um gênero da família Drosophilidae, compreende 1.667 espécies de moscas saprófitas conforme Bächli (2018), as quais se alimentam de leveduras e bactérias que decompõem os tecidos de seus hospedeiros (Fellows; Heed, 1972; Fogleman; Kicher, 1985; Fogleman *et al.* 1990; 2001). Diferentes representantes do gênero se especializaram em utilizar determinados hospedeiros para alimentação, oviposição e desenvolvimento larval, incluindo frutas, caules, seivas, folhas, flores, cogumelos e cactos (R'kha *et al.* 1991; Markow; O'Grady 2005; Matzkin, 2012; Markow, 2019). Espécies adaptadas a viver em cactos, conhecidas como cactófilas, utilizam tecidos necróticos da família Cactaceae como locais de alimentação e reprodução (Pfeiler; Markow, 2011; Oliveira *et al.* 2012; Hasson *et al.* 2018; Barrios-Leal *et al.* 2021).

Diversos estudos propuseram que tanto os cactos quanto as moscas cactófilas do grupo *repleta* se originaram no norte da América do Sul (Edwards, Nyffeler; Donoghue, 2005; Oliveira *et al.* 2012; Hernández-Hernández *et al.* 2014). As Cactaceae teriam aí se originado a cerca de 32,5 Ma e se expandido para a América Central e América do Norte a cerca de 15-10 Ma (Arakaki *et al.* 2011; Hernández-Hernández *et al.* 2014). O grupo *repleta* de *Drosophila*, por sua vez, teria se originado a 13,7 Ma ou a 6 Ma utilizando metodologias alternativas, respectivamente idade do nó e taxa de mutação, para calibrar a filogenia (Moreyra *et al.* 2023).

Os cactos hospedeiros de espécies do gênero *Drosophila* possuem adaptações que os habilitam sobreviver em ambientes com condições extremas de temperatura e umidade (Mauseth; Halperin, 1975). Os cactos que hospedam moscas do gênero fazem parte de

subfamílias distintas, como Opuntioidea e Cactodoideae, as quais são formadas por espécies de cactos de composição físico-química distintas. Dentre os Opuntioidea, o gênero *Opuntia* é composto por 300 espécies encontradas principalmente em zonas áridas e semiáridas (Stintzing; Carle, 2005; Melgar *et al.* 2017; Giraldo-Silva *et al.* 2023). Estes cactos apresentam uma ampla adaptabilidade ecológica sendo encontrados nas mais diferentes condições climáticas pelo continente americano, no Mediterrâneo, no continente africano, na Austrália e na Índia.

A composição química do cacto varia de acordo com as leveduras associadas e os compostos gerados por elas como ácidos, álcoois e ésteres. Estudos sobre a composição química dos cladódios de *Opuntia spp.* descrevem alta quantidade de água, carboidratos, açúcares livres (glicose, frutose e galactose) e ácidos graxos (Stintzing *et al.* 2005; Ochoa *et al.* 2012; Manzur-Valdespino *et al.* 2022). Os cladódios jovens apresentam ácido ascórbico, carotenoides e clorofila (Guevara *et al.* 2001; Inglese *et al.* 2017). As flores acumulam betalaínas e compostos fenólicos, enquanto os frutos têm composição similar à dos cladódios, apresentando também flavonoides (Silva *et al.* 2021). Algumas espécies, como *O. littoralis*, também apresentam compostos derivados de terpenoides (47,2%), alcanos (7,6%), benzoides (10,6%), e ácidos carboxílicos (11,6%) (Date *et al.* 2013; Wright; Setzer, 2014).

Os cactos colunares (Cactodoidae), em contraste, produzem maior concentração de metabólitos secundários quando comparados à *Opuntia spp.* Compostos como alcaloides, triterpenos, glicosídeos, ácidos graxos, fitoesteróis são encontrados em tecidos necróticos desses cactos variando conforme a espécie e até mesmo o estágio de decomposição (Wright; Setzer, 2014), e são, em maior parte, tóxicos para as espécies de *Drosophila* (Soto *et al.* 2014). Mesmo assim, os cactos abrigam uma biodiversidade de microrganismos e insetos associados. O grupo *repleta* de *Drosophila*, é um exemplo de adaptação a essas condições.

Composto por grande número de espécies cactófilas (Oliveira *et al.* 2012), o grupo *repleta* tem se diversificado independentemente por desertos do continente americano (Wasserman 1982; Ruiz; Heed 1988; Markow; O'Grady, 2005). A divergência neste caso é adaptativa e parece ser uma resposta à exploração de diferentes cactos hospedeiros (O'Grady; Markow, 2012; Barrios-Leal *et al.* 2021). Um mapeamento de cactos hospedeiros em uma filogenia de 65 espécies do grupo *repleta* de *Drosophila* demonstrou que o uso de cacto do gênero *Opuntia* (cacto palmado ou pera espinhosa) é comum ao longo da filogenia (Oliveira *et al.* 2012). Mudanças para o uso de cactos colunares ocorreram múltiplas vezes, independentemente, ao longo da história evolutiva do grupo. Essa observação sugere que o uso de *Opuntia* é uma condição plesiomórfica, enquanto a diversificação para cactos colunares, de composição química mais complexa, representa um estado de caráter derivado (Oliveira *et al.*

2012). Essa hipótese é suportada pelas fontes: Breitmeyer & Markow (1998), Oliveira *et al.* (2012), Hasson *et al.* (2019) e Korotkova *et al.* (2021). Contudo, a origem do gênero *Opuntia* foi datada entre 7,5 e 3 Ma (Arakaki *et al.* 2011; Hernández-Hernández *et al.* 2014), o que implicaria em não ter sido *Opuntia* o hospedeiro ancestral do grupo, e sim outros gêneros da subfamília Opuntioideae, que se diversificaram a cerca de 10 Mya (Hernández-Hernández *et al.* 2014). Por outro lado, as estimativas da taxa de mutação para o “crown” *repleta* está em torno de ~6 Ma (Moreya *et al.* 2023), o que indicaria que a taxa de mutação é mais precisa na estimativa da divergência do grupo *repleta* suportando a ancestralidade do uso de *Opuntia* pelas espécies do grupo *repleta*.

Na América do Sul, encontram-se espécies do complexo *D. buzzatti* associadas a diferentes espécies de cactos (Ruiz; Wassaman, 1993; Manfrin; Sene, 2006). *Drosophila buzzatii* é encontrada em tecidos necróticos de *Opuntia* e de cactos colunares (Moreyra *et al.* 2023), enquanto a espécie irmã *D. koepferae* utiliza cactos colunares, mesmo em regiões em que são simpátricas (Fanara; Hasson, 2001; Hasson *et al.* 2019). Outro exemplo, são espécies do complexo *D. meridiana* (Vilela *et al.* 1983; Oliveira *et al.* 2012) que apresentam populações polimórficas adaptadas ao uso de cactos *Opuntia* e ao uso de cactos colunares do gênero *Cereus* *sp.* (Barrios-Leal *et al.* 2021).

Na América do Norte, o complexo *D. mojavenensis* é composto por quatro subespécies alopatricas adaptadas ao uso de cactos hospedeiros geograficamente distintos (Newby; Etges, 1998) (Figura 1). Endêmica da Ilha Santa Catalina, na costa da Califórnia (EUA), *D. m. wrightleyi* utiliza cactos *Opuntia littoralis* como hospedeiro (Richmond *et al.* 2013). As demais subespécies também utilizam o cacto *Opuntia spp.*, no entanto, são mais frequentemente encontradas utilizando cactos colunares específicos. Esse uso é considerado por muitos autores como preferência pelo cacto hospedeiro (Newby; Etges *et al.* 1998; Matzkin, 2013), ou mesmo especialização (Date *et al.* 2014). Neste estudo, considerou-se que essas subespécies têm preferência por tipos específicos de cactos colunares, já que utilizam *Opuntia* na falta destes (Matzkin, 2006). No continente, *D. m. mojavenensis* é encontrada no Deserto de Mojave (estados da Califórnia, noroeste do Arizona e sudeste de Nevada) em cactos barril (*Ferocactus cylindraceus*). Localizada mais ao sul, na Península de Baja California (México), *D. m. baja*, utiliza comumente o cacto agria (*Stenocereus gummosus*), enquanto *D. m. sonorensis*, no Deserto de Sonora (México e Sudoeste do estado de Arizona), é predominantemente encontrada em tecidos necróticos de cacto tubo de órgão (*Stenocereus thurberi*). A população de Sonora pode ser encontrada compartilhando o cacto Sina (*S. alamosensis*) com a espécie irmã *D. arizonae* (Ruiz *et al.* 1990; Smith *et al.* 2012), a qual utiliza diferentes cactos como hospedeiros

e possui uma grande distribuição geográfica abrangendo desde os estados do Arizona e Novo México até Chiapas no sudoeste mexicano (Ruiz; Heed, 1988; Wasserman 1992; Reed; Nyboer; Markow, 2007; Oliveira *et al.* 2012). A variação geográfica e de preferência por hospedeiros distintos torna o par de espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae* um excelente modelo na compreensão da divergência adaptativa na natureza.

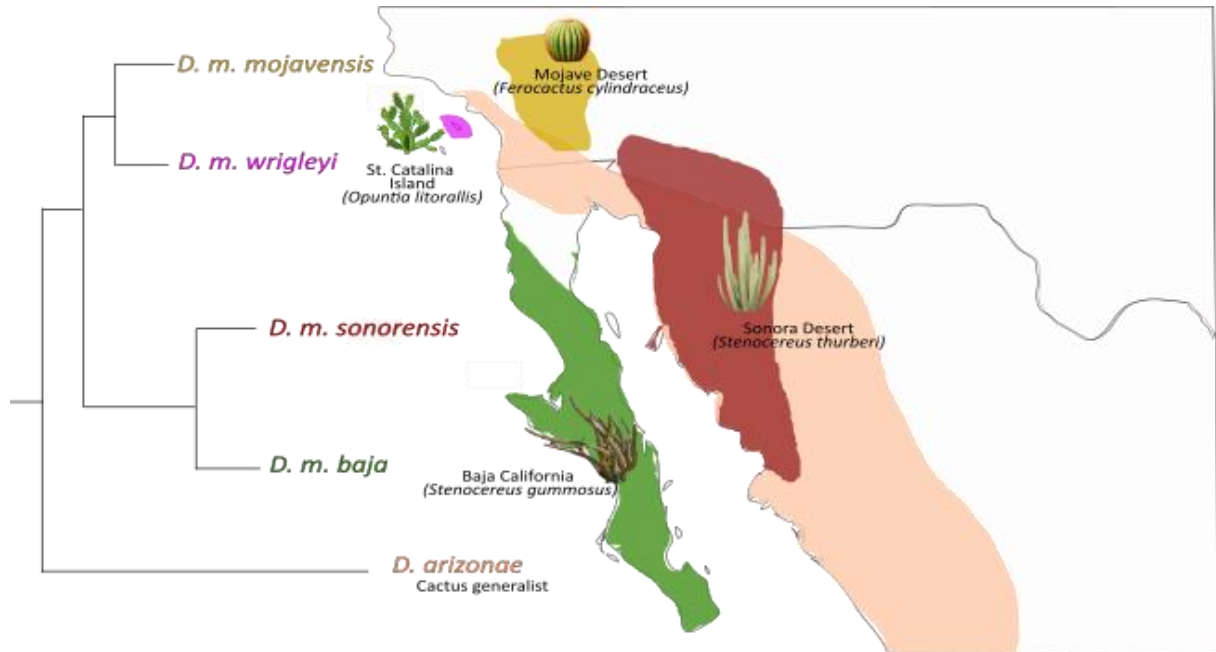


Figura 1. Relações filogenéticas entre as quatro subespécies de *D. mojavensis* e *D. arizonae*, distribuições geográficas e principais cactus hospedeiros. As relações entre espécies e subespécies foram propostas em estudos moleculares. Fonte: Smith *et al.* 2012; Matzkin, 2008; Machado *et al.* 2007; Reed *et al.* 2007; Khalaff *et al.* 2020.

Populações mudam de hospedeiros frequentemente devido a alterações na disponibilidade deles no ambiente (Date *et al.* 2013). Quando essas populações são geograficamente isoladas, o fluxo gênico pode ser dificultado, contribuindo com a divergência de traços adaptativos aos hospedeiros e, num segundo momento, levando ao isolamento reprodutivo (Etges *et al.* 2010). Nesse sentido, a mudança de hospedeiro em *D. mojavensis* tem sido apontada como uma das principais causas da divergência de suas populações. Estudos buscam ainda reconstruir a história evolutiva da espécie, com propostas diferentes, dependendo dos marcadores moleculares utilizados. Smith *et al.* (2012) apontam que a população proveniente da Baja Califórnia (*D. m. baja*) é a ancestral de *D. mojavensis* e que teria divergido da população continental do deserto de Sonora (*D. m. sonorensis*) há aproximadamente 0,25 Ma. Esta hipótese é suportada pela presença de variações em locos das enzimas ADH e glicose-6-fostato desidrogenase (G6pd) (Matzkin 2004). Reed *et al.* (2007) por outro lado, sugerem que a população continental Sonora-Arizona (*D. m. sonorensis*) seria a linhagem ancestral e teria

concluído a colonização dos desertos de Mojave e Baja California posteriormente. Machado (2007), apesar de não apontar uma das populações como ancestral, mostrou que as populações distribuídas ao norte (Mojave e Ilha de Santa Catalina) se agrupam em uma linhagem distinta das linhagens ao sul (Baja California e Sonora-Arizona). Uma filogenia comum a essa ideia foi proposta por Khallaf *et al.* (2020) utilizando sequências concatenadas de 9.087 genes. Em relação às populações dos desertos de Mojave (*D. m. mojavensis*) e de Sonora (*D. m. sonorensis*), estima-se que tenham divergido mais recentemente, há aproximadamente 0,125 Ma (Smith *et al.* 2012). A ilha de Santa Catalina, por sua vez, teria sido colonizada por representantes de populações da Baja California, hipótese suportada pela presença de inversão 3f2 em *D. m. wrigleyi* e ausência dela nas populações de Mojave (Delprat *et al.* 2014). Essa hipótese foi corroborada por perfis transcricionais das quatro subespécies de *D. mojavensis* que revelaram menor diferença entre a expressão gênica de *D. m. wrigleyi* e *D. m. baja* (Matzkin; Markow, 2013).

1.2. Etapas do uso hospedeiro e suas bases genéticas

As espécies cactófilas de *Drosophila* utilizam cactos em decomposição para sobrevivência e reprodução. As composições morfológica, química e as espécies de levedura associadas variam entre as espécies de cactos hospedeiros de *Drosophila* (Fogleman *et al.* 1990; Fogleman *et al.* 2001; Matzkin *et al.* 2006; Matzkin, 2012; Matzkin; Markow, 2013). No estágio larval, as espécies de *Drosophila* ingerem leveduras e o substrato e, no adulto, são atraídas por componentes voláteis produzidos durante essa decomposição (Gardiner *et al.* 2008; Markow 2019).

As populações de *Drosophila* apresentam adaptações que as habilitam a reconhecer e processar os componentes específicos dos hospedeiros por meio de mudanças no metabolismo, na fisiologia e no comportamento (Colleman *et al.* 2018; Allan; Matzkin, 2019). Assim, espera-se que a adaptação aos hospedeiros cactáceos esteja relacionada à variação da expressão gênica nas populações cactófilas. Isso é evidente para *D. mojavensis* pelas diferenças observadas em traços da história de vida (Rajpurohit *et al.* 2013), morfologia (Pfeiler *et al.* 2009), comportamento (Etges *et al.* 2006) e padrões de expressão gênica (Matzkin; Markow, 2013).

O processo de superação dos desafios impostos pelos cactos ao desenvolvimento das espécies de *Drosophila* foi sumarizado por Markow (2019) em três etapas principais (Figura 2): localização, aceitação e uso do hospedeiro (HLAU, do Inglês: **H**ost **L**ocalization, **A**ceptance and **U**sage). Durante a etapa de localização, moscas adultas diferenciam potenciais hospedeiros no ambiente, integrando diferentes sistemas. Proteínas de ligação a odorantes

(OBP) são proteínas globulares que têm a capacidade de se ligar a moléculas odorantes nos poros das sensilas quimiossensoriais e transportá-las para seus ligantes, os receptores odorantes (OR) (Sánchez-Garcia; Rozas, 2008). Uma família de mais de 60 genes codifica os ORs, que são expressos em sensilas olfativas e antenas (Hallem *et al.* 2004; Gomez-Diaz *et al.* 2018). Uma vez que o hospedeiro é reconhecido, inicia-se uma segunda etapa, que envolve a avaliação da composição do substrato. As moscas avaliam a qualidade do substrato e a presença de outros organismos potencialmente competidores, predadores, patógenos e parasitas. A avaliação do substrato é realizada por receptores gustativos (GR) codificados por uma grande família de genes expressos na cabeça, pernas e asas (Craig; Montell, 2009; Stafford *et al.* 2012). Os ORs e os GRs convertem compostos químicos voláteis em informação elétrica através de impulsos nervosos (Grabe *et al.* 2018; Diaz *et al.* 2018). O olfato e o paladar também são reconhecidos e avaliados através de receptores ionotrópicos (IR), que são expressos em certas partes da cabeça (Gomez-Diaz *et al.* 2018) e desempenham um papel crucial na seleção de locais para alimentação e oviposição (Chen; Amrein, 2017).

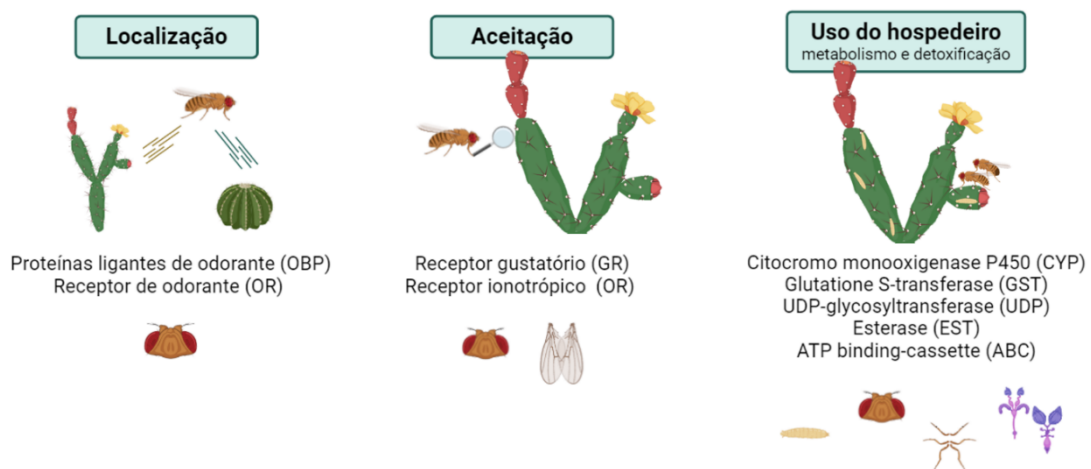


Figura 2. Etapas da utilização do hospedeiro por *Drosophila*: localização, aceitação e uso. Famílias gênicas associadas e locais de expressão. Fonte: Adaptado de Markow, 2019.

Após a identificação e avaliação do hospedeiro, as moscas devem ser capazes de utilizar o substrato para desenvolvimento e reprodução (Markow, 2019). Esses processos requerem metabolismo adequado de nutrientes e detoxificação de compostos tóxicos produzidos pelos cactos hospedeiros como defesa contra herbivoria. Quando, durante a decomposição, as leveduras e microorganismos não são capazes de metabolizar as substâncias, as larvas da *Drosophila* o fazem. As famílias gênicas dos citocromos P450 (CYP), das

glutathione S-transferases (GST) e das UDP-glicosiltransferases (UGT) são conhecidas por estarem envolvidas em processos de destoxificação relacionados à utilização do hospedeiro vegetal, de acordo com relatos em outros sistemas modelo (Aminet-Zach, 2005; Dow; Davies, 2006; Matzkin *et al.* 2006; Despres *et al.* 2007; Low *et al.* 2007; Li *et al.* 2008; Matzkin, 2012). Este processo ocorre em três fases determinadas por diferentes famílias gênicas (Misra *et al.* 2011). A fase I envolve enzimas destoxicantes, como as monooxigenases da superfamília Citocromo P450 (CYP450), que reduzem a atividade biológica de uma ampla variedade de substratos tóxicos endógenos (metabólitos secundários) e exógenos (compostos xenobióticos) (Chung *et al.* 2009). Na fase II, enzimas como as Glutathione S-Transferases (GST) (Low *et al.* 2007), as UGT (Luque; O'reilly, 2002) e as Esterases (EST) atuam nos subprodutos tóxicos gerados na fase I, tornando-os mais fáceis de serem eliminados pelo organismo. Na fase III, proteínas de ligação a Transportadores ABC (ATP-binding cassette) (Wu *et al.* 2019) e outros transportadores transmembranas exportam ativamente as toxinas para o ambiente extracelular, reduzindo a toxicidade dentro das células (Misra *et al.* 2011).

1.3. Respostas transcriptômicas à mudança de hospedeiro em *Drosophila*

Para investigar as bases genéticas da mudança de hospedeiro e sua potencial relação com a diversificação das espécies, estudos têm utilizado análises comparativas de morfologia, comportamento e características da história de vida. Adicionalmente, abordagens mais recentes envolvendo análises genômicas (Oliveira *et al.* 2012; Rane *et al.* 2019; Allan; Matzkin, 2019) e transcriptômicas (Matzkin; Markow, 2013; Mateus *et al.* 2019) têm contribuído para a compreensão dos elementos associados às respostas genéticas de organismos a hospedeiros alternativos: na identificação de famílias gênicas associadas à adaptação a novos hospedeiros, sua taxa de evolução e variação transcriptômica entre espécies relacionadas em resposta ao substrato (revisado em Simon *et al.* 2015).

Uma questão comum a esses trabalhos está relacionada ao modo como os insetos conseguem superar as barreiras impostas pelas plantas hospedeiras. Os trabalhos sugerem que a composição do hospedeiro desempenha um importante papel na variação de caracteres e que também atua aumentando e reduzindo o valor adaptativo (Soto 2014; Borgonove *et al.* 2014; De Panis *et al.* 2016; Singer; Parmesan, 2018; Hasson *et al.* 2018; Mateus *et al.* 2019). Barrios-Leal, *et al.* (2021) analisaram caracteres da história de vida de *D. meridionalis* quando exposta a meios de cultura à base de *O. monacantha* e *Cereus* e identificaram que o cacto colunar foi estressante para o desenvolvimento das moscas. De Panis *et al.* (2022) expôs *D.*

buzzatii e *D. koepferae* a diferentes dietas e identificou que a primeira apresenta resposta transcricional modulada pelos alcaloides do seu hospedeiro secundário, enquanto a segunda está associada à espécie do cacto. A exposição de *D. mojavensis*, *D. arizonae* e *D. melanogaster* a dietas com diferentes concentrações de carboidratos e lipídeos mostrou diferenças na resposta transcricional, tendo *D. mojavensis* a maior variação (Matzkin *et al.* 2011). Mateus *et al.* (2019) expuseram linhagens geográficas de *D. m. sonorensis* a meios de cultura à base do cacto *S. thurberi* e do fruto do cacto *Opuntia spp.* e identificaram alterações em aspectos da história da vida e na expressão gênica associadas a dietas sazonais.

Diferentes abordagens metodológicas envolvendo análises genômicas, transcriptômicas e experimentais oferecem *insights* para a questão das bases genéticas da adaptação ao hospedeiro (Date *et al.* 2013; Mateus *et al.* 2019; Anholt, 2020). Como acima destacado, a relação *Drosophila*-cacto envolve uma série de etapas coordenadas por famílias gênicas. Análises transcriptômicas recentes evidenciaram que essas apresentam diferenças quanto aos DEGs entre as subespécies de *D. mojavensis* e *D. arizonae* (Oliveira *et al.* dados não publicados). Neste caso, haveria diferenças nas redes metabólicas de subespécies e espécies relacionadas? Tais diferenças contribuem com o entendimento da história evolutiva das espécies? Para identificar relações físicas e funcionais entre proteínas, redes de interação proteína-proteína (PPI) são um recurso amplamente utilizado. Por meio delas, é possível identificar cadeias metabólicas, tipos de interações entre proteínas e proteínas *hub*, isto é, aquelas centrais em determinadas vias metabólicas (Sowmya; Ranganathan, 2014; Gemovic *et al.* 2018). Além disso, possibilitam análises de enriquecimento funcional das proteínas em rede o que possibilita a comparação de termos mais enriquecidos entre conjuntos de dados (Szklarczyk *et al.* 2018).

O presente estudo teve como objetivo investigar o processo adaptativo experimentado por essas populações por meio do padrão de expressão de genes responsivos a diferentes exposições ao substrato. Para testar a hipótese de que a expressão diferencial de genes associados ao uso do hospedeiro entre as subespécies de *D. mojavensis* e *D. arizonae* reflete o processo adaptativo a esses cactos, formulamos três perguntas: (i) As subespécies diferem na expressão gênica quando criadas em meio de cultura padrão? (ii) Os genes diferencialmente expressos em meio padrão resultam em redes distintas de interação proteína-proteína entre as subespécies? (iii) A expressão gênica das espécies/subespécies difere quando criadas em meio de cultura à base *Opuntia ficus-indica*, um cacto palmado, e de *Cereus hildimaniannus*, um cacto colunar?

2. OBJETIVOS

Investigar a divergência genômica e funcional entre subespécies de *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae* em resposta à exploração de diferentes cactos hospedeiros.

Objetivos específicos:

A investigação tem por objetivo comparar a expressão gênica nas quatro subespécies de *D. mojavensis* (*D. m. wrigleyi*, *D. m. mojavensis*, *D. m. baja*, e *D. m. sonorensis*) e em *D. arizonae* para:

1. Identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) associados ao uso do cacto hospedeiro em transcriptomas de larvas e cabeças de fêmeas adultas mantidas em meio de cultura padrão;
2. Propor redes de interação proteína-proteína (PPI) para famílias gênicas associadas ao uso do hospedeiro;
3. Propor genes candidatos associados à mudança de hospedeiro por meio da quantificação da expressão de genes associados ao metabolismo e destoxificação via RT-qPCR de larvas expostas a meios de cultura à base dos cactos *Opuntia ficus-indica* ou *Cereus hildimaniannus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental do presente estudo (Figura 3) constituiu na realização de análises de dados transcriptômicos das linhagens das espécies *D. mojavensis* e *D. arizonae*, e posterior ensaio para análise de efeitos na expressão gênica em linhagens expostas à diferentes dietas.

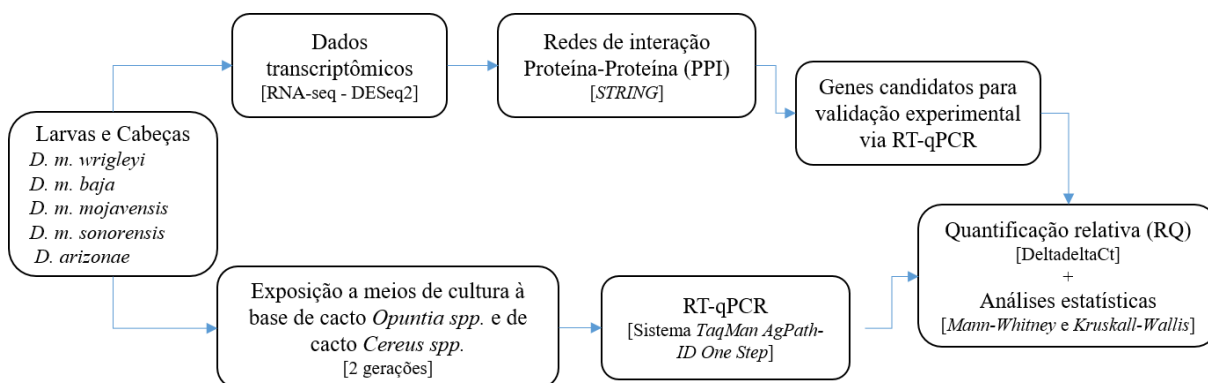


Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental. Fonte: Elaborado pela autora.

3.1. Dados transcriptômicos e de expressão gênica

Neste estudo, utilizamos bibliotecas de RNA-seq produzidas por nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.* dados não publicados). O mRNA foi extraído de 15 larvas e 10 cabeças de fêmeas, com 10 dias de idade, com três réplicas técnicas de *D. arizonae* e das quatro subespécies de *D. mojavensis*. A priorização do sequenciamento do transcriptoma de fêmeas se deve ao fato de que fêmeas desempenham um papel importante na escolha do hospedeiro acasalamento e oviposição e tal comportamento não ocorre em machos (Janz; Nylyn, 1997). As bibliotecas foram preparadas usando Illumina TruSeq (Illumina, San Diego, CA) e sequenciadas pela técnica *paired-end*, com leituras de 100-bp com o sequenciador Illumina HiSeq4000 por Genomeast (Estrasburgo, França). As linhagens foram obtidas do UC San Diego *Drosophila* Stock Center: [*D. m. mojavensis*: Anza (01), Deserto de Anza Borrego, Califórnia, EUA, n°: 15081-1352.01; *D. m. wrightleyi*: CI (22), Ilha Catalina, Califórnia, EUA, n°: 15081-1352.22; *D. m. baja*: BC (20), Região do Cabo, Santiago, Baja California Sur, México, n°: 15081-1352.20 e *D. m. sonorensis*: AG (26), Baía de Agiabampo, Sonora, México, n°: 15081-1352.26] e *D. arizonae* [HI (17), coletada em Metztitlan, Hidalgo, México, n°: 15081-1271.17]. Essas linhagens foram mantidas em meio de cultura padrão à base fubá-ágar, no Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, da Université Claude Bernard Lyon 1 (Villeurbanne, França).

Os dados normalizados por DESeq2 (Love *et al.* 2014) foram utilizados na detecção de DEGs entre *D. m. wrightleyi* em comparação a *D. m. mojavensis*, *D. m. baja* e *D. m. sonorensis* (Tabelas suplementares 1 e 2) (Oliveira *et al.* dados não publicados). Genes foram considerados diferencialmente expressos se apresentaram *p-value* ajustado inferior a 0,05 e *log2foldchange* superior a |1|. Este conjunto de dados foi utilizado nas análises incluindo identificação de DEGs comuns e únicos entre diferentes espécies e subespécies por meio da construção de diagramas de Venn; identificação de DEGs associados a diferentes etapas de uso do hospedeiro; construção de redes de interação proteína-proteína (PPI); seleção de DEGs candidatos para validação via RT-qPCR de larvas expostas a dietas à base de diferentes cactos.

3.2. Predição de redes de Interação Proteína-Proteína

3.2.1. Redes de interação proteína-proteína (PPI): Redes de proteínas foram propostas utilizando a base de dados STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk *et al.* 2018). Para tanto, organizamos os IDs dos DEGs relacionados ao uso do hospedeiro e seus respectivos níveis de expressão (*log2foldchange*) em larvas (Tabela suplementar 1) e cabeças de fêmea adulta

(Tabela suplementar 2). Os dados foram organizados em listas distintas com as comparações entre *D. m. wrigleyi* e as demais subespécies, as quais foram incluídas como *input* na função ‘Proteins with Values/Ranks’ da ferramenta.

Para este estudo, optamos pelo uso da função completa da ferramenta (*full STRING network*) a qual apresenta interações físicas e funcionais entre proteínas (Szklarczyk *et al.* 2018). As redes foram configuradas para apresentarem as interações de acordo com nível de suporte (*confidence*), sendo escolhido nível de médio de confiança (score < 0.400, *medium confidence*). As proteínas do *input* que não formaram interações robustas (*disconnected nodes*) foram suprimidas. A ferramenta também gerou análise de enriquecimento funcional das redes, que foi utilizada para marcação dos nós relacionados aos processos biológicos percepção sensorial de estímulo químico (GO:0007606) e processo metabólico (GO:0008152). Os resultados desta análise foram representados em gráficos bolha como explicado adiante.

3.2.2. Anotação funcional. A análise de enriquecimento funcional foi realizada para cada conjunto de genes das redes PPI pela plataforma String (Szklarczyk *et al.* 2018). Os termos com *p-value* < 0.05 (FDR) foram selecionados para cálculo de fator de enriquecimento e visualizados em gráfico bolha por meio da ferramenta SRplot (Tang *et al.* 2023).

3.3. Quantificação relativa de expressão gênica por RT-qPCR

3.3.1. Meios de cultura. Tendo em vista o objetivo deste estudo de observar a resposta transcricional à mudança de hospedeiro, o meio de cacto no qual as linhagens são mantidas em laboratório devem ser o mais representativas da ecologia natural possível, que diferem neste caso pela preferência por cacto palmado do gênero *Opuntia* (*D. m. wrigleyi*) e cactos colunares de diferentes gêneros, mas que compartilham a característica de terem uma composição mais rica em metabólitos secundários tóxicos (*D. m. mojavensis*, *D. m. baja*, *D. m. sonorensis*) ou generalista quanto ao uso do cacto hospedeiro (*D. arizonae*). Todas as linhagens estudadas foram mantidas em meio de cultura preparado a partir de meio de cultura à base de banana no qual foi adicionado purê de cladódios de cactos das espécies *Opuntia ficus-indica* e do cacto colunar *Cereus hildmaniannus*. Os dois tipos de meio de cultura passam a ser denominados como meio à base de *Opuntia* e à base de *Cereus*. Os dois tipos de purê de cladódios foram preparados e autoclavados por 20 minutos e, posteriormente, misturados ao meio padrão de banana. Cada receita de meio de cultura banana-cacto foi composta por água (1000 mL), banana (250 g), glicose (25 g), ágar-ágar (20 g), fermento em pó (30 g), solução alcoólica de nipagin 70% (10 mL), ácido propiônico (10 mL) e purê de

cacto (250 g). Os meios foram distribuídos em garrafas e tubos para a realização dos cruzamentos e cultura de larvas.

3.3.2. Material biológico e cruzamentos. Neste estudo foram utilizadas as mesmas linhagens utilizadas para o sequenciamento dos transcriptomas, mas mantidas no Laboratório de Evolução Molecular, do campus de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, em meio de cultura para espécies cactófilas (banana-*Opuntia*), em câmara de temperatura a 25 °C desde sua obtenção em 2015.

Cruzamentos intraespecíficos foram realizados para as quatro subespécies de *D. mojavensis* e para *D. arizonae*. Machos e fêmeas virgens de cada linhagem foram separados por sexo até 10 horas após a eclosão e armazenados separadamente em frascos contendo meio de cultura banana+*Opuntia*, com 10 moscas por frasco, até que estivessem sexualmente maduros (8° a 10° dias de idade). As garrafas de cultura foram mantidas em mesmas condições de temperatura e umidade por 12 dias, depois disso os casais foram descartados. Após emergência dos imagos, machos e fêmeas virgens F₁ foram coletados diariamente, separados por sexo e isolados em garrafas contendo meios à base de *Opuntia* e *Cereus* até atingirem entre 8-10 dias de idade.

Para a obtenção de descendência em diferentes meios de cultura, casais foram unidos em garrafas contendo os respectivos meios de cultura e a descendência transferidas para os respectivos meios de cultura por duas gerações. A cada transferência, as moscas parentais eram descartadas antes da próxima geração emergir (F₁ e F₂). Trinta larvas no terceiro estágio foram coletadas em quatro réplicas, resultando em quatro amostras biológicas para cada linhagem. As amostras foram armazenadas diretamente em tubos Eppendorf (1,5 mL) a -80 °C para posterior extração de RNA e quantificação relativa de expressão por RT-qPCR.

3.3.3. RT-qPCR (*Quantitative Reverse Transcription PCR*). Para quantificar os níveis de transcritos relacionados ao metabolismo e destoxificação em larvas expostas a diferentes meios de cultura, foram selecionados genes da família dos citocromos P450 com maiores diferenciais de expressão no conjunto de dados de DEGs (RNA-seq) e que apresentaram localização de interesse nas análises de redes PPI, como ocupando posição de proteína *hub*. Os oligonucleotídeos usados neste estudo foram desenhados para cada gene candidato e para o gene de referência *rp49* (Tabela 1), na ferramenta Prime3Plus software (<https://www.primer3plus.com/>) baseados em sequências obtidas de genomas das cinco linhagens montados por nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.* dados não publicados).

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para as reações de RT-qPCR.

Genes	Primers (5'-3')	Sondas (5'-3')
<i>Rp49_F</i>	AGAATCGTGTCTACTGCGGTG	[6AM]ACGCAAGGAAARCGTTGAGCGCGCC[BHQ1]
<i>Rp49_R</i>	GGTTTGTAGACGCACCGAC	
<i>Cyp12d1_F</i>	AACGGCAACAGCGATAAACC	[6AM]GCCGCTGCTGCACAGGCGCGT[BHQ1]
<i>Cyp12d1_R</i>	AAACCTCAATTTGCCTGGCC	
<i>Cyp12e1_F</i>	ATCGTGGACATGCTGCTGG	[6AM]CCGTGGCCAGGCTGGTGCACA[BHQ1]
<i>Cyp12e1_R</i>	AGAACTGGGCCTGAATGCG	
<i>CYP18a1_F</i>	AATCCCAAGGAGATGCGACG	[6AM]TGGGTGCGCATCGTCTGCCACG[BHQ1]
<i>CYP18a1_R</i>	TCGTTGACTCAGTGACTGGC	

As amostras de RNA das cinco linhagens foram extraídas com RNeasy kit (Qiagen), tratadas com DNase com DNA-free kit (Ambion), quantificadas usando espectrofotômetro (Nanodrop) e posteriormente mantidas em freezer -80 °C. As reações de RT-qPCR foram realizadas com de sistema TaqMan One-Step usando reagentes AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, U.S.A). Os reagentes foram desenhados para amplificação dos RNA alvos com sensibilidade e robustez por meio de uma estratégia rápida de transcrição reversa em tubo único. Para uma reação (20 µL volume final), 5 µL RNA total (20 µM) foram diluídos em 2,3 µL de água nuclease-free (Dpec), 0,3 µL de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (10 µM cada), 0,8 µL sonda fluorescente FAM (10 µM), 10 µL RT-PCR *buffer* e 0,8 µL RT-PCR enzima. A fase de amplificação foi realizada em um sistema Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR. As condições de ciclagem foram as seguintes: 10 minutos à 45 °C (1 ciclo); 10 minutos à 95 °C (1 ciclo); e 15 segundos à 95 °C seguidos por 45 segundos à 55 °C (40 ciclos).

A quantificação relativa (do Inglês *relative quantification*, RQ) foi calculada pela razão entre a expressão relativa dos genes alvo em relação à do gene de referência (*rp49*). Com o intuito de verificar a diferença de expressão (*log2foldchange*) dos genes entre as linhagens, *D. m. wrigleyi* adaptada ao uso de *Opuntia*, o estado de caráter ancestral (Oliveira *et al.* 2012), foi utilizada como amostra de referência. Os valores de RQ foram testados para normalidade e homogeneidade por meio de testes Shapiro-Wallis ($p < 0,05$). Para calcular a variância da expressão gênica entre subespécies em cada meio de cultura foi realizado o teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) em razão da falta de distribuição normal e homogeneidade dos dados. Adicionalmente, a variância de cada linhagem entre os meios de cultura foi testada por meio do teste Mann-

Whitney ($p < 0,05$). Os resultados dos níveis de expressão e dos testes estatísticos foram representados em gráficos de barras usando o pacote R.

4. RESULTADOS

Para investigar a relação entre a expressão gênica e a mudança do cacto hospedeiro em *D. mojavensis* e *D. arizonae*, foram utilizados os dados transcriptômicos de larvas e cabeças de fêmeas (RNA-seq) previamente obtidos. Inicialmente serão apresentados os resultados das análises de interação proteína-proteína e enriquecimento funcional. Em seguida, serão apresentados resultados do experimento de exposição das linhagens às dietas alternativas de cactos seguidos dos resultados de quantificação da expressão (RT-qPCR) de genes associados ao metabolismo e destoxificação.

4.1. Abundância de DEGs em transcriptomas de larvas e cabeças

Os dados de DEGs em larvas e cabeças (Tabelas suplementares 1 e 2) mantidos em meio de cultura padrão (fubá-ágar) foram analisados com o objetivo de identificar genes com expressão compartilhada entre a subespécie com preferência por cacto palmado (*D. m. wrigleyi*), e as três subespécies com preferência por cactos colunares (*D. m. mojavensis*, *D. m. baja*, e *D. m. sonorensis*), além da espécie irmã *D. arizonae*, de hábito generalista. Os dados reúnem DEGs de famílias gênicas associadas às etapas de localização, aceitação e uso do hospedeiro e possivelmente relacionados à mudança de hospedeiro durante a evolução do grupo.

De modo geral, os dois conjuntos de dados (larvas e cabeças) apresentaram maior proporção de DEGs associados às etapas de metabolismo e destoxificação quando comparada àquelas relacionadas às etapas de localização e aceitação (Tabela 2). Essa diferença é especialmente evidente nos dados transcriptômicos de larvas. Na comparação entre *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis* registraram-se 40 DEGs associados ao uso do hospedeiro, enquanto nas comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis*, foram 55 e 52, respectivamente. Este resultado corresponde ao esperado, tendo em vista que o desenvolvimento larval ocorre principalmente em contato com o substrato. Por outro lado, os genes associados às etapas de localização e aceitação do hospedeiro, normalmente desempenhadas pelo indivíduo adulto, se mostraram mais abundantes nos dados de cabeças. Dentre as comparações, *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis* apresentou o maior número de DEGs (27) seguida das demais comparações as quais possuem 20 DEGs associados às duas etapas juntas.

Tabela 2. Número de DEGs associados às diferentes etapas de utilização do hospedeiro em dados de larvas e cabeças.

Famílias gênicas Comparação	Localização		Aceitação		Metabolismo e Destoxificação				
	OBP	OR	IR	GR	UDP	GST	CYP	ABC	EST
Larvas									
<i>D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis</i>	6	3	1	1	6	4	22	4	4
<i>D. m. wrigleyi-D. m. baja</i>	12	7	3	3	7	7	24	6	11
<i>D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis</i>	10	3	3	1	7	10	26	3	6
Cabeças									
<i>D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis</i>	11	10	2	4	6	5	16	4	3
<i>D. m. wrigleyi-D. m. baja</i>	11	7	2	0	5	3	24	8	5
<i>D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis</i>	5	9	4	2	5	3	20	3	4

Diagramas de Venn foram construídos para identificação de DEGs únicos ou compartilhados entre as diferentes comparações de cada conjunto de dados larvas (Figura 4A) e cabeças de fêmeas (Figura 4B). Para larvas (128 genes), a análise revelou que apenas 17% dos genes são diferencialmente expressos em todas as comparações. As comparações *D. m. wrigleyi-D. m. baja* e *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis* apresentam quase duas vezes mais DEGs em comum do que quando comparadas à *D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis* (8%). Ao analisar genes exclusivos de cada comparação, *D. m. wrigleyi-D. m. baja* apresentou a maior proporção (26%) entre as três, seguida por *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis* (15%). Em relação aos DEGs em cabeças (123 genes), foi observada uma proporção similar de genes comuns a todas as comparações (18%). A comparação *D. m. wrigleyi-D. m. baja* apresentou proporção similar de DEGs compartilhados quando comparada a *D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis* (11%) e a *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis* (10%), as quais, por sua vez, se mostraram mais diferentes entre si, com apenas 7% de genes com expressão compartilhada.

comparação com *D. m. mojavensis*. Dentre os genes exclusivos, na comparação *D. m. wrigleyi-D. m. baja*, o receptor de odorante *Or1a* (GI14836) aumentou sua expressão entre larvas (4,724862444) e cabeças (6,142224415).

4.2. Redes PPI de DEGs associados às etapas de uso do hospedeiro

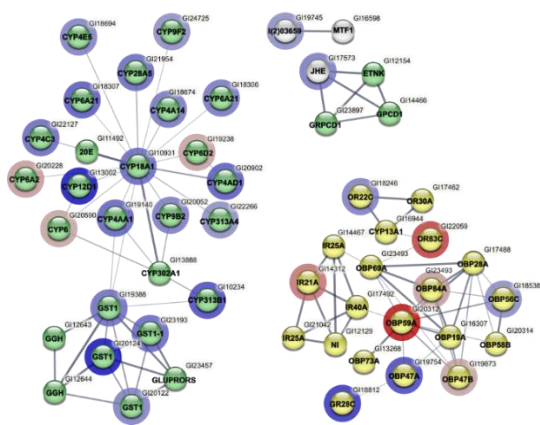
Os dados de DEGs entre *D. m. wrigleyi* e as demais subespécies e associados às etapas do uso do hospedeiro foram utilizados para a construção de redes de interação proteína-proteína a fim de identificar padrões entre as linhagens e as fases de desenvolvimento (Figuras 4A-C e 5A-C). As redes PPI são compostas por nós ligados por linhas. Os nós representam as proteínas, enquanto os anéis que os circundam representam o nível de expressão diferencial do respectivo gene ($\log_2\text{foldchange}$) incluído no *input*. A coloração dos anéis varia entre azul e vermelho representando genes super e subexpressos em *D. m. wrigleyi*, respectivamente. Os nós não circunscritos referem-se a proteínas dos bancos de dados da ferramenta String (Szklarczyk *et al.* 2018). O centro dos nós, por sua vez, foi colorido de acordo com os processos biológicos aos quais as proteínas estão associadas, a saber, percepção sensorial de estímulo químico (GO:0007606) e processo metabólico (GO:0008152). Os nós não coloridos não estão relacionados diretamente com os referidos processos biológicos. As linhas que ligam as proteínas representam as interações que podem incluir relações de co-expressão, coocorrência, fusão, vizinhança e homologia entre as proteínas. O grau de suporte da predição dessas interações varia entre baixa (0,150) e alta confiança (0,900) e está representado por meio da espessura das linhas.

De modo geral, as redes PPI apresentaram maior proporção de proteínas pertencentes às famílias CYPs e GSTs, o que pode ser explicado pela maior abundância destes genes no conjunto de dados DEGs (Tabela 2). A maior parte das proteínas agrupadas em *clusters* pertencem às mesmas famílias gênicas e estão associadas a processos biológicos e funções moleculares similares (Tabela suplementar 3). Os *clusters* robustos destas famílias gênicas estão organizados no lado esquerdo de cada rede, com os nós marcados em verde, junto a *clusters* de proteínas das famílias EST, UST, UDP e ABC. Já, ao lado direito de cada rede e marcadas em amarelo encontram-se redes de proteínas OR, OBP, IR e GR.

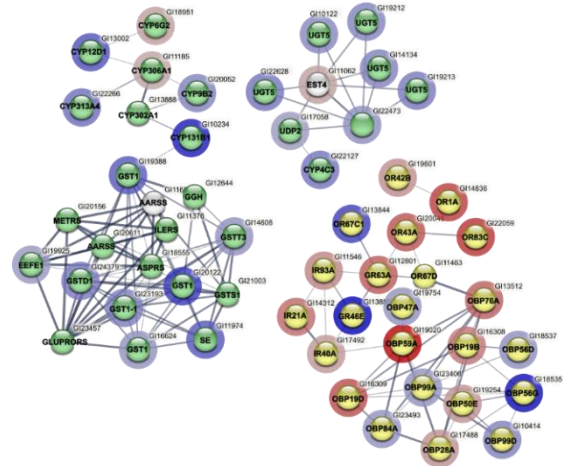
As redes PPI propostas para dados de DEGs em larvas (Figura 5A-C) apresentaram *clusters* robustos de genes associados ao metabolismo e destoxificação (nós verdes), em maioria superexpressos em *D. m. wrigleyi*. Quando comparadas à rede *D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis* (Figura 5A), maior semelhança foi observada entre as redes das comparações *D. m. wrigleyi-*

D. m. baja (Figura 5B) e *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis* (Figura 5C). A família CYP se mostrou a mais numerosa na relação de DEGs de todas as comparações, no entanto, na rede *D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis* (Figura 5A) formou o maior e mais centralizado *cluster*, quando comparada às demais. Neste, 17 proteínas CYP superexpressas e subexpressas interagem com a proteína central CYP18A1 (GI10931), a qual é diferencialmente expressa somente nesta comparação e está superexpressa em *D. m. wrigleyi* ($\log_2\text{foldchange}=1,632897102$). A centralidade desta proteína sugere associação com diversas cadeias de reações. Por outro lado, nas redes das outras duas comparações (Figuras 5B e 5C), formaram-se um *cluster* robusto de genes da família GST sendo que aquele encontrado na rede *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis* apresentou três das proteínas (GI23194, GI24379 e GI23193) superexpressas em *D. m. sonorensis* ($\log_2\text{foldchange} = 6,205581896, 6,087788902$ e $5,393809578$, respectivamente).

A. *D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis*



B. *D. m. wrigleyi-D. m. baja*



C. *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis*

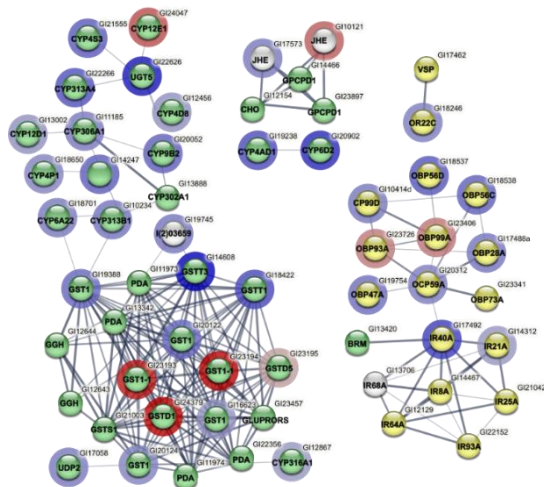


Figura 5. Redes de PPI de DEG em larvas: A. *D. m. wrigleyi-D. m. mojavensis* B. *D. m. wrigleyi-D. m. baja* C. *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis*. O diagrama ilustra interações (linhas) entre proteínas (nós) associadas a etapas do uso do hospedeiro. Espessura das linhas: grau de suporte das interações, variando entre baixa (score 0,150) e alta confiança (0,900). Nós marcados de acordo com o processo biológico: metabolismo (verde); sensibilidade a estímulos químicos (amarelo). Nível de diferencial de expressão: subexpresso (vermelho) e superexpresso (azul), na subespécie referência *D. m. wrigleyi*.

As famílias gênicas associadas às etapas de localização e aceitação do hospedeiro (nós amarelos) também formaram *clusters* de proteínas. As proteínas estão, em sua maioria, superexpressas nas linhagens com preferência por cactos colunares. O agrupamento mais abundante destas proteínas referentes aos DEGs incluídos no *input* é observado na rede *D. m. wrigleyi-D. m. baja* (Figura 5B), o qual também reuniu maior proporção de proteínas superexpressas em *D. m. baja*. No entanto, é possível identificar proteínas compartilhadas entre as diferentes redes estabelecendo interações com diferentes proteínas. A proteína IR21A, por exemplo, se encontra nas três redes, sendo superexpressa em *D. m. mojavenensis* e *D. m. baja*. Na rede *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis*, por outro lado, se encontra subexpressa em *D. m. sonorensis*. Apesar dos diferentes padrões de expressão, nas redes envolvendo as subespécies *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*, a proteína IR21A apresenta relação direta com a proteína também diferencialmente expressa IR40A (GI17492). Na rede de *D. m. mojavenensis*, por outro lado, a proteína apresenta interação apenas com outros receptores ionotrópicos sugeridos pela ferramenta.

As redes em geral reuniram proteínas pertencentes às respectivas famílias gênicas, no entanto, interações entre diferentes famílias também foram identificadas; dentre elas, interações esperadas entre famílias que, conhecidamente, compõem as mesmas vias metabólicas. A interação entre as famílias CYP e GST foi observada em todas as redes, tendo a proteína GST1 (GI19388) fazendo a ponte entre os dois *clusters*.

Apesar de comporem *clusters* separados, as famílias CYP, EST, UDP e UGT também apresentaram interações nas redes, especialmente naquelas envolvendo *D. m. baja* (Figura 5B) e *D. m. sonorensis* (Figura 5C). Na rede de *D. m. mojavenensis* a proteína CYP4C3 (GI22127) apresenta relação com outras proteínas CYP que compõem um *cluster* composto apenas por citocromos. Já na rede de *D. m. baja* a rede CYP4C3 apresenta interação de coocorrência e co-expressão com a UDP2 (GI17058) a qual, por sua vez, interage com outras proteínas da mesma família e com esterases como a codificada pelo gene GI22473 e a esterase E4 (GI11062). Padrão semelhante foi identificado na rede de *D. m. sonorensis*, na qual uma UGT5 (GI22626) se encontra interagindo no *cluster* de proteínas CYP, as quais também estão presentes na rede de *D. m. baja*, o que indica maior similaridade entre as redes destas duas subespécies.

Além de fornecer informações sobre interações entre proteínas, as redes PPI elucidaram interações entre proteínas com diferentes padrões de expressão. A rede envolvendo *D. m. mojavenensis* (Figura 5A) resultou em um curioso agrupamento de CYPs sub e superexpressos. Curiosamente, a proteína CYP18A1, a qual apresentou expressão diferencial apenas nessa comparação, interagiu com outros 16 genes da mesma família, a maioria das quais não interage

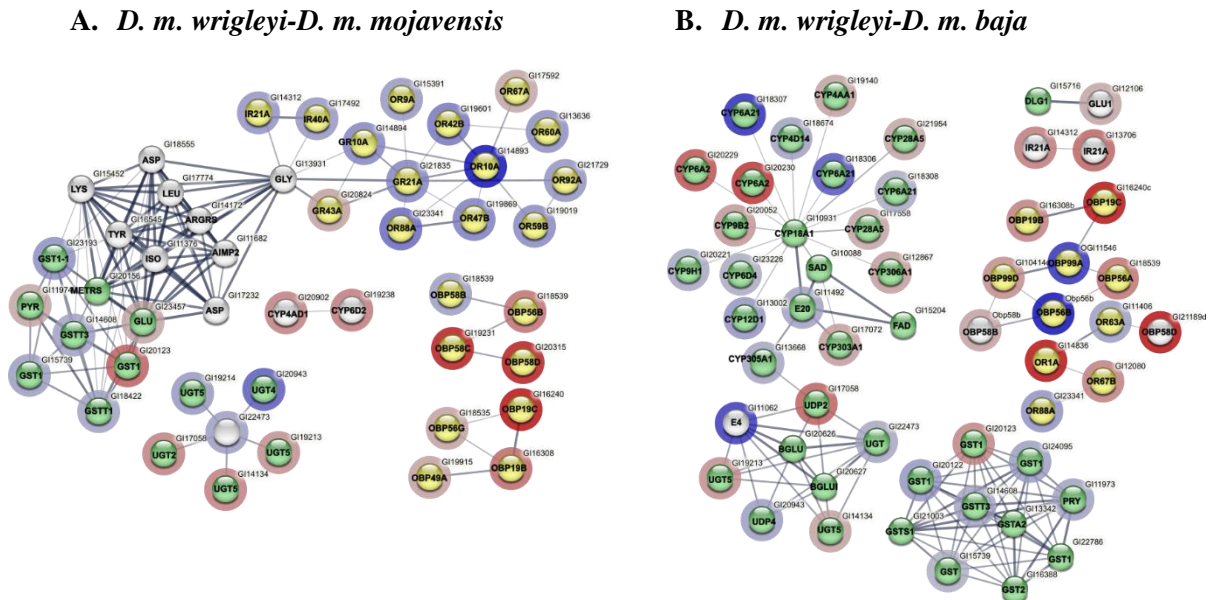
entre si. Dentre essas proteínas CYP12D1 (gene superexpresso em *D. m. wrigleyi*) interage com CYP18A1, enquanto nas outras redes interage com CYP306a1, cujo gene é superexpresso em *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*. O gene *Cyp12d1* apresentou-se subexpresso nas três subespécies que preferem cactos colunares, com menor expressão em *D. m. mojavenis* ($\log_2\text{foldchange} = -3,137837234$) e *D. m. baja* ($\log_2\text{foldchange} = -3,02077904$) do que em *D. m. sonorensis* ($\log_2\text{foldchange} = -1,223437504$). Outra proteína que apresentou um padrão de expressão distinto entre as subespécies foi CYP12E1 (GI24047), subexpressa em *D. m. baja* ($\log_2\text{foldchange} = -1,422389921$) e superexpressa em *D. m. sonorensis* ($\log_2\text{foldchange} = 3,693038286$). Essas diferenças entre subespécies que utilizam cactos hospedeiros do mesmo gênero sugere que já existem diferenças no padrão de expressão dos genes associados aos mecanismos de detoxificação de subespécies. Desse modo, os genes *Cyp18a1*, *Cyp12d1* e *Cyp12e1* podem ser bons candidatos para verificar tal hipótese.

As redes PPI propostas para o conjunto de dados de DEGs em cabeças (Figura 6A-C) seguiu um padrão semelhante ao encontrado nas redes propostas para dados de larvas. Os genes se apresentam em *clusters* de famílias gênicas. Dentre as três redes propostas, a da comparação *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavenis* (Figura 6A) apresentou número expressivo de proteínas associadas à recepção de estímulos químicos. Curiosamente, proteínas das famílias GR, IR e OR se encontram em sua maioria subexpressas em *D. m. mojavenis* (Tabela suplementar 2). Proteínas da família OBP formam *cluster* composto unicamente por proteínas OBP, em sua maioria superexpressas na subespécie com preferência por cacto colunar.

A rede de comparação *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* (Figura 6B), por outro lado, apresentou maior número DEGs associados ao metabolismo. De modo muito semelhante à rede proposta para larvas da comparação *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavenis* (Figura 6A), as CYPs formaram um *cluster* 16 proteínas ligadas a uma CYP central (CYP18A1). Esta proteína *hub* não se encontra diferencialmente expressa nos dados transcriptômicos de cabeças, tendo sido sugerida pela ferramenta utilizada, com base em suas bases de dados. De qualquer maneira, sua presença como *hub* em diferentes redes sugere que o gene desempenhe papel importante em diferentes vias metabólicas e tecidos. As proteínas CYP se encontram interagindo diretamente com um *cluster* de EST e UDP, enquanto proteínas GST formam um agrupamento independente.

A rede proposta para a comparação *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* (Figura 6C) apresentou a conformação mais distinta, não apresentando muitas interações entre proteínas de diferentes famílias gênicas distintas. Em relação aos genes relacionados ao metabolismo, UDP e EST compuseram um *cluster*, enquanto as proteínas GST formaram agrupamento separado. O mesmo padrão se aplica às proteínas de percepção a estímulos químicos, associados às etapas

de localização e aceitação do hospedeiro. A referida comparação apresentou maior número de proteínas IR diferencialmente expressas formando um *cluster*. Proteínas OR e OBP também se agruparam separadamente.



C. *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis*

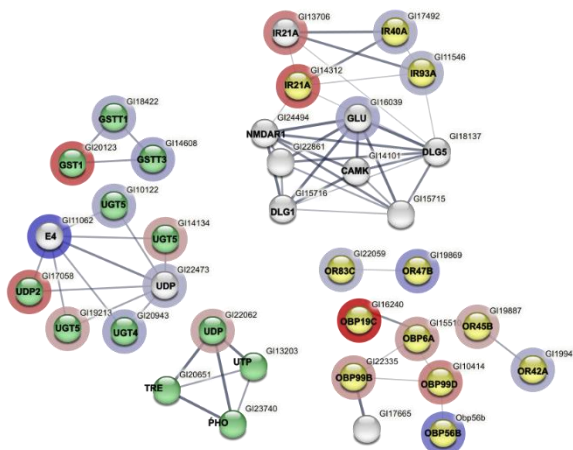


Figura 6. Redes de PPI de DEG em cabeças: A. *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis* B. *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* C. *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis*. O diagrama ilustra interações (linhas) entre proteínas (nós) associadas a etapas do uso do hospedeiro. Espessura das linhas: grau de suporte das interações, variando entre baixa (score 0.150) e alta confiança (0.900). Nós marcados de acordo com o processo biológico: metabolismo (verde); sensibilidade a estímulos químicos (amarelo). Nível de diferencial de expressão: subexpresso (vermelho) e superexpresso (azul), na subespécie referência *D. m. wrigleyi*.

4.3. Análise de enriquecimento funcional das redes PPI

Para melhor caracterizar a composição do conjunto de DEGs nas linhagens de interesse quando expostas em meio de cultura padrão (fubá-água), realizamos análise de enriquecimento funcional para os termos GO (FDR<0,05, Figura 7A-F) das proteínas representadas nas redes PPI (Figuras 5A-C e 6A-C).

Nas redes PPI propostas para DEGs em larvas, os termos GO mais abundantes estão relacionados principalmente com metabolismo e destoxificação (Figura 7A-C). Dentre eles, processos biológicos como ‘UDP-glucose metabolic process’, associados a proteínas UDP e funções biológicas como ‘Heme binding’ and ‘Iron binding’, associados às CYP, foram identificados enriquecidos nas análises para as três comparações. Comparativamente, o termo ‘Ionotropic glutamate receptor signaling pathway’ esteve enriquecido em *D. m. mojavenis* (Figura 7A) e *D. m. sonorensis* (Figura 7C), enquanto ‘Glutathione metabolic process’, associado às GST, foi mais abundante nas comparações envolvendo as subespécies *D. m. baja* (Figura 7B) e *D. m. sonorensis* (Figura 7C). Apesar de menos representados, termos relacionados à localização do hospedeiro também se mostraram enriquecidos, sendo o ‘Sensory perception of smell’ o mais abundante nas três comparações, junto às funções moleculares associadas como ‘Odorant binding’ e ‘Pheromone binding’, associadas às proteínas OR e OBP.

A análise de DEGs em cabeças revelou termos associados à localização e aceitação do hospedeiro mais enriquecidos para as comparações envolvendo *D. m. mojavenis* (Figura 7D) e *D. m. sonorensis* (Figura 7F). Dentre os mais enriquecidos (Log_Enrichment score >1,5) estão ‘Sensory perception of smell’ e ‘Detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell’ junto às funções ‘Odorant binding’ e ‘Olfactory receptor activity’. Termos relacionados ao metabolismo como ‘UDP-glucose metabolic process’ permaneceram enriquecidos nos dados de cabeças das três comparações. Alternativamente, a análise da comparação envolvendo *D. m. baja* (Figura 7E) revelou o maior número de termos relacionados ao metabolismo incluindo a biossíntese de diferentes compostos, por exemplo, ‘Stenol’ ‘Hormone’ e ‘Steroid biosynthesis process’ e funções biológicas associadas a GST e CYP.

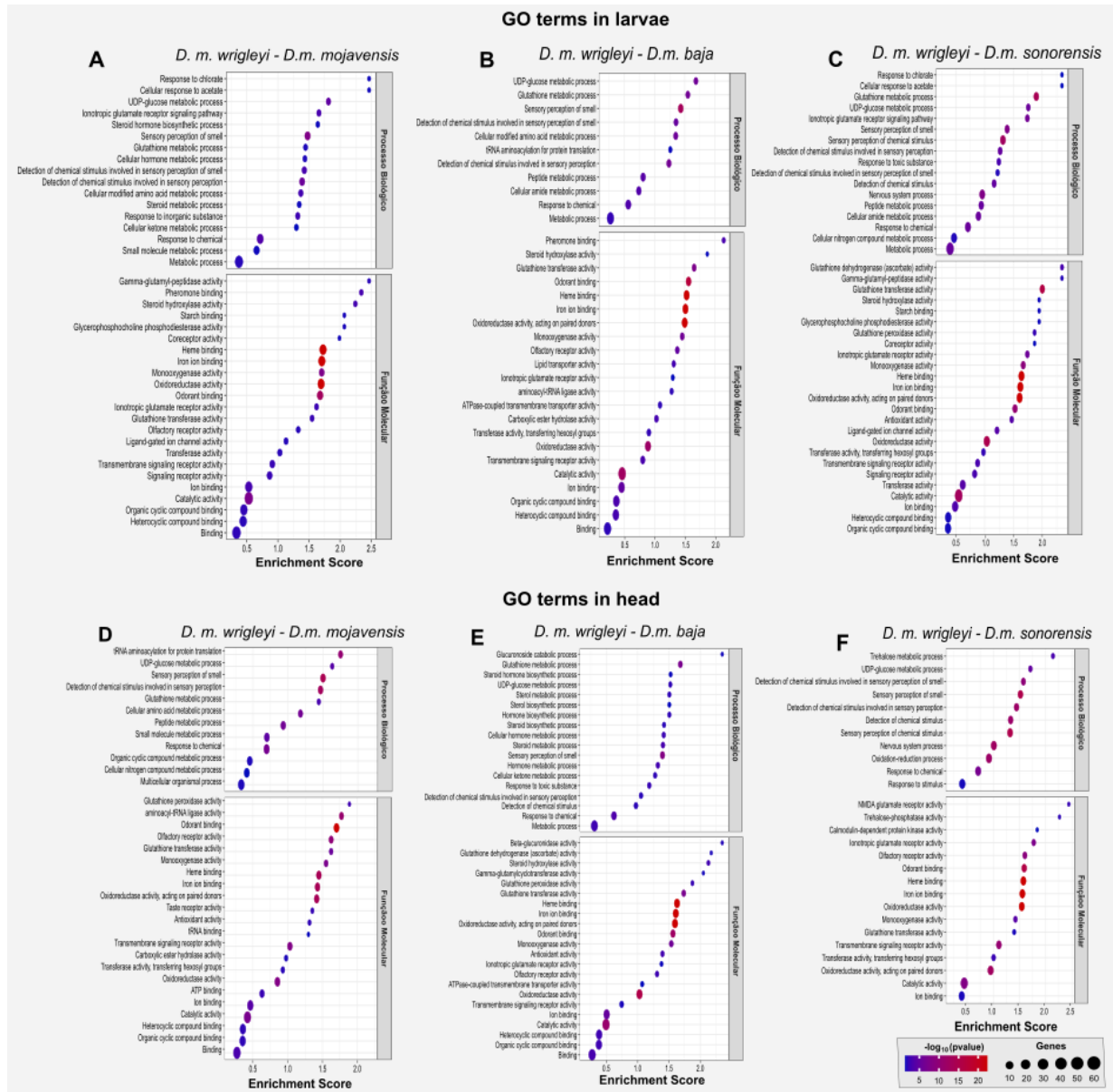


Figura 7. Enriquecimento funcional dos DEGs presentes nas redes PPI de larvas (A) e cabeças (B). Eixo Y: termos enriquecidos organizados nas categorias processo biológico e função molecular. Eixo X: índice de enriquecimento (*enrichment score*). Bolhas: tamanho proporcional ao número de genes associados ao termo e a cor representa o valor estatístico (FDR). Fonte: Elaborado pela autora.

4.4. Expressão relativa de genes *Cyp* em resposta às dietas alternativas de cactos

Os genes associados ao metabolismo e detoxificação de compostos químicos revelaram padrões distintos de expressão em larvas cultivadas em meio de cultura padrão (fubá-ágar) (Tabelas suplementares 1 e 2). Dentre os DEGs analisados nas redes PPI, três citocromos foram escolhidos para quantificação da expressão em larvas cultivadas em meios de cultura com diferentes composições químicas, a saber, *Cyp18a1*, *Cyp12d1* e *Cyp12e1*. O gene *Cyp18a1* foi escolhido por aparentemente desempenhar um papel de gene *hub* em rede de citocromos

envolvendo a subespécie *D. m. mojavensis* (Figura 5A) e por sua função biológica associada ao desenvolvimento larval de espécies de *Drosophila* (Guittard *et al.* 2011). O gene *Cyp12d1* compôs as três redes propostas para os dados de larvas, estando superexpresso em *D. m. wrigleyi* em todos os casos (Figuras 5A-C). Além disso, é reportado em diversos estudos como uma primeira resposta à exposição a compostos químicos (McDonnell *et al.* 2012; Gao *et al.* 2022), o que o torna um bom marcador de expressão diferencial. Por fim, *Cyp12e1* se mostrou diferencialmente expresso nas comparações envolvendo *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*, estando subexpresso e superexpresso, respectivamente.

Neste trabalho, com o objetivo de investigar a variação da expressão de genes associados com a destoxificação entre as linhagens de interesse, quantificamos a expressão dos genes *Cyp18a1*, *Cyp12d1* e *Cyp12e1* em larvas expostas a meios de cultura à base de *Opuntia* e *Cereus*. Nessa seção, reunimos os resultados comparativos da quantificação da expressão de cada gene entre as linhagens (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) e, em seguida, a variação na resposta de cada linhagem aos diferentes meios de cultura (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

4.4.1. Variação transcricional da resposta às dietas entre espécies

O padrão de expressão dos genes *Cyp18a1*, *Cyp12d1*, e *Cyp12e1* foi variável entre as linhagens quando expostas aos dois tipos de meios de cultura (Figura 8). Nos dados de RNA-seq utilizados na escolha dos genes candidatos, o gene *Cyp18a1* se encontrou diferencialmente expresso na comparação entre *D. m. wrigleyi* (superexpresso) e *D. m. mojavensis*. A análise de quantificação relativa (Figura 8A e 8D), por outro lado, revelou diferença significativa apenas entre *D. m. wrigleyi* e *D. m. sonorensis* (Kruskal-Wallis, $p=0,0415$) quando criadas em meio à base de *Opuntia* (Figura 8A).

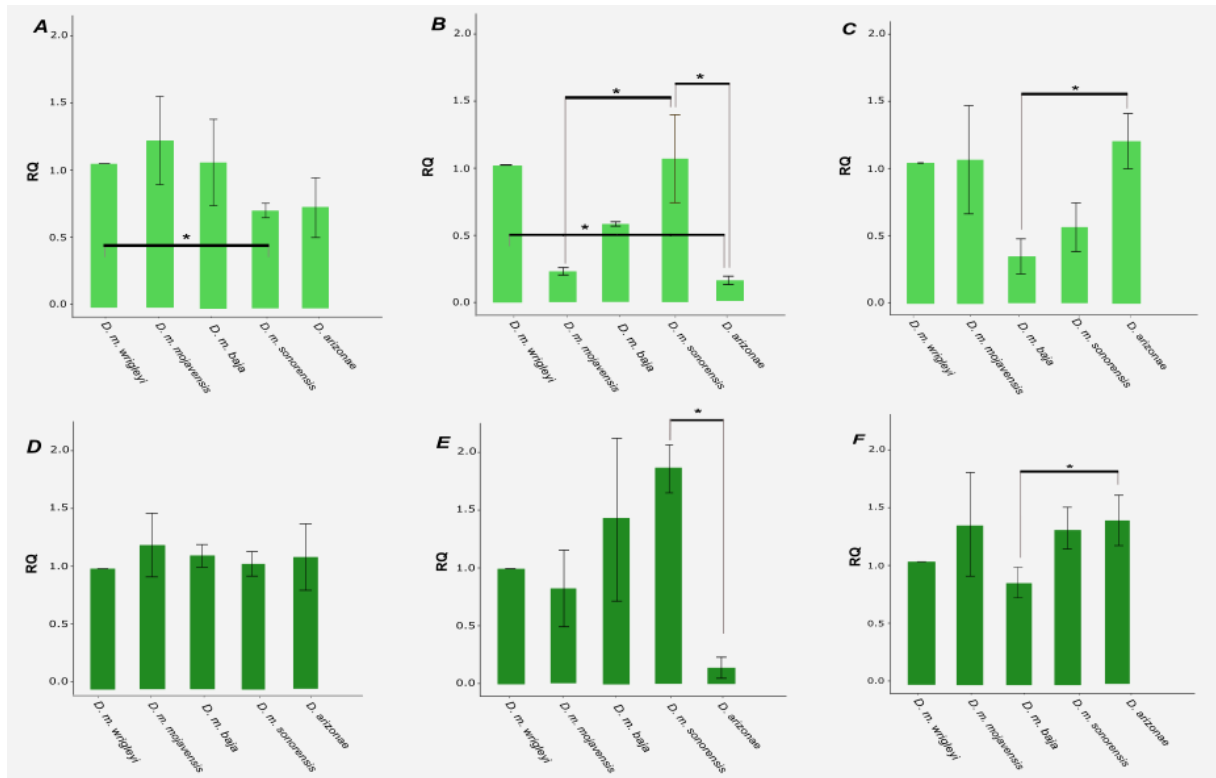


Figura 8. Quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes *Cyp* em larvas expostas a meios de cultura à base de cactos *Opuntia* (verde claro) e *Cereus* (verde escuro). A linhagem *D. m. wrigleyi* é amostra referência (RQ=1). A-F Teste Kruskal-Wallis para diferenças na expressão dos genes entre espécies/subespécies (*, $p < 0,05$). Comparações entre linhagens na dieta à base de *Opuntia*: **A. *Cyp18a1*, entre *D. m. wrigleyi* e *D. m. sonorensis*, $p > 0,05$; **B. *Cyp12d1***, entre *D. arizonae* e *D. m. wrigleyi*, *D. arizonae* e *D. m. sonorensis*, e entre *D. m. mojavenensis* e *D. m. sonorensis*. **C. *Cyp12e1***, *D. arizonae* e *D. m. baja*, $p < 0,05$. Comparações entre linhagens no tratamento com *Cereus*: **D. *Cyp18a1***, $p > 0,05$; **E. *Cyp12d1***, entre *D. arizonae* e *D. m. sonorensis*; **F. *Cyp12e1***, *D. arizonae* e *D. m. baja*.**

A expressão do gene *Cyp12d1* se mostrou a mais variável entre as linhagens testadas (Figura 8B e 8E). Nos dados de RNA-seq o gene se encontrava superexpresso em *D. m. wrigleyi* em todas as comparações, variando apenas o nível de expressão (Tabela suplementar 1). Em meio de *Opuntia* (Figura 8B), *D. m. wrigleyi*, subespécie que utiliza o cacto *Opuntia* e *D. m. sonorensis*, adaptada ao uso de cacto colunar, apresentaram nível de expressão similar entre si ($p < 0,05$), e diferiram significativamente de *D. arizonae* (Kruskal-Wallis, $p = 0,0020$). Diferença significativa também foi observada na expressão do *Cyp12d1* na subespécie adaptada ao uso de cacto barril *D. m. mojavenensis* e *D. m. sonorensis* (Kruskal-Wallis, $p = 0,0347$). Em meio à base de *Cereus* (Figura 8E), a expressão do gene se mostrou significativamente maior na subespécie *D. m. sonorensis* apenas em comparação à *D. arizonae* (Kruskal-Wallis, $p = 0,0016$).

Os resultados da quantificação relativa de *Cyp12e1* (Figura 8C e 8F) diferiu dos outros genes quantificados. Notavelmente, quando exposta ao meio de *Opuntia* (Figura 8C), a espécie irmã *D. arizonae* apresentou maior diferencial de expressão entre as linhagens e diferiu

significativamente de *D. m. baja* (Kruskal-Wallis, $p= 0,0091$). Apesar de nos dados de RNA-seq o gene se apresentar superexpresso apenas em *D. m. sonorensis* (Tabela suplementar 1), quando exposta ao meio de *Opuntia* essa subespécie e *D. m. baja* mostraram a menor expressão desse gene quando comparadas às demais. O mesmo ocorreu após a exposição ao meio de *Cereus* (Figura 8F), a maior diferença significativa foi observada entre *D. m. baja* e *D. arizonae* (Kruskal-Wallis, $p=0,0495$).

4.4.2. Variação transcricional da resposta de cada espécie às diferentes dietas

A resposta transcricional das linhagens testadas variou em relação ao cacto ao qual foram expostas (Figura 9A-C), conforme resultados do teste Mann-Whitney aplicado para os três genes quantificados. De modo geral, a expressão de ambos os genes foi maior em resposta ao meio de *Cereus* quando comparado ao meio *Opuntia*. Comparando a resposta de cada subespécie e espécie aos diferentes meios de cultura, o gene *Cyp18a1* (Figura 9A) apresentou expressão diferencial significativa apenas em *D. m. sonorensis* (Mann-Whitney, $W=16$, $p\text{-value} = 0,02857$); com expressão aumentada em resposta ao meio de *Cereus*.

Os genes da família *Cyp12* apresentaram padrão similar de variação da expressão entre as subespécies adaptadas ao uso de cactos colunares. O gene *Cyp12d1* (Figura 9B) apresentou expressão aumentada em resposta ao meio de *Cereus* em *D. m. baja* (Mann-Whitney, $W = 16$, $p\text{-value} = 0,02857$), *D. m. sonorensis* (Mann-Whitney, $W = 16$, $p\text{-value} = 0,02857$) e em *D. m. mojavenensis* (Mann-Whitney, $W = 16$, $p\text{-value} = 0,02857$). Um padrão similar foi observado no gene *Cyp12e1* (Figura 9C), o qual revelou maior expressão em *D. m. baja* (Mann-Whitney, $W = 16$, $p\text{-value} = 0,02857$) e *D. m. sonorensis* (Mann-Whitney, $W = 16$, $p\text{-value} = 0,02857$) quando expostas ao meio *Cereus*.

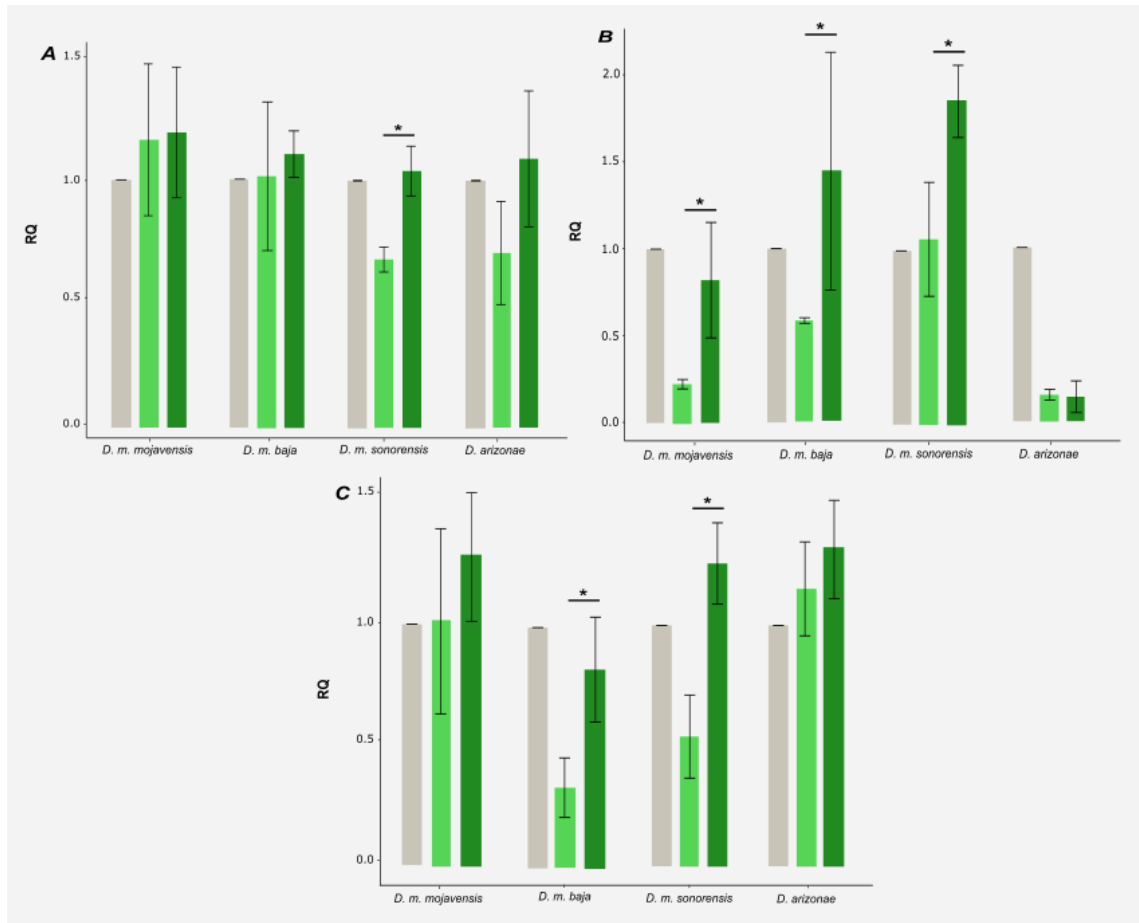


Figura 9. Quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes *Cyp* em larvas de *D. mojavenensis* e *D. arizonae* em relação a *D. m. wrigleyi* (cinza) expostas a meios à base de *Opuntia* (verde claro) e *Cereus* (verde escuro). Diferenças significativas em cada linhagem quando exposta a diferentes meios (Teste Mann-Whitney, *, $p < 0.05$). **A.** *Cyp18a1*, *D. m. sonorensis*. **B.** *Cyp12d1*, *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*. **C.** *Cyp12e1*, *D. m. mojavenensis*, *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*.

5. DISCUSSÃO

As análises transcriptômicas realizadas neste trabalho corroboram a divergência genética entre as subespécies de *D. mojavenensis* (Matzkin, 2006; Khallaff *et al.* 2020). Há maior divergência de expressão gênica entre *D. m. wrigleyi* e as subespécies da parte sul da distribuição da espécie (Baixa Califórnia, EUA e México) do que com aquela do norte (Deserto de Mojave, Califórnia, EUA). A maior semelhança entre os dois pares de subespécies (*D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavenensis* e *D. m. baja*-*D. m. sonorensis*) em relação aos DEGs (128) nos transcriptomas larvais das quatro subespécies de *D. mojavenensis* concorda com as relações de parentesco estimados a partir dos 2.043 genes BUSCO compartilhados que agrupam *D. wrigleyi*-*D. m. mojavenensis* e *D. m. baja*-*D. m. sonorensis* em outro estudo (Matzkin, 2006; Oliveira *et al.*, não

publicado). Concordantemente, as redes de PPI propostas a partir de dados de DEGs para cada comparação também repletiram essas relações filogenéticas.

As análises dos dados transcriptômicos de larvas, especialmente revelaram maior similaridade entre os DEGs das comparações envolvendo *D. m. wrigleyi* e as subespécies *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*, adaptadas ao uso de cactos colunares do gênero *Stenocereus*. Concordantemente, as redes de PPI propostas para cada comparação foram congruentes com o padrão de divergência observado nos dados transcriptômicos. As redes PPI têm papel fundamental em processos biológicos dos seres vivos (Lu *et al.* 2020). Desta maneira, oferecem um panorama comparável de relações entre proteínas comuns ou não a diferentes populações relacionadas. As redes aqui propostas, sobretudo para os dados de DEGs entre larvas das comparações *D. m. wrigleyi-D. m. baja* e *D. m. wrigleyi-D. m. sonorensis* revelaram maior similaridade entre si (em número de genes e padrão de expressão gênica) quando comparadas àquela proposta para *D. m. mojavenensis*. Este resultado é concordante com a menor divergência encontrada entre DEGs em larvas destas subespécies. Além disso, oferece informações sobre variações em redes metabólicas dentre as populações adaptadas ao uso de diferentes cactos colunares (cacto barril, cacto agria e cacto tubo), tendo em vista o padrão distinto da rede proposta para os dados de DEGs em *D. m. mojavenensis*.

As comparações de redes PPI possibilitaram a compreensão de relações entre proteínas codificadas por genes HLAU. No geral, as redes reuniram as famílias gênicas em *clusters*. Foram observados agrupamentos de genes relacionados à diferentes etapas do uso do hospedeiro. Estes resultados estão de acordo com o que se conhece sobre as cadeias metabólicas envolvendo genes HLAU (Misra *et al.* 2011; Markow, 2019). O agrupamento observado de interações entre as OBP e os OR, associadas à fase de localização do hospedeiro, se justifica pela ação conjunta dessas proteínas no sistema quimiosensorial das moscas (Anholt *et al.* 2020; Matsuo *et al.* 2007). As OBP atuam como intermediárias entre o ambiente e os OR (Leal *et al.* 2005) de modo que compostos odorantes que chegam por meio das sensilas são primeiramente solubilizados pelas OBP e depois transportados pela linfa sensilar até os ORs ligados à membrana (Leal *et al.* 2013). Portanto, essas famílias gênicas estão diretamente relacionadas com a identificação dos cactos hospedeiros pelas moscas, de modo que variações estruturais ou de expressão nesses genes podem justificar adaptações a diferentes hospedeiros.

Adaptações que propiciaram sobrevivência em ambientes quimicamente desafiadores como os cactos podem ter deixado assinaturas nos genomas e transcriptomas das subespécies de *D. m. mojavenensis*. Os CoV emitidos pelos cactos são o principal vestígio utilizado pelas moscas, em especial as fêmeas, na identificação do hospedeiro (Crowley-Gall *et al.* 2016), processo

caracterizado como localização (Markow, 2019). Estudos em *D. melanogaster* apontam que alguns ORs guardam informações importantes do ponto de vista ecológico (Dekker *et al.* 2006; Linz *et al.* 2013). Adaptações olfatórias das populações de *D. mojavensis* foram anteriormente descritas em estudos de eletrofísica e ensaios comportamentais (Date *et al.* 2013) apontando preferências das subespécies de moscas por compostos voláteis característicos de seus cactos hospedeiros. Análises transcriptômicas das quatro subespécies, demonstraram expressão diferencial de ORs entre as populações, sendo que *D. m. mojavensis* apresentou superexpressão dos genes *Or67b* e *Or71a*, expressos em neurônios excitáveis por compostos aromáticos (Crowley-Gall *et al.* 2016). Dentre as comparações de DEGs analisadas neste trabalho, identificamos que *D. m. mojavensis* reuniu a maior proporção de ORs diferencialmente expressos em cabeça de fêmeas. Dentre eles, o gene *Or67a* se encontra superexpresso nesta população, bem como também identificado por Crowley-Gall *et al.* (2016). Este gene também foi reportado como responsável à exposição de *D. melanogaster* a compostos aromáticos (Mansourian; Stensmyr, 2015). Adicionalmente, a *Opb19b*, associado à variação do comportamento de resposta a compostos aromáticos em linhagens selvagens de *D. melanogaster* (Arya *et al.* 2010) também se encontra superexpresso apenas em *D. m. mojavensis*. Concordantemente, dentre os cactos hospedeiros, o cacto barril (*Ferocactus cylindraceus*) utilizado por *D. m. mojavensis*, foi relatado como o mais enriquecido em compostos aromáticos dentre os cactos colunares hospedeiros utilizados pela espécie (Date *et al.* 2013). Portanto, alterações no sistema quimiosensorial parecem influenciar a localização específica do hospedeiro em *D. mojavensis*.

Estudo recente demonstrou que, dentro do grupo *repleta*, algumas OBPs apresentam marcas de seleção positiva e apresentam diferentes padrões de expressão entre as espécies cactófilas (Rondón *et al.* 2022). Esses autores também identificaram um caráter pleiotrópico da família gênica (Arya *et al.* 2010), além da expressão de alguns genes *Obp* em órgãos fora da cabeça, como glândulas acessórias e ovários (Shorter *et al.* 2016). O gene *Obp19c*, por exemplo, é expresso também ovários e está implicado na oviposição e no comportamento pós-cópula (Arya *et al.* 2010). Tem-se hipotetizado que, junto a outras OBPs presentes no líquido seminal, este gene pode estar relacionado com a transferência de esperma durante a cópula e o estímulo da oviposição em *D. melanogaster* (Findlay *et al.* 2008; Mokashi *et al.* 2023). Nossos resultados revelaram que este gene se encontra superexpresso na cabeça de todas as subespécies adaptadas ao uso de cactos colunares, sendo que em *D. m. mojavensis* chega a ter expressão até 6 vezes maior quando comparada a *D. m. wrightleyi*. Dessa forma, a superexpressão do gene *Obp19c* poderia influenciar a reprodução das moscas. Ainda, considerando que a reprodução e

oviposição ocorrem durante a fase de uso do hospedeiro (Markow *et al.* 2019), entende-se que os sistemas quimissorial e de metabolismo e destoxificação atuam conjuntamente na avaliação dos compostos químicos tóxicos dos cactos.

As famílias gênicas associadas ao metabolismo e destoxificação foram os *clusters* mais robustos nas redes PPI. Em todas as redes propostas para dados de larvas, foram observadas interações entre os agrupamentos de proteínas CYP e GST. Estas interações têm fundamento tendo em vista que alguns citocromos e glutatonas têm sido relacionados com as fases iniciais da destoxificação de xenobióticos e de compostos endógenos reativos (metabólitos secundários). Na fase I, as proteínas CYP oxidam as substâncias químicas, aumentando sua polaridade. Posteriormente, na fase II proteínas GST conjugam-se às substâncias oxidadas, formando conjugados glutatonas os quais são menos tóxicos e mais facilmente excretados (Misra *et al.* 2011). As interações físicas e funcionais entre proteínas apresentadas nas redes PPI oferecem, portanto, evidências das relações entre famílias gênicas envolvidas na destoxificação, processo diretamente impactado durante a mudança de hospedeiro em *Drosophila* cactófilas.

A exposição de *D. mojavensis* a cactos hospedeiros alternativos relevou que o gene *GstD1* está implicado na adaptação à planta hospedeira (Matzkin, 2006). Análises da dinâmica evolutiva do gene, suportam a concepção da existência de quatro subespécies de *D. mojavensis* diferenciadas geneticamente. O padrão filogeográfico deste gene indica que as populações de Mojave e Santa Catalina compõem um *cluster* separado daquele composto pelas populações da Baja Califórnia e Sonora (Matzkin *et al.* 2008). A partir destes resultados, López-Olmos *et al.* (2017) realizaram análises de evolução molecular do gene em populações cactófilas nas quais não indentificaram alterações de aminoácidos nas sequências de espécies adaptadas a diferentes cactos hospedeiros. No entanto, pontuam que espécies do grupo *D. anceps* apresentam sequências de aminoácidos idênticas ao passo que são associadas ao uso de cacto palmado ou colunar. Concluem, portanto, que se *GstD1* está implicada na adaptação de *D. mojavensis* aos seus hospedeiros, isso se deve mais a variações nos níveis de expressão do gene (Matzkin 2006) do que a mudanças estruturais (Lopez-Olmos *et al.* 2017). Em nossas análises, o gene *GstD1* é diferencialmente expresso apenas nas comparações envolvendo *D. m. baja* (subexpresso) e *D. m. sonorensis* (superexpresso). Na rede PPI proposta para DEGs em larvas de *D. m. sonorensis* a proteína GSTD1 se encontra interagindo com outras proteínas da mesma família também superexpressas apenas nessa subespécie (GI23194 e GI23193). A variação de expressão do gene *GstD1* e outras glutatonas pode, portanto, estar relacionada mais especificamente com a

adaptação a hospedeiros colunares distintos, neste caso, os cactos agria (*S. gummosus*) e tubo de órgão (*S. thurberi*).

As espécies de cactos hospedeiros de *Drosophila* cactófilas apresentam composição química variada entre si, e até mesmo entre fases do processo de decomposição (Wright; Setzer, 2014). Estudos dos compostos químicos em diferentes fases de decomposição de *S. thurberi* utilizado por *D. m. sonorensis* mostraram que quando em apodrecimento inicial apresenta 84,8% de concentrações de ácido carboxílico e, que, em apodrecimento tardio reduz a 3,8%. Além disso, foi observada alteração nos subprodutos do metabolismo das leveduras, principalmente no conjunto de ácidos (Wright; Setzer, 2014). Substâncias hidrofóbicas como compostos fenólicos e alcanos somaram 48% da composição deste cacto e parecem ser produtos da degradação do cacto e não produto da fermentação pelas leveduras. Em análise dos compostos voláteis dos hospedeiros de *D. mojavensis*, Date *et al.* (2013) identificaram preferências das subespécies *D. m. mojavensis* e *D. m. wrigleyi* pelas fases iniciais de decomposição do cacto hospedeiros. Identificaram, ainda, que as misturas voláteis do cacto palmado (*Opuntia*) e de agria (*S. gummosus*) foram principalmente iguais em número de ésteres e compostos aromáticos, enquanto o cacto barril (*Ferocactus spp.*) foi mais enriquecido em compostos aromáticos e o tubo de órgão (*S. thurberi*) em ésteres (Date *et al.* 2013). Assim, considerando que os cactos colunares como o tubo de órgão têm alta concentração de compostos hidrofóbicos, é possível que isso esteja refletido na maior superexpressão como as GSTs em *D. m. sonorensis* a qual o utiliza como principal hospedeiro na natureza.

As enzimas CYP também têm um papel importante no processamento de diferentes substâncias tóxicas produzidas pelo hospedeiro (metabólitos secundários) ou presentes no ambiente em que ele se encontra (compostos xenobióticos) (Feyereissen, 1999; Anholt 2020). Em nossas análises de DEGs em larvas, tomando como referência *D. m. wrigleyi*, na comparação envolvendo *D. m. baja* houve maior número de DEGs, no entanto o diferencial de expressão foi em geral baixo. Por outro lado, na comparação envolvendo *D. m. sonorensis*, por sua vez, o número de genes *Cyp* diferencialmente expressos estiveram em menor quantidade, mas com graus maiores de diferencial de expressão. Considerando o papel importante desses genes na destoxificação de compostos tóxicos, nossos resultados sugerem que a expressão dos *Cyps* seja requerida em um contexto de toxicidade maior, como é o caso dos cactos colunares (Matzkin, 2014; De Panis *et al.* 2016, 2022; Diaz *et al.* 2018).

Respostas transcricional de *D. mojavensis* e *D. arizonae* a cactos alternativos

Estudos genômicos relevaram que genes associados a destoxificação estão sob forte pressão seletiva, possivelmente como uma resposta evolutiva à interação com hospedeiros tóxicos (Matsuo *et al.* 2007; Hungate *et al.* 2013). Em *Drosophila* cactófilas, análises transcriptômicas os apontam como parte de um sistema de repostas das moscas aos compostos químicos tóxicos produzidos, sobretudo, pelos cactos colunares (Matzkin, 2014; De Panis *et al.* 2016, 2022; Diaz *et al.* 2018). Neste trabalho, quantificamos a expressão de três genes *Cyp* em larvas expostas a meios de cultura à base de um representante de cacto palmado (*Opuntia ficus-indica*) e de um cacto colunar (*Cereus hidmannianus*).

Dentre os fatores que moldam as relações entre insetos e plantas hospedeiras, as defesas químicas produzidas pelas plantas se destacam. Substâncias tóxicas como metabólitos secundários tem sido apontada como uma das principais forças direcionadoras da adaptação ao hospedeiro (Rosenthal; Berenbaum, 2012; Padró *et al.* 2018). Estes compostos classificados como aleloquímicos, são produzidos pelos cactos hospedeiros e são capazes de alterar a fisiologia das moscas (Whittaker; Feeny, 1971). Portanto, a adaptação *Drosophila* aos seus cactos hospedeiro depende de mecanismos neutralizadores de compostos químicos produzidos pelas plantas (Anhault, 2020). Com a eclosão dos ovos, as larvas entram em contato direto com o tecido necrótico, por vezes ingerindo parte dele (Coleman *et al.* 2018; Markow *et al.* 2019). Sendo assim, é esperado que as famílias gênicas relacionadas ao metabolismo e a destoxificação desempenhem um papel importante neste estágio do ciclo de vida. Nossos resultados mostraram que os genes associados ao uso do hospedeiro foram os mais abundante entre os DEGs em larvas cultivadas em meio de cultura à base de fubá-ágar. Dentre os DEGs associados a etapa de uso do hospedeiro, observamos uma proporção maior de genes da numerosa família CYP. Os genes desta família, de modo geral, codificam enzimas que catalisam reações oxidativas dependentes de heme. A partir desta reação, o composto poderá ser metabolizado mais facilmente por outras moléculas. Além desta função básica e conservada em diferentes táxons, outras funções já foram relatadas para diferentes genes desta família (Feyereseien, 1999; Good *et al.* 2014), variando entre síntese e degradação de hormônios, ácidos graxos, ferormônios e desintoxicação de fitoquímicos e inseticidas (Mizutani; Ohta 2010; Bak *et al.* 2011; Feyereseien 2011).

A participação do gene *Cyp18a1* na síntese e degradação de ecdisteróides foi relatada como fundamental no processo de metamorfose larval de *D. melanogaster* (Guittard *et al.* 2011). Este gene atua catalizando a conversão de 20-hidroxiecdisona (20E) de modo a diminuir quantidade de hormônio circulante em determinados momentos do ciclo de vida. Em *D. melanogaster*, a inativação de *Cyp18a1* por RNAi resultou em um prolongamento do estágio

larval e em letalidade pupal (Guittard *et al.* 2011), o que sugere que ambos aumento e diminuição de hormônios circulantes são essenciais para desenvolvimento adequado das moscas. Coerentemente, a rede PPI proposta para a comparação *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis* revelou interação entre as proteínas 20E e CYP18A1. A proteína CYP18A1 também foi determinante para a proposição do *cluster* de CYPs nesta rede e também na rede proposta para os dados de DEGs em cabeça, na comparação *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* (Figura 5B). Em ambas as redes a referida proteína ocupa uma posição central, apresentando grande número de interações com outras proteínas CYP o que a caracteriza como uma proteína *hub*. Essa classe de proteínas tem sido reportada como mais essencial do que aquelas que não são *hub* (Zhang 2013), o que é coerente com o papel determinante que o gene *Cyp18a1* tem no processo de metamorfose em *Drosophila*.

Ao quantificar a expressão deste gene em larvas expostas a meios de cultura a base de cactos alternativos identificamos diferença significativa apenas entre *D. m. wrigleyi* e *D. m. sonorensis*, quando expostas ao meio à base do cacto *Opuntia*. Nesta comparação, o gene se encontrou superexpresso em *D. m. wrigleyi*. Embora não significantes as diferenças no meio de cultura à base do cacto *Cereus*, os padrões de expressão do gene *Cyp18a1* sugerem aumento de expressão nas subespécies adaptadas ao uso de cactos colunares. Quando comparadas em relação a ambos os meios de cultura, apenas a subespécie *D. m. sonorensis* revelou diferença significativa na expressão do gene *Cyp18a1*, tendo a expressão aumentada em resposta ao meio de cultura à base de *Cereus*. O cacto *Cereus hidmaniannus* (K.) Schum., é um cacto colunar nativo da América do Sul (Hughes *et al.* 1980) porém com incidência invasiva em países da Europa, África, Ásia e Oceania (Santos *et al.* 2021). Cladódios de *Cereus* foram quimicamente caracterizados contendo 65% hidrocarbonos, 10% ésteres, 6% esteróis, 5% de ácidos graxos e alcanos (Hughes *et al.* 1980), além da presença de ácidos orgânicos. Esta composição química é mais similar à dos cactos colunares utilizados por *D. mojanvesis* do que a de *Opuntia*, com algumas diferenças. Assim, salvaguardando as diferenças entre os ambientes em que se encontram os cactos *Cereus* (América do Sul) e os cactos colunares (América do Norte) utilizados por *D. mojavensis*, hipotizamos que a exposição de *D. mojavensis* a este novo hospedeiro poderia provocar a expressão de genes relacionados ao metabolismo e a detoxificação de compostos químicos. O aumento da expressão de *Cyp18a1* em resposta a este cacto colunar, sugere que a expressão do gene seja requerida quando a mosca se encontra em um ambiente com maior quantidade de compostos tóxicos, ou ao menos a compostos diferentes aos quais esteja adaptada.

A família gênica dos CYP está em rápida evolução, tendo sido reportados sucessivos eventos de duplicação e diversificação (Nelson; 2009; Good *et al.* 2014; Harrop *et al.* 2014). O gene *Cyp12d1*, e seu parálogo *Cyp12d3*, são um dos exemplos já descrito de duplicação nesta família (McDonnell *et al.* 2012). Diversos estudos apontam que o gene *Cyp12d1* é diferencialmente expresso em resposta a compostos xenobióticos como inseticidas DDT, (Festucci-Buselli *et al.* 2005), phenobarbital (Sun *et al.* 2006) e compostos alcalóides como a cafeína (Willoughby *et al.* 2006). Este gene parece atuar, portanto, como uma primeira resposta geral a compostos químicos tóxicos, sendo assim um bom marcador de diferencial de expressão em estudos sobre uso do hospedeiro. Dentre os DEGs, o gene *Cyp12d1* se encontrou superexpresso em *D. m. wrigleyi* em todas as comparações com demais subespécies. Quando em *Opuntia*, a expressão do gene *Cyp12d1* foi maior em *D. m. wrigleyi* a qual utiliza principalmente cacto palmado na natureza, a qual diferiu significativamente da espécie *D. arizonae* (subexpresso). Este resultado sugere que o gene possa se comportar de maneira diferente em uma espécie generalista, ou seja, que possui adaptações ao uso de cactos com variadas composições químicas. Por outro lado, quando expostas ao meio de *Cereus*, as subespécies adaptadas aos cactos colunares em seus ambientes naturais, revelaram um aumento significativo da expressão deste gene, com exceção de *D. arizonae*. Os resultados da análise de RQ para este gene confirmou a hipótese de que os compostos químicos do cacto *Cereus*, que não faz parte do nicho ecológico das linhagens analisadas, parecem atuar como *triggers* no aumento da expressão deste gene o qual possivelmente é recrutado para a oxidação destas substâncias.

Um padrão similar de variação da expressão foi percebido nas análises do gene *Cyp12e1*. Em meio de cultura padrão, à base de fubá-ágar, esse gene se encontrava diferencialmente expresso apenas nas comparações envolvendo *D. wrigleyi* com as subespécies *D. m. baja* (subexpresso) e *D. m. sonorensis* (superexpresso). Os dados de RQ apoiam os dados de RNA-seq, tendo havido aumento significativo da expressão deste gene em resposta ao meio de *Cereus*, apenas em *D. m. baja* e *D. m. sonorensis*. Apesar de não haver estudos específicos para este gene, é sabido que de modo geral, as enzimas da família *Cyp12* estão associadas a processos metabólicos e de destoxificação (McDonnell *et al.* 2012). Nossos resultados reforçam a hipótese de que variações na expressão de genes associados ao metabolismo e destoxificação podem refletir a história evolutiva de *Drosophila* cactófilas e ajudar a contar a história evolutiva de *D. mojavensis*.

CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, o avanço nas técnicas de sequenciamento e análise de transcriptomas tem permitido a exploração mais aprofundada das bases genéticas da adaptação em *Drosophila*. No presente trabalho avaliamos dados de transcriptômicos de larvas e cabeças, das quatro subespécies de *D. mojavensis*, propuzemos redes PPI e quantificamos a expressão dos genes *Cyp 18a1*, *Cyp12d1* e *Cyp12e1* em moscas expostas a meios de cultura à base de cacto palamado e colunar. De modo geral, as análises apoiaram a hipótese de que as subespécies de *D. mojavensis* apresentam adaptações aos seus cactos hospedeiros primários e que elas deixaram marcas desse processo no transcriptoma. Nossos resultados oferecem novos indícios da influência dos genes HLAU como bases genéticas dessas adaptações, mais especificamente aqueles associados à etapa de uso do hospedeiro como os genes *Cyp*.

Em síntese, as análises sobre as respostas transcriptômicas a dietas alternativas de cactos em *D. mojavensis* permitiram concluir que:

1. A divergência de expressão em genes HLAU e entre as redes PPI desses genes é menor entre subespécies adaptadas ao uso de cactos hospedeiros do gênero *Stenocereus* (*D. m. baja* e *D. m. sonorensis*);
2. Redes PPI de genes HLAU oferecem evidências de interações entre proteínas codificadas por famílias gênicas distintas como CYPs e GSTs, associadas ao metabolismo e detoxificação, e OBPs e ORs, relacionados com sistema quimiossensorial.
3. Variações na expressão dos genes associados ao metabolismo e detoxificação *Cyp18a1*, *Cyp12d1* e *Cyp12e1* indicam que eles são bons candidatos a terem contribuído com a adaptação das subespécies de *D. mojavensis* a hospedeiros distintos.

Em conclusão, nosso trabalho contribui com novos dados acerca da plasticidade transcricional em resposta a novos hospedeiros em *D. mojavensis*. Para uma compreensão mais ampla dessas respostas, se fazem necessárias evidências de variações em características da história da vida das linhagens expostas ao cacto alternativo, além da investigação dos fatores associados à regulação da expressão dos genes candidatos e de outros relacionados a cadeia metabólica da detoxificação.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, C.W; MATZKIN, L.M. Genomic analysis of the four ecologically distinct cactus host populations of *Drosophila mojavensis*. **BMC Genomics**. 20:732, 2019.
- ANHOLT, R. R. H. Chemosensation and evolution of *Drosophila* host plant selection. **iScience**. 24;23(1):100799. doi: 10.1016/j.isci.2019.100799, 2020.
- ARAKAKI, M et al. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. **Proc Natl Acad Sci USA**. 108:8379–8384, 2011.
- ARYA, G. H et al. Natural variation, functional pleiotropy and transcriptional contexts of odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. Dec;186(4):1475-85. doi: 10.1534/genetics.110.123166, 2010.
- BÄCHLI, G. **TaxoDros**: Database on the Taxonomy of Drosophilidae. Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch>. Acesso em: 01 nov. 2024, 2018.
- BAK, S et al. Cytochromes p450. **Arabidopsis Book**. 9:0144. doi: 10.1199/tab.0144. 2011.
- BARRIOS-LEAL, D. Y et al. A holocenic and dynamic hybrid zone between two cactophilic *Drosophila* species in a coastal lowland plain of the Brazilian Atlantic Forest. **J Evol Biol**. 34(11):1737-1751. doi: 10.1111/jeb.13934, 2021.
- BECERRA, J. X. Insects on plants: Macroevolutionary chemical trends in host use. **Science**, 276, 253–256. 10.1126/science.276.5310.253, 1997.
- BENOWITZ, K. M et al. Contributions of cis- and trans-Regulatory Evolution to Transcriptomic Divergence across Populations in the *Drosophila mojavensis* Larval Brain. **Genome Biology and Evolution**. 12:1407–18, 2020.
- BERNAYS, E.; GRAHAM, M. On the evolutionary of host specificity in phytophagous arthropods. **Ecology Society of America. Ecology**. 69(4), 885-892, 1988.
- BORGONOVE, C. M et al. Identification of differentially expressed genes in female *Drosophila antonietae* and *Drosophila meridionalis* in response to host cactus odor. **BMC Evol Biol**. 2;14:191. doi: 10.1186/s12862-014-0191-2, 2014.
- BREITMEYER, C. M., MARKOW, T. A. Resource availability and population size in cactophilic *Drosophila*. **Funct. Ecol**. 12, 14-21. 10.1046/j.1365-2435.1998.00152.x, 1998.
- LANDRY, C. R.; AUBIN-HORTH, N. **Ecological Genomics: Ecology and the Evolution of Genes and Genomes**, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Science, 2014.
- CARARETO, C. M. A.; HERNANDEZ, E. H.; VIEIRA, C. Genomic regions harboring insecticide resistance-associated *Cyp* genes are enriched by transposable element fragments carrying putative transcription factor binding sites in two sibling *Drosophila* species. **Gene**. 537:93–9, 2014.
- CHEN, Y.; AMREIN, H. Ionotropic Receptors Mediate *Drosophila* Oviposition Preference through Sour Gustatory Receptor Neurons. **Current Biology**. 27:2741-2750.e4, 2017.
- CHUNG, H et al. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2009;106:5731–6.

- COLEMAN, J. M et al. Behavioral evolution accompanying host shifts in cactophilic *Drosophila* larvae. **Ecol Evol.** 8(14):6921-6931. doi: 10.1002/ece3.4209. 2018
- CROWLEY-GALL, A et al. Population differences in olfaction accompany host shift in *Drosophila mojavensis*. **Proc R Soc B.** 283:20161562, 2016.
- DABORN, P. J. et al. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. **Insect Biochem Mol Biol.** 37(5):512-9. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.02.008, 2007.
- DANIELSON, P. B.; MACINTYRE, R. J.; FOGLEMAN, J. C. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94:10797-10802, 1997.
- DATE, P. et al. Divergence in olfactory host plant preference in *D. mojavensis* in response to cactus host use. **PLoS One.** 8(7):e70027. doi: 10.1371/journal.pone.0070027. Erratum in: PLoS One. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0090050, 2013.
- DE PANIS, D. et al. Transcriptional responses are oriented towards different components of the rearing environment in two *Drosophila* sibling species. **BMC Genomics.** 16;23(1):515. doi: 10.1186/s12864-022-08745-9, 2022.
- DE PANIS, D. et al. Transcriptome modulation during host shift is driven by secondary metabolites in desert *Drosophila*. **Mol Ecol.** 25:4534–4550, 2016.
- DEKKER, T. et al. Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in *Drosophila melanogaster* sibling, *D. sechellia*. **Curr Biol.** 16(1):101–109, 2006.
- DELPRAT, A.; ETGES, W. J.; RUIZ, A. Reanalysis of polytene chromosomes in *Drosophila mojavensis* populations from Santa Catalina Island, California, USA. **Drosoph Inf Serv.** 97:53–57, 2014.
- EDWARDS, E. J.; NYFFELER, R.; DONOGHUE, M. J. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **Am J Bot.** 92:1177–1188, 2005.
- ETGES, W. J. et al. Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. III. Life-history divergence in allopatry and reproductive isolation. **Evolution.** 64(12):3549-69. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.01096, 2010.
- ETGES, W. J.; JACKSON, L. L. Epicuticular hydrocarbon variation in *Drosophila mojavensis* cluster species. **Journal of Chemical Ecology**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 2125–2149, 2001.
- FANARA, J. J.; HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. **Evolution** 55:2615-2619, 2001.
- FELLOWS, D. P.; HEED, W. B. Factors affecting host plant selection in desert-adapted cactophilic *Drosophila*. **Ecology** 53: 850-858, 1972.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A. et al. Expression of *Cyp6g1* and *Cyp12d1* in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. **Insect Mol Biol** 14: 69–77, 2005.
- FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annu Rev Entomol.** 44:507-33. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.507, 1999.
- FINDLAY, G. D. et al. Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. **PLoS Biol.** 6(7):e178. doi: 10.1371/journal.pbio.0060178, 2008.

- FOGLEMEN, J. C. et al. The role of phytosterols in host plant selection by cactophilic *Drosophila*. **Lipids**. 1985.
- FOGLEMEN, et al. The molecular basis of adaptation in *Drosophila*: the role of cytochrome P450s. **Evol Biol**. 30:15-77.
- FOGLEMEN, J. C., DANIELSON P.B. Chemical Interactions in the Cactus-Microorganism-*Drosophila* Model System of the Sonoran Desert, **American Zoologist**, v.41, 4. 877–889, <https://doi.org/10.1093/icb/41.4.877>, 2001.
- GAO, L. et al. Xenobiotic responses in insects. **Arch Insect Biochem Physiol**. 109(3):e21869. doi: 10.1002/arch.21869. 2022.
- GARDINER, A. et al. *Drosophila* chemoreceptor gene evolution: selection, specialization and genome size. **Molecular Ecology**, 17, 1648-1657, 2008.
- GEMOVIC, B. et al. Mapping of Protein-Protein interactions: Web-Based resources for revealing interactomes. **Curr. Med. Chem**. doi:10.2174/0929867325666180214113704, 2018.
- GIRALDO-SILVA, L. et al. *Opuntia ficus-indica* Fruit: A Systematic Review of Its Phytochemicals and Pharmacological Activities. **Plants (Basel)**. 12(3):543. doi: 10.3390/plants12030543, 2023
- GIRAUDO, M. et al. Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights. **Pestic Biochem Physiol**. 97(2):115-122. doi: 10.1016/j.pestbp.2009.06.009. 2010.
- GOFF, H. Resistance evolution in *Drosophila*: the case of CYP6G1, 2016.
- GOMEZ-DIAZ, C. et al. The Two Main Olfactory Receptor Families in *Drosophila*, ORs and IRs: A Comparative Approach. **Front Cell Neurosci**. 12:253, 2018.
- GUITTARD, E. et al. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. **Dev Biol**. 349(1):35-45. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.09.023, 2011.
- HARROP et al. Evolutionary Changes in Gene Expression, Coding Sequence and Copy-Number at the *Cyp6g1* Locus Contribute to Resistance to Multiple Insecticides in *Drosophila*. **PLOS ONE** 9(3): e92490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084879>
- HASSON, E. et al. Host Plant Adaptation in Cactophilic Species of the *Drosophila buzzatii* Cluster: Fitness and Transcriptomics. **J Hered**. 110(1):46-57. doi: 10.1093/jhered/esy04, 2019.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T. et al. Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. **New Phytol**. 202:1382–1397, 2014.
- HUGHES, J.; RAMOS, G.; MOYNA, P. Main Components in *Cereus peruvianus* Epicuticular Wax. **Journal of Natural Products**. 43 (5), 564-566. DOI: 10.1021/np50011a005, 1980.
- HUNGATE, E. A. et al. A locus in *Drosophila sechellia* affecting tolerance of a host plant toxin. **Genetics**. 195(3):1063-75. doi: 10.1534/genetics.113.154773, 2013.
- IGLESIAS, P. P. et al. The influence of developmental environment on courtship song in cactophilic *Drosophila*. **J Evol Biol**. 31(7):957-967. doi: 10.1111/jeb.13277, 2018.
- INGLESE, P. et al. Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): International Center for Agricultural

Research in the Dry Areas (ICARDA), 2017.

FOGLEMANN, J. C.; KICHER, H. W. Differential effects of fatty acid chain length on the viability of two species of cactophilic *Drosophila*, **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology**, 83:4, 761-764, [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90724-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90724-3), 1986.

KHALLAF, M. A. et al. Mate discrimination among subspecies through a conserved olfactory pathway. **Sci Adv**. 6(25):eaba5279. doi: 10.1126/sciadv.aba5279. 2020.

KOROTKOVA, N. et al. Cactaceae at Caryophyllales.org – a dynamic online species-level taxonomic backbone for the family. **Willdenowia**, 51(2):251-270. doi: <https://doi.org/10.3372/wi.51.51208>, 2021.

LEAL, W. S. Pheromone reception. **Top. Curr. Chem.** 240:1–36, 2005.

LEAL, W. S. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. **Annual Review of Entomology**. 58:373-391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>, 2013.

LINZ, J. et al. Host plant-driven sensory specialization in *Drosophila erecta*. **Proc. Biol. Sci.** 280:20130626, 2013.

LOPEZ-OLMOS, K.; MARKOW, T. A.; MACHADO, C. A. Evolution of GSTD1 in cactophilic *Drosophila*. **J Mol Evol.** 84:285–294, 2017.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**. 15, 550, 2014.

LUQUE, T.; O'REILLY, D. R. Functional and phylogenetic analyses of a putative *Drosophila melanogaster* UDP-glycosyltransferase gene. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32:1597–604, 2002.

LU, H.; ZHOU, Q.; HE, J. Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. **Sig Transduct Target Ther** 5, 213. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00315-3>, 2020.

LYNE, R. et al. FlyMine: an integrated database for *Drosophila* and *Anopheles* genomics. **Genome Biol.** 8(7):R129. doi: 10.1186/gb-2007-8-7-r129, 2007.

MATZKIN, et al. Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse *Drosophila*. **The Journal of Nutrition**, 141:6, 1127-1133, <https://doi.org/10.3945/jn.111.138438>, 2011.

MACHADO, C. M. et al. Multilocus nuclear sequences reveal intra and interspecific relationships among chromosomally polymorphic species of cactophilic *Drosophila*. **Mol. Ecol.** 16: 3009–3024, 2007.

MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Cactophilic *Drosophila* in South America: A model for evolutionary studies. **Genetica** 126 (1-2):57-75, 2006.

MANSOURIAN, S.; STENSMYR, M. C. The chemical ecology of the fly. **Curr Opin Neurobiol.** 34:95-102. doi: 10.1016/j.conb.2015.02.006. 2015.

MANZUR-VALDESPINO, S. et al. Applications and Pharmacological Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Peel: A Review. **Life (Basel)**.12(11):1903. doi: 10.3390/life12111903. 2022.

- MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. **Evolutionary genetics of reproductive behavior in *Drosophila*: connecting the dots.** *Annu Rev Genet.* 39:263-91. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.112454. 2005.
- MARKOW, T. A. Host use and host shifts in *Drosophila*. **Current Opinion in Insect Science.** 31:139–45, 2019.
- MATEUS, R. P. et al. Developmental and transcriptomal responses to seasonal dietary shifts in the cactophilic *Drosophila mojavensis* of North America. **J Hered.** 7;110(1):58-67. doi: 10.1093/jhered/esy056. 2019.
- MATSUO, T. et al. Odorant binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. **PLoS Biol.** 5:e118. doi: 10.1371/journal.pbio.0050118, 2007.
- MATZKIN, L. M. et al. Functional genomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. **Mol Ecol.** 15(14):4635-43. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03102.x. 2006.
- MATZKIN, L. M.; MARKOW, T. A.; PAWEL, M. Transcriptional differentiation across the four subspecies of *Drosophila mojavensis*, Speciation: natural processes, genetics and biodiversity. New York, **Nova Scientific Publishers**, 2013.
- MATZKIN, L. M. The molecular basis of host adaptation in cactophilic *Drosophila*: molecular evolution of a glutathione S-transferase gene (GstD1) in *Drosophila mojavensis*. **Genetics.** 178(2):1073-83. doi: 10.1534/genetics.107.083287. 2008.
- MATZKIN, L. M. The Molecular Basis of Host Adaptation in Cactophilic *Drosophila*: Molecular Evolution of a Glutathione S -Transferase Gene (GstD1) in *Drosophila mojavensis*. **Genetics.** 178:1073–83, 2008.
- MATZKIN, L. M; MARKOW, T.A. Transcriptional differentiation across the four cactus host races of *Drosophila mojavensis*. In: Michalak P, editor. **Speciation: natural processes, genetics and biodiversity.** Hauppauge: Nova Science Publishers Inc. p. 119–36, 2013.
- MATZKIN, L. M. Population transcriptomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. **Mol Ecol.** 21(10):2428–39, 2012.
- MAUSETH, J. D. Structure-function relationships in highly modified shoots of cactaceae. **Ann Bot.** 98(5):901-26. doi: 10.1093/aob/mcl133. 2006.
- MAUSETH, JD; HALPERIN, E. Hormonal control os organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). **American Journal of Botany**, 62, 869-877, 1975.
- MCDONNELL, C. M. et al. Evolutionary toxicogenomics: diversification of the *Cyp12d1* and *Cyp12d3* genes in *Drosophila* species. **J Mol Evol.** 74(5-6):281-96. doi: 10.1007/s00239-012-9506-3. 2012.
- MISRA, J. R. et al. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. **Genes & Development**, 25(17), 1796–1806. <https://doi.org/10.1101/gad.17280911>. 2011.
- MIZUTANI, M.; OHTA, D. Diversification of P450 genes during land plant evolution. **Annu Rev Plant Biol.** 61:291-315. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112305. 2010.
- MOKASHI, S. S. et al. Pleiotropic fitness effects of a *Drosophila* odorant-binding protein. **G3 Genes/Genomes/Genetics** (Bethesda). 9;13(2):jkac307. doi: 10.1093/g3journal/jkac307. 2023.
- Moreyra, N. N. et al. Phylogenomics provides insights into the evolution of cactophily and host plant shifts in *Drosophila*. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** 2023;178:107653, 2023

- NELSON, D.R. The Cytochrome P450 Homepage. **Hum Genomics** 4, 59. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-1-59>, 2009.
- NEWBY, B. D.; ETGES, W. J. Host preference among populations of *Drosophila mojavensis* (Diptera: Drosophilidae) that use different host cacti. **Journal of Insect Behavior**, v. 11. N. 5. 1998.
- O'GRADY, P. M.; MARKOW T.A, 'Rapid morphological, behavioral, and ecological evolution in *Drosophila*: comparisons between the endemic Hawaiian *Drosophila* and the cactophilic repleta species group', in Rama S. Singh, Jianping Xu, and Rob J. Kulathinal (eds), **Rapidly Evolving Genes and Genetic Systems**. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199642274.003.0018>. 2012.
- OCHOA-ALFARO, A. E. et al. Functional characterization of an acidic SK(3) dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. **Planta**. 235(3):565-78. doi: 10.1007/s00425-011-1531-8. 2012.
- OLIVEIRA, D. C. S. G. et al. Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 64:533–44, 2012.
- PFEILER, E; MARKOW, T. A. Phylogeography of the Cactophilic *Drosophila* and Other Arthropods Associated with Cactus Necroses in the Sonoran Desert. **Insects**. 2(2):218-31. doi: 10.3390/insects2020218. 2011.
- PFEILER, E et al. Genetic, ecological and morphological differences among populations of the cactophilic *Drosophila mojavensis* from southwestern USA and northwestern Mexico, with descriptions of two new subspecies. **Journal of Natural History**. 43:923–38, 2009.
- RAJPUROHIT, S et al. Adaptive dynamics of cuticular hydrocarbons in *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 66– 80, 2017.
- RANE, R. V. et al. Detoxification Genes Differ between Cactus-, Fruit-, and Flower Feeding *Drosophila*. **Journal of Heredity**, v. 110, n. 1, p. 80–91, 2019.
- REED, L. K.; NYBOER, M.; MARKOW, T. A. Evolutionary relationships of *Drosophila mojavensis* geographic host races and their sister species *Drosophila arizonae*. **Mol Ecol**. 16(5):1007-22. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02941.x., 2007.
- RICHMOND, M. P. et al. Genetic differentiation of island populations: geographical barrier or a host switch? **Biol J Linn Soc**. 108:68–78, 2013.
- R'KHA, S.; CAPY, P.; DAVID, J. R. Host-plant specialization in the *Drosophila melanogaster* species complex: a physiological, behavioral, and genetical analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 88(5):1835-9. doi: 10.1073/pnas.88.5.1835, 1991.
- GOOD, R. T. et al. The Molecular Evolution of Cytochrome P450 Genes within and between *Drosophila* Species, **Genome Biology and Evolution**, 6:51118–1134, <https://doi.org/10.1093/gbe/evu083>, 2014.
- RODRIGUEZ-FELIX, A.; CANTWELL, M. Developmental Changes in Composition and Quality of Prickly Pear Cactus Cladodes (Nopalitos) **Plant Foods Hum. Nutr.** 38:83–93. doi: 10.1007/BF01092314. 1988.
- RONDÓN et al. Evolution of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila*. **Front. Ecol. Evol.** v.10, 2022.

- ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites: ecological and evolutionary processes, vol. 2. **Academic Press**, New York, NY, 2012.
- ROSS, C. L.; MARKOW, T. A. Microsatellite variation among diverging populations of *Drosophila mojavensis*. **Journal of Evolutionary Biology**, 19, 1691-1700. 2006.
- RUIZ, A.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M. Evolution of the mojavensis cluster of cactophilic *Drosophila* with descriptions of two new species. *J Hered* 81: 30–42, 1990.
- RUIZ, A.; HEED, W. B. Host-plant specificity in the cactophilic *Drosophila* mulleri species complex. *J. Anim. Ecol.* 57: 237–249, 1988.
- RUIZ, A.; WASSERMAN, M. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. **Heredity** 70: 582-596, 1993.
- SAINT-PIERRE, J.-H. Bernardin de. Paul et Virginie. Tradução de Carlos A. A. Tavares. São Paulo: Editora Nova Alexandria, 2000.
- SANTOS, E. S. et al. *Cereus hildmannianus* (K.) Schum. (Cactaceae): Ethnomedical uses, phytochemistry and biological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.264. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113339>, 2021.
- SHERMAN, B. T. et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). **Nucleic Acids Research**. doi:10.1093/nar/gkac194. 2022.
- SILVA, M. A. et al. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.: A Multi-Benefit Potential to Be Exploited. **Molecules**. 26:951. doi: 10.3390/molecules26040951. 2021.
- SIMON JC, et al. Genomics of adaptation to host-plants in herbivorous insects. **Brief. Funct. Genomics** 14: 413–423, 2015.
- SMITH, G. et al. Transcriptome-wide expression variation associated with environmental plasticity and mating success in cactophilic *Drosophila mojavensis*. **Evolution**. 67(7):1950-63. doi: 10.1111/evo.12082. 2013.
- SNEHA, S.; MOKASHI, et al. Pleiotropic fitness effects of a *Drosophila* odorant-binding protein, **G3 Genes/Genomes/Genetics**, 13:2, jkac307, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac307>, 2023.
- SOTO, I. M. et al. Differences in tolerance to host cactus alkaloids in *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii*. **PLoS One**. 10;9(2):e88370. doi: 10.1371/journal.pone.0088370. 2014.
- SOWMYA, G.; RANGANATHAN, S. Protein-protein interactions and prediction: a comprehensive overview. **Protein Pept. Lett.** 21:779–789, 2014.
- STINTZING, F. C. et al. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia spp.*) Clones. *J. Agric. Food Chem.* 53:442–451. doi: 10.1021/jf048751y. 2005.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Res.** 2019.
- TANG, D. et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. **PLoS One**. 18(11):e0294236. doi: 10.1371/journal.pone.029423. 2023.
- VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila replete* species group (Diptera, Drosophilidae), 1983.

- VOGEL, H. et al. Transcriptome responses in herbivorous insects towards host plant and toxin feeding. In: **Annual Plant Reviews**. John Wiley & Sons, Ltd; 197–233. 10.1002/9781118829783.ch6. 2014.
- WASSERMAN, M.; KRIMBAS, C. B.; POWELL, J. R. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group, *Drosophila* inversion polymorphism, Boca Raton (FL)CRC Press. 455-552. 1992.
- WASSERMAN, M. Evolution of the *repleta* group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3b (Ashburner, M., Carson, H.L. and Thompson Jr., J.N., eds.). **Academic Press**, New York, pp. 61-139. 1982.
- WHITTAKER, R.H; FEENY, P.P. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. **Science**, 171, 757-770, 1971.
- WILLOUGHBY, L. et al. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 36, 934-942, 2006.
- WRIGHT, C. R.; SETZER, W. N. Volatile components of organ pipe cactus, *Stenocereus thurberi* Engelm., growing in the Organ Pipe Cactus National Monument and the Arizona-Sonora Desert Museum. **Am J Essent Oil Nat Prod**. 1:19–22, 2013.
- WRIGHT, C. R.; SETZER, W. N. Characterization of volatiles of necrotic *Stenocereus thurberi* and *Opuntia littoralis* and toxicity and olfactory preference of *Drosophila melanogaster*, *D. mojavensis wrigleyi*, and *D. mojavensis sonorensis* to necrotic cactus volatiles. **Nat Prod Commun**. 9(8):1185-92, 2014.
- WU, C. et al. Insect ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters: Roles in Xenobiotic Detoxification and Bt Insecticidal Activity. **IJMS**. 20:2829, 2019.
- ZHANG, J. Hub. In: DUBITZKY, W.; WOLKENHAUER, O.; CHO, KH.; YOKOTA, H. (eds) **Encyclopedia of Systems Biology**. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_474. 2013.

APÊNDICES

Tabela suplementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
<i>D.m.wrigleyi-D.m.mojavensis</i>					
Aceitação-Localização					
LOC6578143					
Dmoj_GI18246		1.278391993	odorant receptor 22c	0.002842002	0.010584999
LOC6578242	Dmoj_GI19754	2.195189756	general odorant-binding protein 56a	1.12968E-12	2.10156E-11
LOC6578420	Dmoj_GI19873	-1.025063007	(Obp47b) uncharacterized LOC6578420	2.38863E-05	0.000155093
LOC6579244	Dmoj_GI20312	-5.601047167	odorant-binding protein 59 ^a	8.52039E-06	6.18148E-05
LOC6580089	Dmoj_GI18812	2.545673984	putative gustatory receptor 58c	0.006058215	0.020235905
LOC6580687	Dmoj_GI18538	1.026988761	uncharacterized LOC6580687	0.001280185	0.005313236
LOC6580689	Dmoj_GI21083	-2.960527117	general odorant-binding protein 56d	3.58196E-25	1.57595E-23
LOC6586293	Dmoj_GI14312	-2.580204305	ionotropic receptor 21 ^a	2.21501E-45	2.02356E-43
LOC6586417	Dmoj_GI16742	1.039710733	odorant receptor 85c	0.01131158	0.034176573
LOC6575270	Dmoj_GI22059	-4.138230212	putative odorant receptor 83c	0.000788777	0.003499361
Metabolismo-Destoxificação					
LOC26527701	Dmoj_GI26060	1.56755861271137	ATP-dependent translocase ABCB1	8.67861E-14	1.79621E-12
LOC6572619	Dmoj_GI24124	-1.76045000376584	esterase B1	5.61347E-31	3.15741E-29
LOC6572989	Dmoj_GI23261	-2.31844487738921	ABC transporter G family member 7	3.96646E-15	9.2477E-14
LOC6573114	Dmoj_GI23193	1.68000087574624	glutathione S-transferase 1-1	1.56622E-07	1.56219E-06
LOC6573733	Dmoj_GI24725	1.01663983960495	probable cytochrome P450 9f2	4.86372E-35	3.27513E-33
LOC6574189	Dmoj_GI22628	1.31139768778117	UDP-glycosyltransferase UGT5	1.75357E-10	2.56647E-09
LOC6574190	Dmoj_GI22627	1.76336833662108	UDP-glycosyltransferase UGT5	0.000440039	0.002094055
LOC6574192	Dmoj_GI10122	1.79445384244073	UDP-glycosyltransferase UGT5	1.46047E-07	1.45874E-06
LOC6574390	Dmoj_GI10234	2.16272601188076	probable cytochrome P450 313b1	1.957E-16	4.91581E-15
LOC6574518	Dmoj_GI10293	-1.09741152196604	probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659	1.6092E-09	2.07189E-08
LOC6574889	Dmoj_GI22266	1.00673079810822	probable cytochrome P450 313a4	0.003686941	0.013280209
LOC6575132	Dmoj_GI22127	1.63793580511663	cytochrome P450 4c3	0.009502138	0.029525383
LOC6575275	Dmoj_GI10706	1.19553480662309	esterase E4	8.9972E-21	3.04356E-19

Continuação Tabela Suplementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6575470	Dmoj_GI21954	1.65665374646755	probable cytochrome P450 28a5	1.64879E-08	1.89797E-07
LOC6576103	Dmoj_GI14134	1.49369913603969	UDP-glycosyltransferase UGT5	9.49133E-36	6.54491E-34
LOC6576803	Dmoj_GI17573	1.31975985345094	juvenile hormone esterase	2.08359E-21	7.34273E-20
LOC6577726	Dmoj_GI18043	-1.58174678766298	probable cytochrome P450 310a1	3.21379E-20	1.05723E-18
LOC6578256	Dmoj_GI19745	1.00292506821161	probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659	1.1047E-16	2.82438E-15
LOC6578754	Dmoj_GI20052	1.33763872338323	cytochrome P450 9b2	6.96773E-15	1.57383E-13
LOC6578914	Dmoj_GI19388	1.57317054815994	glutathione S-transferase 1	1.89849E-07	1.86034E-06
LOC6578916	Dmoj_GI20122	1.23735894668401	glutathione S-transferase 1	9.36807E-23	3.5831E-21
LOC6578918	Dmoj_GI20124	3.12335523313725	glutathione S-transferase 1	4.78676E-17	1.25975E-15
LOC6579038	Dmoj_GI20196	1.06722778485624	probable cytochrome P450 49a1	3.73682E-06	2.93522E-05
LOC6579097	Dmoj_GI20228	-1.37751627688797	cytochrome P450 6a2	6.45603E-26	2.94901E-24
LOC6579224	Dmoj_GI19238	-1.16372653341322	probable cytochrome P450 6d2	0.002517229	0.009531313
LOC6579307	Dmoj_GI19213	1.89729441559632	UDP-glycosyltransferase UGT5	3.01638E-10	4.27509E-09
LOC6579308	Dmoj_GI19212	-1.66878282664663	UDP-glycosyltransferase UGT5	2.09336E-10	3.02368E-09
LOC6579431	Dmoj_GI19140	1.74156677776456	probable cytochrome P450 4aa1	9.01661E-13	1.69496E-11
LOC6579782	Dmoj_GI20590	-1.05464221001026	uncharacterized LOC6579782	0.013658911	0.040104351
LOC6580326	GI18306	1.39895203139931	probable cytochrome P450 6a21	2.95575E-09	3.72533E-08
LOC6580328	GI18309	2.86949303826197	uncharacterized LOC6580328	9.32975E-18	2.59838E-16
LOC6580345	Dmoj_GI18694	1.25577745374807	cytochrome P450 4e5. Mitochondrial	9.8376E-08	1.00786E-06
LOC6580346	Dmoj_GI20902	1.88396978762536	probable cytochrome P450 4ad1	3.8346E-06	3.00544E-05
LOC6580402	Dmoj_GI18674	1.38825736329582	probable cytochrome P450 4d14	5.13008E-05	0.000311915
LOC6580984	Dmoj_GI21254	-1.10872616909505	cytochrome P450 CYP12A2	1.8037E-17	4.8997E-16
LOC6581812	Dmoj_GI13002	3.13783723404079	probable cytochrome P450 12d1 proximal. mitochondrial	1.6444E-40	1.2749E-38
LOC6583247	Dmoj_GI11544	1.07605124477418	phospholipase B1. membrane-associated	1.27944E-06	1.10018E-05
LOC6585602	Dmoj_GI16116	1.23712974073174	uncharacterized LOC6585602	1.41491E-17	3.86555E-16
LOC6586101	Dmoj_GI10931	1.63289710154754	cytochrome P450 18a1	1.01936E-09	1.33644E-08
LOC6586903	Dmoj_GI18307	1.91271213984587	probable cytochrome P450 6a21	4.1511E-12	7.33242E-11
LOC6572583	Dmoj_GI23493	-1.31245696743390	general odorant-binding protein 84a	0.009698073	0.030030108

Continuação Tabela Suplementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6579322		3.019658338	cytochrome P450 4p1-like	7.55198E-13	1.43088E-11
LOC6580332		1.468802842	probable cytochrome P450 6a14	2.98238E-18	8.55525E-17
<i>D.m.wrigleyi</i> – <i>D.m.baja</i>					
Aceitação-Localização					
LOC26527627	Dmoj_GI25986	-3.885392846	gustatory and pheromone receptor 39a	0.025112641	0.049187098
LOC26527676	Dmoj_GI25664	4.826378168	odorant receptor 13a	5.28239E-15	4.13797E-14
LOC6572583	Obp84a	1.307367679	general odorant-binding protein 84a	0.023973181	0.047222299
LOC6572744	Obp99a	1.250950314	general odorant-binding protein 99a	2.4881E-07	1.07433E-06
LOC6574748	Obp99d	1.703412356	uncharacterized LOC6574748	6.63809E-12	4.29668E-11
LOC6575270	Dmoj_GI22059	-5.058433758	putative odorant receptor 83c	3.49079E-05	0.000117384
LOC6576646	Obp28a	-1.743085851	general odorant-binding protein 28a	2.80747E-44	9.74976E-43
LOC6576652	Dmoj_GI17492	-1.49998553	ionotropic receptor 40a	0.012009596	0.025496812
LOC6578242	Obp47a	1.265342799	general odorant-binding protein 56a	1.6888E-05	5.91852E-05
LOC6578554	Dmoj_GI19601	-1.894958676	odorant receptor 42b	0.00929359	0.020283477
LOC6578737	Or43a	-3.95576065	odorant receptor 43a	0.009679462	0.021049013
LOC6579192	Obp50e	-1.720989836	uncharacterized LOC6579192	9.54318E-12	6.09411E-11
LOC6579244	Obp59a	-6.90801247	odorant-binding protein 59a	3.19174E-08	1.51167E-07
LOC6580688	Obp56d	1.360655169	general odorant-binding protein 56d	3.16633E-16	2.68807E-15
LOC6580699	Obp56g	4.82501713	general odorant-binding protein 56h	0.002362463	0.005881415
LOC6581465	GI12801	-3.706093608	gustatory and odorant receptor 63a	0.000314978	0.000911979
LOC6582779	Obp76a	-3.528594917	general odorant-binding protein lush	0.016030562	0.033095741
LOC6583245	Dmoj_GI11546	-2.243879634	ionotropic receptor 93a	0.006818942	0.015354034
LOC6583405	Dmoj_GI13844	3.508785528	odorant receptor 67c	1.62151E-06	6.45187E-06
LOC6583474	Gr64e	5.150894509	uncharacterized LOC6583474	0.000177038	0.000534916
LOC6584534	Dmoj_GI14836	-4.724862444	odorant receptor 1a	0.010942048	0.023450648
LOC6585380	Obp19b	-2.763493774	general odorant-binding protein 19d	0.000159838	0.000486681
LOC6585382	Obp19d	-4.155613001	general odorant-binding protein 19d	2.36756E-07	1.02582E-06
LOC6586293	Dmoj_GI14312	-3.116724095	ionotropic receptor 21a	2.18611E-66	1.78343E-64
LOC6586417	Dmoj_GI16742	1.799029537	odorant receptor 85c	5.53254E-05	0.000180409
Metabolismo-Destoxificação					
LOC6572467	Dmoj_GI24047	1.422389921	probable cytochrome P450 12e1. Mitochondrial	4.45235E-12	2.9189E-11

Continuação Tabela Suplementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6572483	Dmoj_GI23556	1.667517353	probable cytochrome P450 12a4. Mitochondrial	8.98274E-39	2.46703E-37
LOC6572610	Dmoj_GI23480	1.378189071	esterase B1	3.27836E-16	2.77634E-15
LOC6572619	Dmoj_GI24124	-1.193196234	esterase B1	1.19064E-14	9.14451E-14
LOC6573114	Dmoj_GI23193	1.784956829	glutathione S-transferase 1-1	3.48194E-08	1.64515E-07
LOC6573115	Dmoj_GI24379	1.914905293	glutathione S-transferase D1	2.1496E-186	1.568E-183
LOC6573733	Dmoj_GI24725	1.799741841	probable cytochrome P450 9f2	3.2513E-102	6.8962E-100
LOC6574187	Dmoj_GI10120	1.077028522	UDP-glycosyltransferase UGT5	9.98855E-19	9.9647E-18
LOC6574188	Dmoj_GI10121	-1.599850447	juvenile hormone esterase	1.38581E-07	6.17722E-07
LOC6574189	Dmoj_GI22628	2.01141268	UDP-glycosyltransferase UGT5	4.1359E-21	4.78772E-20
LOC6574192	Dmoj_GI10122	1.591611168	UDP-glycosyltransferase UGT5	2.68101E-06	1.03654E-05
LOC6574390	Dmoj_GI10234	4.36955662	probable cytochrome P450 313b1	7.3847E-33	1.57605E-31
LOC6574476	Dmoj_GI22473	1.403948977	uncharacterized LOC6574476	7.12949E-44	2.43303E-42
LOC6574889	Dmoj_GI22266	2.247522141	probable cytochrome P450 313a4	5.78489E-09	2.95722E-08
LOC6575132	Dmoj_GI22127	2.110319306	cytochrome P450 4c3	0.00132666	0.003464795
LOC6575275	Dmoj_GI10706	1.692841739	esterase E4	3.81122E-38	1.02228E-36
LOC6575470	Dmoj_GI21954	-1.272642237	probable cytochrome P450 28a5	6.35536E-07	2.65117E-06
LOC6575759	Dmoj_GI15223	-1.697255367	lysophospholipase-like protein 1	0.000214708	0.000641147
LOC6575818	Dmoj_GI17058	1.036701411	UDP-glucosyltransferase 2	0.002353801	0.005863028
LOC6576103	Dmoj_GI14134	1.682896292	UDP-glycosyltransferase UGT5	1.08888E-44	3.87915E-43
LOC6576777	Dmoj_GI17561	4.925376912	phospholipase B1. membrane-associated	0.00012176	0.000376644
LOC6576803	Dmoj_GI17573	1.030436329	juvenile hormone esterase	7.04265E-14	5.17851E-13
LOC6576804	Dmoj_GI11062	-1.214028822	esterase E4	9.46707E-07	3.87537E-06
LOC6578513	Dmoj_GI19925	1.083151473	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	3.17872E-19	3.29759E-18
LOC6578754	Dmoj_GI20052	1.679908086	cytochrome P450 9b2	8.32876E-22	9.99379E-21
LOC6578914	Dmoj_GI19388	2.793088016	glutathione S-transferase 1	4.97832E-18	4.72375E-17
LOC6578916	Dmoj_GI20122	3.60343136	glutathione S-transferase 1	4.1766E-122	1.5153E-119
LOC6579082	Dmoj_GI20221	1.44298031	uncharacterized LOC6579082	2.97658E-13	2.09485E-12
LOC6579307	Dmoj_GI19213	1.899978851	UDP-glycosyltransferase UGT5	3.09063E-10	1.75208E-09
LOC6579308	Dmoj_GI19212	1.662866363	UDP-glycosyltransferase UGT5	2.82866E-08	1.34711E-07
LOC6579783	Dmoj_GI18951	-1.224526193	probable cytochrome P450 6g2	0.002817458	0.006913027
LOC6580325	Dmoj_GI18705	1.214326632	probable cytochrome P450 317a1	0.000211168	0.000631212
LOC6580326	Dmoj_GI18306	2.782319218	probable cytochrome P450 6a21	4.92908E-26	7.49253E-25

Continuação Tabela Suplementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6580328	Dmoj_GI18309	1.051715621	uncharacterized LOC6580328	0.000322844	0.000933133
LOC6580346	Dmoj_GI20902	2.289550504	probable cytochrome P450 4ad1	4.50478E-08	2.10748E-07
LOC6580442	Dmoj_GI18650	1.157567652	cytochrome P450 4p1	2.87953E-10	1.63779E-09
LOC6580728	Dmoj_GI21108	-1.617291297	phospholipid-transporting ATPase ABCA1	5.88605E-15	4.59779E-14
LOC6581812	Dmoj_GI13002	3.02077904	probable cytochrome P450 12d1 proximal. mitochondrial	1.1166E-37	2.9548E-36
LOC6581919	Dmoj_GI13047	-1.061316407	uncharacterized LOC6581919	1.32101E-16	1.14763E-15
LOC6582461	Dmoj_GI11974	2.832535135	pyrimidodiazepine synthase	0.023174235	0.045813476
LOC6583165	Dmoj_GI13713	1.003547395	ATP-binding cassette sub-family G member 1	9.13206E-11	5.39202E-10
LOC6584329	Dmoj_GI15666	-2.204506858	ATP-binding cassette sub-family A member 6	1.24723E-06	5.0309E-06
LOC6584932	Dmoj_GI14608	1.334649137	glutathione S-transferase theta-3	6.91241E-50	2.95051E-48
LOC6585072	Dmoj_GI21555	1.349015912	probable cytochrome P450 4s3	1.09059E-18	1.08328E-17
LOC6585085	Dmoj_GI21548	-1.953984327	metaxin-2	2.80177E-09	1.46732E-08
LOC6585988	Dmoj_GI11123	1.844981976	cytochrome P450 4g1	1.1099E-109	2.9428E-107
LOC6586100	Dmoj_GI11185	-1.029651193	cytochrome P450 306a1	1.69933E-05	5.95241E-05
LOC6586264	Dmoj_GI14445	-1.254228038	phospholipid-transporting ATPase ABCA3	4.8176E-13	3.34274E-12
LOC6586265	Dmoj_GI14446	1.059337817	phospholipid-transporting ATPase ABCA3	4.27365E-29	7.80409E-28
LOC6586266	Dmoj_GI14327	-1.492268646	phospholipid-transporting ATPase ABCA3	1.56338E-14	1.19415E-13
LOC6586477	Dmoj_GI16624	1.243187243	glutathione S-transferase 1	4.4098E-05	0.000145729
LOC6586903	Dmoj_GI18307	1.365475381	probable cytochrome P450 6a21	2.93804E-07	1.26229E-06
LOC6586905	Dmoj_GI18308	1.547595894	probable cytochrome P450 6a21	4.97611E-17	4.44337E-16
LOC6579322		1.566077693	cytochrome P450 4p1-like	1.57112E-05	5.52717E-05
LOC6580332		2.855676502	probable cytochrome P450 6a14	2.78276E-57	1.56596E-55
<i>D. m. wrigleyi</i> - <i>D. m. sonorensis</i>					
Aceitação-Localização					
LOC26527676	Dmoj_GI25664	1.097111532	odorant receptor 13a	0.00120589	0.0062776
LOC6572115	Obp93a	1.842586698	Uncharacterized LOC6572115	0.001269913	0.006570375
LOC6572744	Obp99a	2.505391123	general odorant-binding protein 99a	1.47777E-22	5.14515E-21
LOC6572845	Dmoj_GI23341	-4.608886138	odorant receptor 88a	0.009145375	0.035379402

Continuação Tabela Suplementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6573431	Dmoj_GI23037	-3.273895301	putative gustatory receptor 98b	0.004736916	0.020359846
LOC6574748	Obp99d	4.021106729	uncharacterized LOC6574748	2.92605E-35	1.7886E-33
LOC6576646	Obp28a	-2.314905473	general odorant-binding protein 28a	2.50132E-77	5.45005E-75
LOC6576652	Dmoj_GI17492	-2.416784907	ionotropic receptor 40a	3.30668E-05	0.000246931
LOC6576755	Dmoj_GI11269	1.658662261	glutamate receptor ionotropic. kainate 2	0.00844775	0.033107238
LOC6578143	Dmoj_GI18246	2.917381629	odorant receptor 22c	3.10971E-08	3.65614E-07
LOC6578242	Obp47a	1.724789254	general odorant-binding protein 56a	1.61527E-08	1.9801E-07
LOC6579244	Obp59a	-6.205581896	odorant-binding protein 59a	7.67138E-07	7.49874E-06
LOC6580406	Obp57cL1	-5.393809578	general odorant-binding protein 57c	0.005907913	0.024474085
LOC6580687	Obp56c	1.208678596	uncharacterized LOC6580687	0.000264926	0.001638683
LOC6580688	Obp56d	1.223437504	general odorant-binding protein 56d	2.42775E-13	4.76693E-12
LOC6580689	Obp56eL1-1	-6.087788902	general odorant-binding protein 56d	4.4473E-107	1.938E-104
LOC6586293	Dmoj_GI14312	-3.227166515	ionotropic receptor 21a	7.96686E-71	1.55977E-68
Metabolismo-Destoxificação					
LOC26527701	GI26060	1.93712713	ATP-dependent translocase ABCB1	2.2473E-18	6.33794E-17
LOC6572467	Dmoj_GI24047	2.820733746	probable cytochrome P450 12e1. mitochondrial	9.51894E-31	4.98416E-29
LOC6572483	Dmoj_GI23556	1.630530521	probable cytochrome P450 12a4. mitochondrial	6.22156E-37	4.02139E-35
LOC6572610	Dmoj_GI23480	1.25478053	esterase B1	1.45221E-13	2.91066E-12
LOC6573112	Dmoj_GI23195	-4.663406922	glutathione S-transferase D5	0.003283982	0.014847158
LOC6573113	Dmoj_GI23194	-2.411452862	glutathione S-transferase 1-1	3.71329E-87	1.0905E-84
LOC6573114	Dmoj_GI23193	1.73724326	glutathione S-transferase 1-1	1.0345E-07	1.13342E-06
LOC6573115	Dmoj_GI24379	1.588660399	glutathione S-transferase D1	1.9269E-129	1.4462E-126
LOC6573733	Dmoj_GI24725	1.892416236	probable cytochrome P450 9f2	8.5902E-111	4.1445E-108
LOC6574186	Dmoj_GI10119	-2.279835413	UDP-glycosyltransferase UGT5	1.9282E-38	1.32223E-36
LOC6574188	Dmoj_GI10121	-3.693038286	juvenile hormone esterase	2.33351E-36	1.48695E-34
LOC6574189	Dmoj_GI22628	3.29112026	UDP-glycosyltransferase UGT5	1.29246E-41	1.01511E-39
LOC6574191	Dmoj_GI22626	3.226018635	UDP-glycosyltransferase UGT5	7.45855E-08	8.35469E-07

Continuação Tabela Complementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6574192	Dmoj_GI10122	3.452251766	UDP-glycosyltransferase UGT5	2.69746E-15	6.15199E-14
LOC6574390	Dmoj_GI10234	2.125878087	probable cytochrome P450 313b1	3.14495E-15	7.10453E-14
LOC6574889	Dmoj_GI22266	1.734726071	probable cytochrome P450 313a4	3.51892E-06	3.15442E-05
LOC6575275	Dmoj_GI10706	1.676732352	esterase E4	9.58295E-37	6.13536E-35
LOC6575470	Dmoj_GI21954	-1.240356904	probable cytochrome P450 28a5	1.36395E-06	1.28223E-05
LOC6575683	Dmoj_GI14247	1.692181507	uncharacterized LOC6575683	1.56655E-31	8.43131E-30
LOC6575818	Dmoj_GI17058	2.090519785	UDP-glucosyltransferase 2	4.74779E-08	5.4632E-07
LOC6576103	Dmoj_GI14134	1.891252081	UDP-glycosyltransferase UGT5	1.96793E-55	2.68533E-53
LOC6576769	Dmoj_GI17558	2.264081032	probable cytochrome P450 28a5	1.32142E-62	2.12513E-60
LOC6576777	Dmoj_GI17561	2.201911029	phospholipase B1. membrane-associated	0.011578163	0.043087989
LOC6576803	Dmoj_GI17573	1.492191786	juvenile hormone esterase	1.85087E-25	7.59982E-24
LOC6577726	Dmoj_GI18043	-1.165257585	probable cytochrome P450 310a1	2.82021E-11	4.59569E-10
LOC6578256	Dmoj_GI19745	1.093911849	multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659	4.78209E-19	1.40744E-17
LOC6578648	Dmoj_GI19997	1.363469896	cytochrome P450 9c1	6.64978E-09	8.51487E-08
LOC6578754	Dmoj_GI20052	2.409397528	cytochrome P450 9b2	1.99998E-38	1.36453E-36
LOC6578914	Dmoj_GI19388	3.136251447	glutathione S-transferase 1	1.66858E-20	5.19376E-19
LOC6578916	Dmoj_GI20122	1.743595888	glutathione S-transferase 1	2.04837E-40	1.52041E-38
LOC6578918	Dmoj_GI20124	2.978298359	glutathione S-transferase 1	5.53757E-15	1.23038E-13
LOC6579224	Dmoj_GI19238	-1.110817637	probable cytochrome P450 6d2	0.004436241	0.019258041
LOC6579307	Dmoj_GI19213	3.757365916	UDP-glycosyltransferase UGT5	7.86877E-30	3.98124E-28
LOC6579320	Dmoj_GI20370	1.174030825	cytochrome P450 4p1	3.66552E-05	0.000271626
LOC6580326	Dmoj_GI18306	3.32969531	probable cytochrome P450 6a21	1.84427E-30	9.5824E-29
LOC6580331	Dmoj_GI18701	1.516165879	cytochrome P450 6a22	1.27163E-14	2.73108E-13
LOC6580346	Dmoj_GI20902	2.669929942	probable cytochrome P450 4ad1	9.35434E-10	1.31359E-08
LOC6580347	Dmoj_GI18693	2.892975913	cytochrome P450 4e3	0.002679514	0.01246043
LOC6580402	Dmoj_GI18674	2.952998476	probable cytochrome P450 4d14	5.40529E-14	1.11142E-12
LOC6580442	Dmoj_GI18650	1.060563412	cytochrome P450 4p1	8.78454E-09	1.11115E-07

Continuação Tabela Complementar 1. Expressão gênica diferencial em larvas das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6580949	Dmoj_GI18422	1.001290357	glutathione S-transferase theta-1	1.65075E-07	1.77406E-06
LOC6581578	Dmoj_GI12867	-1.319995138	probable cytochrome P450 316a1	1.03694E-20	3.296E-19
LOC6581579	Dmoj_GI12456	4.768607745	cytochrome P450 4d8	0.000577221	0.003297116
LOC6581812	Dmoj_GI13002	2.573525032	probable cytochrome P450 12d1 proximal. mitochondrial	8.29264E-29	3.94455E-27
LOC6581919	Dmoj_GI13047	-1.245353023	uncharacterized LOC6581919	2.91634E-22	1.00246E-20
LOC6584932	Dmoj_GI14608	1.376261265	glutathione S-transferase theta-3	7.18748E-52	8.59254E-50
LOC6585072	Dmoj_GI21555	1.740442447	probable cytochrome P450 4s3	1.09587E-26	4.72973E-25
LOC6585988	Dmoj_GI11123	1.235719887	cytochrome P450 4g1	1.55746E-50	1.72457E-48
LOC6586100	Dmoj_GI11185	-1.436162163	cytochrome P450 306a1	1.68609E-09	2.29842E-08
LOC6586264	Dmoj_GI14445	1.094466646	phospholipid-transporting ATPase ABCA3	2.95337E-08	3.47839E-07
LOC6586478	Dmoj_GI16623	1.205369544	glutathione S-transferase 1	1.01381E-05	8.40214E-05
LOC6586903	Dmoj_GI18307	2.278405265	probable cytochrome P450 6a21	1.94675E-14	4.11559E-13
LOC6576764		2.454944959	probable cytochrome P450 6a14	9.4292E-149	8.4919E-146
LOC6579322		1.539221792	cytochrome P450 4p1-like	2.91399E-05	0.000219304
LOC6580332		2.431121926	probable cytochrome P450 6a14	5.12313E-43	4.35273E-41
LOC116803672		4.796308495	uncharacterized LOC116803672	1.06994E-68	1.95322E-66
LOC116804078		4.24391586	putative gustatory receptor 59f	0.003937464	0.017456911

Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
Aceitação-Localização					
<i>D.m.wrigleyi-D.m.mojavensis</i>					
LOC6572199	Dmoj_GI23678	-1,4177195	odorant receptor 85c	3,026E-05	0,0001851
LOC6572583	Dmoj_GI23493	1,1905479	general odorant-binding protein 84a	1,415E-07	1,292E-06
LOC6572845	Dmoj_GI23341	2,6256343	odorant receptor 88a	0,0001547	0,0008097
LOC6576652	Dmoj_GI17492	1,3650625	ionotropic receptor 40a	0,0035584	0,012813
LOC6576707	Dmoj_GI11402	1,3218216	odorant receptor 98a	0,0047795	0,0165884
LOC6576836	Dmoj_GI17592	-1,0685624	odorant receptor 67a	0,0072732	0,02378
LOC6577676	Dmoj_GI21835	1,8542104	gustatory and odorant receptor 21a	2,701E-06	2,007E-05
LOC6578414	Dmoj_GI19869	2,0257399	odorant receptor 47b	0,0009084	0,0038863
LOC6578496	Dmoj_GI19915	-1,2836237	general odorant-binding protein 67	8,39E-24	3,207E-22
LOC6578554	Dmoj_GI19601	2,2312261	odorant receptor 42b	2,018E-10	2,714E-09
LOC6579647	Dmoj_GI19019	1,7031273	odorant receptor 59b	3,674E-16	8,477E-15
LOC6580202	Dmoj_GI20824	-1,2390701	gustatory receptor for sugar taste 43a	0,0030157	0,0111564
LOC6580686	Dmoj_GI18539	-2,9619643	general odorant-binding protein 56a	3,015E-10	3,964E-09
LOC6580699	Dmoj_GI18535	-1,243331	general odorant-binding protein 56h	1,489E-16	3,6E-15
LOC6580868	Dmoj_GI21189	-1,0709763	putative gustatory receptor 59b	0,0149344	0,0439069
LOC6583016	Dmoj_GI13636	1,5677095	putative odorant receptor 69a	8,348E-05	0,0004666
LOC6583843	Dmoj_GI15391	1,2771613	odorant receptor 9a	0,0043425	0,0152469
LOC6584412	Dmoj_GI14894	1,828217	gustatory receptor 10a	0,0027315	0,0102453
LOC6584413	Dmoj_GI14893	5,3424	odorant receptor 10a	0,0072677	0,023768
LOC6585146	Dmoj_GI21729	1,3996999	putative odorant receptor 92a	1,891E-18	5,332E-17
LOC6585380	Dmoj_GI16308	-3,1674837	general odorant-binding protein 19d	7,961E-62	1,217E-59
LOC6586293	Dmoj_GI14312	1,5060195	ionotropic receptor 21a	2,144E-08	2,224E-07
Metabolismo-Destoxificação					
LOC26527701	Dmoj_GI26060	3,898554139	ATP-dependent translocase ABCB1	5,99923E-10	7,64299E-09
LOC6572483	Dmoj_GI23556	1,287870343	probable cytochrome P450 12a4, mitochondrial	6,83546E-17	1,69405E-15
LOC6572614	Dmoj_GI24123	-1,835749118	esterase B1	5,38578E-67	9,62537E-65
LOC6572619	Dmoj_GI24124	-1,709828413	esterase B1	3,35974E-23	1,23213E-21
LOC6572644	Dmoj_GI23457	-1,05601204	bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	5,27457E-16	1,19516E-14

Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6572829	Dmoj_GI23350	1,333555366	probable cytochrome P450 304a1	4,76676E-06	3,41147E-05
LOC6573114	Dmoj_GI23193	1,598212852	glutathione S-transferase 1-1	2,97776E-08	3,02278E-07
LOC6574186	Dmoj_GI10119	-1,007710879	UDP-glycosyltransferase UGT5	2,4045E-05	0,000150373
LOC6574476	GI22473	1,19440884	uncharacterized LOC6574476	7,27836E-18	1,965E-16
LOC6574518	Dmoj_GI10293	-1,08780124	multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659	0,000532581	0,002423061
LOC6575470	Dmoj_GI21954	1,530374756	probable cytochrome P450 28a5	3,2253E-22	1,12434E-20
LOC6575818	Dmoj_GI17058	-2,41593516	UDP-glucosyltransferase 2	0,001133662	0,004736595
LOC6576103	Dmoj_GI14134	-2,338113592	UDP-glycosyltransferase UGT5	7,84465E-36	5,26671E-34
LOC6576270	Dmoj_GI17287	1,128938114	kynurenine formamidase	3,5703E-07	3,03643E-06
LOC6576769	Dmoj_GI17558	1,150082191	probable cytochrome P450 28a5	8,86583E-23	3,19598E-21
LOC6577898	Dmoj_GI20943	3,036936436	UDP-glycosyltransferase UGT4	8,85956E-40	7,07037E-38
LOC6578754	Dmoj_GI20052	-1,11279236	cytochrome P450 9b2	4,84002E-07	4,02993E-06
LOC6578917	Dmoj_GI20123	-3,563188481	glutathione S-transferase 1	6,97617E-09	7,75816E-08
LOC6579097	Dmoj_GI20228	-1,84021995	cytochrome P450 6a2	3,20743E-85	8,13982E-83
LOC6579224	Dmoj_GI19238	-2,60562534	probable cytochrome P450 6d2	2,38716E-34	1,47759E-32
LOC6579245	Dmoj_GI20314	1,191737017	uncharacterized LOC6579245	0,011412301	0,034919384
LOC6579246	Dmoj_GI19231	-5,833658752	uncharacterized LOC6579246	0,008601877	0,027445115
LOC6579247	Dmoj_GI20315	-5,866636355	uncharacterized LOC6579247	0,000119617	0,000642329
LOC6579306	Dmoj_GI19214	1,263646948	UDP-glycosyltransferase UGT5	1,05505E-32	6,05769E-31
LOC6579307	Dmoj_GI19213	-1,918712313	UDP-glycosyltransferase UGT5	5,32482E-12	8,40381E-11
LOC6579431	Dmoj_GI19140	-1,04063911	probable cytochrome P450 4aa1	0,005014756	0,017333763
LOC6579656	Dmoj_GI19015	-1,099525064	protein brown	8,27712E-05	0,000463497
LOC6580346	Dmoj_GI20902	-2,350531937	probable cytochrome P450 4ad1	3,64603E-41	3,06388E-39
LOC6580406	Dmoj_GI20942	-2,025954481	general odorant-binding protein 57c	0,008375839	0,026791284
LOC6580407	Dmoj_GI18673	1,266656375	uncharacterized LOC6580407	9,51186E-31	5,18009E-29
LOC6580442	Dmoj_GI18650	1,415360752	cytochrome P450 4p1	6,25618E-15	1,28871E-13
LOC6580728	Dmoj_GI21108	2,076861527	phospholipid-transporting ATPase ABCA1	1,70072E-20	5,42221E-19
LOC6580949	Dmoj_GI18422	1,028547648	glutathione S-transferase theta-1	1,68009E-06	1,29439E-05
LOC6580984	Dmoj_GI21254	-2,121924145	cytochrome P450 CYP12A2	3,10638E-07	2,67415E-06
LOC6581578	Dmoj_GI12867	-1,248763476	probable cytochrome P450 316a1	5,05199E-49	5,57432E-47
LOC6581579	Dmoj_GI12456	1,830718766	cytochrome P450 4d8	0,00553517	0,018829965
LOC6582461	Dmoj_GI11974	-1,076555016	pyrimidodiazepine synthase	2,47724E-09	2,94048E-08

Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6583352	Dmoj_GI11492	1,182516268	ecdysone 20-monooxygenase	6,50379E-16	1,45549E-14
LOC6584447	Dmoj_GI15739	1,12690238	microsomal glutathione S-transferase 1	0,000293884	0,001434821
LOC6584932	Dmoj_GI14608	1,020812297	glutathione S-transferase theta-3	5,78067E-11	8,32587E-10
LOC6585072	Dmoj_GI21555	-1,714174632	probable cytochrome P450 4s3	8,12711E-42	6,92113E-40
LOC6585381	Dmoj_GI16240	-6,469668261	uncharacterized LOC6585381	3,05544E-08	3,08682E-07
LOC6586903	Dmoj_GI18307	1,506019494	probable cytochrome P450 6a21	1,309E-06	1,02404E-05
<i>D.m.wrigleyi</i>-<i>D.m.baja</i>					
Aceitação-Localização					
LOC26527676	Dmoj_GI25664	1,744605781	odorant receptor 13 ^a	0,000713	0,003281
LOC6572199	Dmoj_GI23678	-1,054037317	odorant receptor 85c	0,002229	0,008946
LOC6572390	Dmoj_GI24005	-2,556549074	odorant receptor 85f	4,56E-05	0,000273
LOC6572744	Dmoj_GI23406	6,445363379	general odorant-binding protein 99a	0,001013	0,00446
LOC6572845	Dmoj_GI23341	2,245986942	odorant receptor 88 ^a	0,001014	0,004463
LOC6573124	Dmoj_GI23186	1,049254859	general odorant-binding protein 83a	9,65E-28	3,67E-26
LOC6574748	Dmoj_GI10414	-1,899277304	uncharacterized LOC6574748	0,00032	0,001608
LOC6575893	Dmoj_GI14554	-1,037525371	putative odorant-binding protein A5	3,86E-28	1,5E-26
LOC6579245	Dmoj_GI20314	-1,275715934	uncharacterized LOC6579245	0,003655	0,013774
LOC6579247	Dmoj_GI20315	-6,217307897	uncharacterized LOC6579247	4,43E-05	0,000266
LOC6580406	Dmoj_GI20942	-1,508694619	general odorant-binding protein 57c	1,02E-17	2,18E-16
LOC6580685	Dmoj_GI21082	-2,782189431	general odorant-binding protein 56a	1,07E-18	2,42E-17
LOC6580686	Dmoj_GI18539	7,981424266	general odorant-binding protein 56a	8,83E-11	1,13E-09
LOC6582283	Dmoj_GI12080	-2,276592113	odorant receptor 67b	0,001228	0,005305
LOC6583148	Dmoj_GI13706	-3,265233114	ionotropic receptor 21a	3,79E-07	3,23E-06
LOC6583506	Dmoj_GI11406	1,772595963	odorant receptor 63 ^a	0,002572	0,010124
LOC6584534	Dmoj_GI14836	-6,142224416	odorant receptor 1 ^a	0,002704	0,010594
LOC6585380	Dmoj_GI16308	-2,316991414	general odorant-binding protein 19d	4,63E-05	0,000277
LOC6585381	Dmoj_GI16240	-6,009335062	uncharacterized LOC6585381	7,4E-06	5,12E-05
LOC6585602	Dmoj_GI16116	1,228292785	uncharacterized LOC6585602	8,92E-14	1,5E-12
LOC6586293	Dmoj_GI14312	-2,502607394	ionotropic receptor 21a	1,7E-27	6,37E-26

Continuação Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-água)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
Metabolismo-Destoxificação					
LOC26527701	Dmoj_GI26060	6,380428248	ATP-dependent translocase ABCB1	1,9E-20	4,94E-19
LOC6572467	Dmoj_GI24047	1,062607256	probable cytochrome P450 12e1, mitochondrial	3,43E-10	4,18E-09
LOC6572483	Dmoj_GI23556	1,847751122	probable cytochrome P450 12a4, mitochondrial	2,01E-32	9,47E-31
LOC6572614	Dmoj_GI24123	-1,394674183	esterase B1	5,21E-39	3,01E-37
LOC6572619	Dmoj_GI24124	-1,600182232	esterase B1	1,96E-20	5,07E-19
LOC6572829	Dmoj_GI23350	-1,016094885	probable cytochrome P450 304a1	0,000213	0,001116
LOC6572989	Dmoj_GI23261	3,788067205	ABC transporter G family member 7	2,01E-05	0,000129
LOC6573058	Dmoj_GI23226	1,078888412	probable cytochrome P450 6d4	1,36E-13	2,25E-12
LOC6573195	Dmoj_GI23153	-1,043943998	ATP-binding cassette sub-family G member 8	4,3E-07	3,62E-06
LOC6574120	Dmoj_GI22671	1,670685117	ATP-binding cassette sub-family C member 4	4,69E-18	1,02E-16
LOC6574186	Dmoj_GI10119	-1,798521624	UDP-glycosyltransferase UGT5	2,34E-14	4,06E-13
LOC6574476	GI22473	1,327838692	uncharacterized LOC6574476	1,27E-21	3,55E-20
LOC6574519	Dmoj_GI10294	1,194790526	multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659	1,95E-09	2,19E-08
LOC6575470	Dmoj_GI21954	-1,127106484	probable cytochrome P450 28a5	3,42E-13	5,48E-12
LOC6575818	Dmoj_GI17058	-3,376565678	UDP-glucosyltransferase 2	4,14E-06	2,99E-05
LOC6575851	Dmoj_GI17072	-1,355208169	probable cytochrome P450 303a1	0,000225	0,001171
LOC6575897	Dmoj_GI14542	-1,004116592	carboxylesterase 1E	4,88E-08	4,63E-07
LOC6576103	Dmoj_GI14134	-1,195428949	UDP-glycosyltransferase UGT5	4,28E-10	5,15E-09
LOC6576769	Dmoj_GI17558	-1,073151732	probable cytochrome P450 28a5	1,46E-20	3,81E-19
LOC6576804	Dmoj_GI11062	6,126509669	esterase E4	0,003361	0,012804
LOC6577143	Dmoj_GI24095	1,762604006	glutathione S-transferase 1	2,81E-31	1,25E-29
LOC6577898	Dmoj_GI20943	1,78702816	UDP-glycosyltransferase UGT4	5,02E-17	1,02E-15
LOC6578754	Dmoj_GI20052	-1,614827861	cytochrome P450 9b2	2,43E-13	3,95E-12
LOC6578916	Dmoj_GI20122	2,005954508	glutathione S-transferase 1	1,91E-34	9,69E-33
LOC6578917	Dmoj_GI20123	-2,192092609	glutathione S-transferase 1	0,000553	0,002614
LOC6579082	Dmoj_GI20221	1,284979263	uncharacterized LOC6579082	3,28E-15	6,05E-14
LOC6579098	Dmoj_GI20229	-3,850707093	cytochrome P450 6a2	0,005106	0,018322
LOC6579099	Dmoj_GI20230	-4,876410002	cytochrome P450 6a2	1,7E-33	8,3E-32

Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6579431	Dmoj_GI19140	-1,157974476	probable cytochrome P450 4aa1	0,0018	0,007406
LOC6579656	Dmoj_GI19015	1,279266152	protein brown	1,41E-05	9,28E-05
LOC6580326	GI18306	4,898120994	probable cytochrome P450 6a21	1,84E-09	2,07E-08
LOC6580328	GI18309	4,496513473	uncharacterized LOC6580328	1,81E-51	1,53E-49
LOC6580402	Dmoj_GI18674	1,497909306	probable cytochrome P450 4d14	5,02E-10	6,01E-09
LOC6580442	Dmoj_GI18650	1,577955692	cytochrome P450 4p1	3,69E-12	5,4E-11
LOC6580728	Dmoj_GI21108	-1,808597055	phospholipid-transporting ATPase ABCA1	0,014783	0,045677
LOC6580984	Dmoj_GI21254	-1,284374863	cytochrome P450 CYP12A2	2,63E-18	5,83E-17
LOC6581578	Dmoj_GI12867	-1,365153833	probable cytochrome P450 316a1	0,002436	0,009673
LOC6581812	Dmoj_GI13002	2,120140766	probable cytochrome P450 12d1 proximal, mitochondrial	9,05E-35	4,65E-33
LOC6582217	Dmoj_GI12106	-1,119015394	glutamate receptor 1	5,82E-27	2,12E-25
LOC6582462	Dmoj_GI11973	1,471864073	pyrimidodiazepine synthase	4,51E-24	1,45E-22
LOC6583072	Dmoj_GI13668	1,427277275	probable cytochrome P450 305a1	2,59E-12	3,82E-11
LOC6583352	Dmoj_GI11492	1,506323049	ecdysone 20-monooxygenase	0,000196	0,001034
LOC6584447	Dmoj_GI15739	1,029563927	microsomal glutathione S-transferase 1	3,56E-35	1,85E-33
LOC6584932	Dmoj_GI14608	1,418778261	glutathione S-transferase theta-3	5,8E-34	2,89E-32
LOC6586624	Dmoj_GI16547	3,169482024	protein scarlet	3,07E-65	3,86E-63
LOC6586903	Dmoj_GI18307	6,653429128	probable cytochrome P450 6a21	4,01E-09	4,35E-08
LOC6586905	Dmoj_GI18308	1,12556901	probable cytochrome P450 6a21	4,9E-14	8,33E-13
<i>D.m.wrigleyi-D.m.sonorensis</i>					
Aceitação-Localização					
LOC6572199	Dmoj_GI23678	-1,540607232	odorant receptor 85c	2,36E-05	9,46E-05
LOC6572390	Dmoj_GI24005	-2,358663497	odorant receptor 85f	1,97E-16	2,45E-15
LOC6574476	GI22473	1,264045092	uncharacterized LOC6574476	2,38E-08	1,45E-07
LOC6574748	Dmoj_GI10414	-2,502663271	uncharacterized LOC6574748	0,008549	0,02039
LOC6574749	Dmoj_GI22335	-1,655410286	general odorant-binding protein 99b	1,73E-19	2,7E-18
LOC6575270	Dmoj_GI22059	1,106821865	putative odorant receptor 83c	2,32E-06	1,09E-05
LOC6576652	Dmoj_GI17492	1,334603901	ionotropic receptor 40a	5,1E-06	2,28E-05
LOC6577030	Dmoj_GI24760	1,498800336	odorant receptor 33c	1,04E-39	4,22E-38
LOC6578414	Dmoj_GI19869	2,703607103	odorant receptor 47b	0,001951	0,00543

Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6580328	Dmoj_GI18309	1,166141085	uncharacterized LOC6580328	1,59E-05	6,53E-05
LOC6580686	Dmoj_GI18539	3,820021775	general odorant-binding protein 56a	0,003875	0,010071
LOC6580868	Dmoj_GI21189	-1,172745727	putative gustatory receptor 59b	1,01E-08	6,41E-08
LOC6583148	Dmoj_GI13706	-2,726895201	ionotropic receptor 21a	2,5E-07	1,35E-06
LOC6583245	Dmoj_GI11546	1,201935183	ionotropic receptor 93a	1,36E-12	1,24E-11
LOC6583405	Dmoj_GI13844	1,780080201	odorant receptor 67c	7,75E-17	1E-15
LOC6583506	Dmoj_GI11406	-1,47055904	odorant receptor 63a	7,66E-58	6,22E-56
LOC6584053	Dmoj_GI15510	-1,55121542	uncharacterized LOC6584053	3,42E-05	0,000134
LOC6585381	Dmoj_GI16240	-5,842049092	uncharacterized LOC6585381	0,005507	0,013784
LOC6585739	Dmoj_GI16039	1,670755014	glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	0,008768	0,02086
LOC6586293	Dmoj_GI14312	-3,744124054	ionotropic receptor 21a	2,8E-100	6,92E-98
Metabolismo-Destoxificação					
LOC26527701	GI26060	5,677445073	ATP-dependent translocase ABCB1	2,86E-11	2,33E-10
LOC6572467	Dmoj_GI24047	2,032484876	probable cytochrome P450 12e1, mitochondrial	9,41E-06	4,04E-05
LOC6572483	Dmoj_GI23556	1,57387997	probable cytochrome P450 12a4, mitochondrial	0,000218	0,000742
LOC6572614	Dmoj_GI24123	-1,067711731	esterase B1	4,89E-30	1,33E-28
LOC6572617	Dmoj_GI23473	-1,270297612	esterase B1	1,55E-23	2,99E-22
LOC6572828	Dmoj_GI23351	-2,014708826	probable cytochrome P450 304a1	8,62E-23	1,58E-21
LOC6572829	Dmoj_GI23350	-3,813902032	probable cytochrome P450 304a1	4,61E-16	5,55E-15
LOC6572989	Dmoj_GI23261	7,998277836	ABC transporter G family member 7	5E-164	4,4E-161
LOC6574192	Dmoj_GI10122	1,481157383	UDP-glycosyltransferase UGT5	3,99E-45	2,07E-43
LOC6575470	Dmoj_GI21954	-1,276602288	probable cytochrome P450 28a5	1,85E-68	2,21E-66
LOC6575818	Dmoj_GI17058	-3,379377776	UDP-glycosyltransferase 2	0,002828	0,007583
LOC6576103	Dmoj_GI14134	-1,439895435	UDP-glycosyltransferase UGT5	1,95E-16	2,43E-15
LOC6576769	Dmoj_GI17558	1,583479822	probable cytochrome P450 28a5	1,29E-13	1,26E-12
LOC6576777	Dmoj_GI17561	4,715713831	phospholipase B1, membrane-associated	0,00623	0,015368
LOC6576804	Dmoj_GI11062	5,370592591	esterase E4	0,000295	0,000985
LOC6577578	Dmoj_GI22062	-1,217734692	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	1,06E-06	5,21E-06
LOC6577898	Dmoj_GI20943	1,731438038	UDP-glycosyltransferase UGT4	0,010146	0,023704
LOC6578648	Dmoj_GI19997	2,167818586	cytochrome P450 9c1	7,24E-05	0,000268
LOC6578917	Dmoj_GI20123	-3,946228204	glutathione S-transferase 1	1,91E-36	7,06E-35

Tabela suplementar 2. Expressão gênica diferencial em cabeças das comparações *D. m. wrigleyi*-*D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi*-*D. m. baja* e *D. m. wrigleyi*-*D. m. sonorensis* mantidas em meio de cultura padrão (fubá-ágar)

ID	Símbolo_moj	log2foldchange	Descrição	pvalue	padj
LOC6579097	Dmoj_GI20228	-1,492745835	cytochrome P450 6a2	4,95E-11	3,95E-10
LOC6579099	Dmoj_GI20230	-3,605826203	cytochrome P450 6a2	3,03E-13	2,89E-12
LOC6579224	Dmoj_GI19238	-1,129148479	probable cytochrome P450 6d2	1,9E-10	1,44E-09
LOC6579307	Dmoj_GI19213	-1,325947068	UDP-glycosyltransferase UGT5	8,71E-56	6,37E-54
LOC6579431	Dmoj_GI19140	2,072893361	probable cytochrome P450 4aa1	3,16E-18	4,55E-17
LOC6579783	Dmoj_GI18951	2,929282411	probable cytochrome P450 6g2	3,39E-07	1,8E-06
LOC6580326	Dmoj_GI18306	-1,206024669	probable cytochrome P450 6a21	3,14E-06	1,46E-05
LOC6580402	Dmoj_GI18674	1,000508235	probable cytochrome P450 4d14	1,31E-14	1,39E-13
LOC6580728	Dmoj_GI21108	-2,021696638	phospholipid-transporting ATPase ABCA1	3,97E-06	1,81E-05
LOC6580949	Dmoj_GI18422	1,476082983	glutathione S-transferase theta-1	3,54E-05	0,000138
LOC6580984	Dmoj_GI21254	-1,260978378	cytochrome P450 CYP12A2	2,96E-08	1,78E-07
LOC6582918	Dmoj_GI11726	2,484513709	probable cytochrome P450 312a1	0,006753	0,0165
LOC6584932	Dmoj_GI14608	1,884502876	glutathione S-transferase theta-3	1,16E-05	4,89E-05
LOC6585072	Dmoj_GI21555	-2,199544745	probable cytochrome P450 4s3	0,001238	0,003608
LOC6585988	Dmoj_GI11123	4,097785531	cytochrome P450 4g1	2,14E-57	1,72E-55
LOC6586903	Dmoj_GI18307	2,792975714	probable cytochrome P450 6a21	1,51E-05	6,23E-05