

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

JAQUELINE DE OLIVEIRA PRESTES

**VARIAÇÃO FENOTÍPICA EM RESPOSTA À SAZONALIDADE ALIMENTAR EM  
*Drosophila mojavensis sonorensis* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

Guarapuava-PR

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

JAQUELINE DE OLIVEIRA PRESTES

**VARIAÇÃO FENOTÍPICA EM RESPOSTA À SAZONALIDADE ALIMENTAR EM  
*Drosophila mojavensis sonorensis* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Paes de Barros Machado.

Guarapuava-PR

2017

*Dedico à minha família e noivo que, sempre acreditaram  
que tudo seria possível e me deram esperança para seguir.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela vida que tenho e pelos bons caminhos que se abrem constantemente em minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Paes de Barros Machado pela orientação, por terem me aceitado em seu laboratório desde o início da graduação e corrigido meus trabalhos inúmeras vezes. Os quais que com muita paciência, respeito e força de vontade me ensinaram muito sobre pesquisa, tornando-se exemplos em minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Costa, que com muita calma não mediu tempo e esforços para esclarecer vários pontos da pesquisa, ajudando a encontrar saída para problemas e dúvidas que pareciam insolucionáveis, contribuindo muito com nosso trabalho.

A minha grande família, pais, irmãs, noivo, avó, tios e afilhados, que com infinito amor me apoiaram e ajudaram a superar os dias mais difíceis, principalmente os momentos em que parecia que nada iria dar certo. Em especial, meus pais, Solange e Jocelio, que desde muito cedo me ensinaram a nunca desistir, e me mostraram que todos os meus sonhos seriam possíveis se eu lutasse para conseguir.

A todas às colegas do Laboratório de Genética e Evolução que contribuíram para a realização do trabalho, auxiliando sempre que possível, e alegrando com muitas conversas malucas o dia-a-dia da pesquisa.

Aos poucos e bons amigos, responsáveis por tornar a vida mais divertida e feliz, os quais estão sempre dispostos a ouvir e compartilhar suas frustrações e felicidades de forma espontânea, especialmente minha amiga Aline.

A Universidade Estadual do Centro-Oeste, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e a CAPES, pelo suporte e concessão de bolsa.

## RESUMO

Muitos insetos são saprofitófagos e utilizam plantas hospedeiras em seu ciclo de vida, dentre eles, as moscas do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). A troca de hospedeiro exige habilidade de adaptação das moscas a novos fatores bióticos. A subespécie cactófila *Drosophila mojavensis sonorensis* pertencente ao grupo *repleta*, habita o Deserto de Sonora e, participa do sistema cacto – levedura – *Drosophila*, utilizando geralmente cladódios do cacto colunar *Stenocereus thurberi*. Porém, recentemente foi constatado que estas moscas também utilizam frutos em decomposição de *Opuntia spp.* como hospedeiros sazonais alternativos. Entre os dois hospedeiros há diferenças, com relação à química, distribuição espacial e o intervalo de tempo em que os tecidos em decomposição são adequados para utilização, o que pode causar estresse ao desenvolvimento das moscas. Por isso, o objetivo deste trabalho foi verificar, através da morfometria geométrica, os efeitos do uso dos diferentes hospedeiros sobre estruturas morfológicas sensíveis a alterações ambientais, as asas e o edeago, em *D. m. sonorensis* amostrada em três localidades do Deserto de Sonora no México. Para tanto, larvas de 2º estágio foram semeadas em dietas semi-naturais de cladódio de *S. thurberi* e de frutos de *Opuntia spp.* Os adultos obtidos foram colocados em etanol e armazenados a -20°C para posterior remoção das asas e edeagos, que foram utilizados nas análises morfométricas. Foram realizadas análises morfométricas das asas comparando os níveis de assimetria entre as dietas e localidades para medir o nível de estresse larval, análises de forma e tamanho das asas, e análises de forma e tamanho dos edeagos para medir alterações morfométricas nos adultos. Dentre os resultados obtidos, foi verificado a ocorrência de variação fenotípica das asas e do edeago, tanto entre as populações quanto entre as dietas. Cada população possui um conjunto genético específico e respondeu de forma diferente quando sujeitas as mesmas dietas. As asas apresentaram desvio da simetria, com assimetria flutuante e direcional em machos e fêmeas, demonstrando que há estresse no desenvolvimento larval em ambas as dietas, causado provavelmente por compostos químicos específicos de cada hospedeiro, aleloquímicos nos cladódios e açúcares nas tunas. As populações com respostas análogas às mesmas pressões ambientais, apresentaram uma proximidade fenotípica. A capacidade desses organismos em explorar dois hospedeiros distintos pode ser um benefício, aumentando o nicho e reduzindo a competitividade intra e interespecífica. Assim, as alterações morfológicas causadas pelo estresse ambiental detectadas neste trabalho, podem levar a modificações na biologia, ecologia e evolução destes organismos. Por isso, futuros trabalhos investigando a composição química de diferentes hospedeiros, e a influência de cada hospedeiro sobre o organismo dos insetos são de grande valia para os estudos biológicos e evolutivos.

**Palavras-chave:** asa, assimetria, edeago, morfometria geométrica, plasticidade fenotípica, sazonalidade alimentar, variabilidade populacional.

## ABSTRACT

Many insects are saprophytophagous and use host plants during their life cycle. Among these are the flies of the *Drosophila* genus (Diptera: Drosophilidae). Changing host requires the flies to have adaptation ability to new biotic factors. The cactophilic subspecies *Drosophila mojavensis sonorensis* belongs to the *repleta* group, inhabits the Sonora Desert and participates in the cactus - yeast - *Drosophila* system. Usually it uses rotting cladodes of the columnar cactus *Stenocereus thurberi*, but recently these flies were also detected using decomposing fruits of *Opuntia spp.* as alternative seasonal host. These two hosts have several differences regarding their chemistry, spatial distribution and the time interval in which the decomposing tissues are suitable for use, which can cause stress to the development of the flies. Therefore, the objective of this study was to verify, through the geometric morphometry, the effects of the use of the different hosts on morphological structures sensitive to environmental changes, the wings and the aedeagus, in *D. m. sonorensis* sampled at three locations in the Sonora Desert in Mexico. For this, 2nd instar larvae were seeded in semi-natural diets containing or cladodes of *S. thurberi* or fruits of *Opuntia spp.* The adults obtained were placed in ethanol and stored at -20°C for later wings and aedeagus removal, which were used in the morphometric analyzes. Morphometric analyzes of the wings were performed using two approaches: 1) comparing the levels of asymmetry between the diets and localities to measure larval stress level; and 2) analyzing wing shape and size. The aedeagi were analyzed regarding morphometric alterations in shape and size. Among the results, it was verified the occurrence of phenotypic variation of the wings and the aedeagus, both among populations and between diets. Each population showed to have a specific genetic pool and responded differently when subjected to the diets. The wings presented asymmetric deviation, with fluctuating and directional asymmetry in males and females, demonstrating that there is stress in larval development in both diets, probably caused by specific chemical compounds of each host, allelochemicals in cladodes and sugars in tunas. Populations with similar responses to the same environmental pressures showed a phenotypic proximity. The ability of these organisms to explore two different hosts can be an advantage, increasing the niche and reducing intra and interspecific competitiveness. So, the morphological changes, caused by the environmental stress detected in this study, may lead to changes in the biology, ecology and evolution of these organisms. Therefore, further studies investigating the chemical composition of different hosts, and the influence of each host on the organism of the insects are important for biological and evolutionary studies.

**Keywords:** Asymmetry, aedeagus, food seasonality, geometric morphometry, phenotypic plasticity, population variability, wing.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização das subespécies de *Drosophila mojavensis* na América do Norte. Linha contínua, separação entre México e Estados Unidos. Linhas tracejadas, separação entre estados. Modificado de Matzin e Markow (2013).....13
- Figura 2.** Localização das subespécies de *Drosophila mojavensis* e pontos de amostragem de *Drosophila mojavensis sonorensis*.Linha contínua, separação entre México e Estados Unidos. Linhas tracejadas, separação entre estados. Em vermelho os três pontos de amostragem que constituíram as três amostras populacionais deste trabalho: Nogales (estrela), Obregon (triângulo) e Las Bocas (círculo). Modificado de Matzin e Markow (2013).....17
- Figura 3.** Vista dorsal da asa direita de *Drosophila mojavensis sonorensis* com a posição dos 12 marcos anatômicos do tipo I.....26
- Figura 4.** Diagrama da diferença entre as médias de forma da asa esquerda (linhas cinzas) e asa direita (linhas pretas), correspondendo a assimetria direcional em *Drosophila mojavensis sonorensis*. A. Fêmeas. B. Machos. Deformações ampliadas 20 vezes.....31
- Figura 5.** Gráfico da Assimetria Global das fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis*. AF, assimetria flutuante (cinza escuro); AD, assimetria direcional (cinza claro); C, cladódio; T, tuna.....34
- Figura 6.** Gráfico da Assimetria Global dos machos de *Drosophila mojavensis sonorensis*. AF, assimetria flutuante (cinza escuro); AD, assimetria direcional (cinza claro); C, cladódio; T, tuna.....35
- Figura 7.** Vista dorsal da asa direita de *Drosophila mojavensis sonorensis* com a posição dos 12 marcos anatômicos do tipo I.....46
- Figura 8.** Distribuição dos seis grupos de tratamento de *Drosophila mojavensis sonorensis* no espaço das Variáveis Canônicas. Entre parênteses estão representadas as porcentagens da variância na forma. Os diagramas das asas representados em cada eixo expressam a variação da forma para os extremos positivos e negativos da variável canônica 1 e 2. As linhas escuras dos diagramas representam as deformações nas asas, e as linhas claras a média das deformações da configuração consenso.....49
- Figura 9.** Análise Discriminante da forma das asas entre as dietas de cladódio e tuna na população de Las Bocas, Nogales e Obregon. A direita da imagem, os diagramas derivados da Análise Discriminante referente a cada população. As linhas escuras dos diagramas representam as deformações nas asas dos machos de tuna, e as linhas claras dos machos de cladódio. Deformações ampliadas 20 vezes.....51

**Figura 10.** Plasticidade fenotípica do tamanho da asa direita (média +/- erro padrão) das populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, submetidas às dietas de cladódios (linhas pretas) e tunas (linhas vermelhas).....52

**Figura 11.** Vista lateral do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*, mostrando a delimitação da região distal utilizada para a realização dos contornos e posteriores análises morfométricas. A = Tronco; B = Cabeça; C = Processo ventral.....63

**Figura 12.** Distribuição espacial da variação morfológica da forma do edeago para os Componentes Principais 1 e 2 (PC1 e PC2), com o erro padrão de cada média das três populações de *Drosophila mojavensis sonorensis* desenvolvidas nas dietas de cladódio e tuna. Círculos = Nogales; Triângulos = Las Bocas; Quadrados = Obregon. Símbolos cheios = tuna; Símbolos vazios = cladódio. Os contornos de edeagos representados em cada eixo expressam a variação da forma para cada componente principal em dois desvios padrão da média.....66

**Figura 13.** Variação da forma do edeago em *Drosophila mojavensis sonorensis* entre a dieta de cladódio e tuna descrita pelos cinco primeiros Componentes Principais (PCs) através da reconstrução do contorno. Primeira coluna, estão representadas todas as áreas de variação do edeago expressas por linhas sobrepostas. Demais colunas, variação dos contornos sem sobreposição. Mean = média; -2S.D. = menos dois desvios padrão; +2S.D. = mais dois desvios padrão.....67

**Figura 14.** Plasticidade fenotípica do tamanho do edeago (média +/- erro padrão do número de pixels da área do contorno do edeago) das populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, submetidas às dietas de cladódios (linhas pretas) e tunas (linhas vermelhas).....68



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição química das dietas semi-naturais dos cladódios de *Stenocereus thurberi* (cacto colular), e dos frutos de *Opuntia spp.* (tuna), testadas para *Drosophila mojavensis sonorensis*.....19
- Tabela 2.** Número e sexo dos indivíduos de cada população de *Drosophila mojavensis sonorensis* utilizados para as análises morfométricas de assimetria da asa.....25
- Tabela 3.** ANOVA de Procrustes das populações e dietas testando a assimetria da forma de fêmeas e machos de *Drosophila mojavensis sonorensis*.....29
- Tabela 4.** Diferenças na assimetria de forma da asa de fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas na ANOVA de Procrustes.....30
- Tabela 5.** Diferenças na assimetria de forma da asa de machos de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas na ANOVA de Procrustes.....30
- Tabela 6.** Diferenças entre os níveis de Assimetria Global e Assimetria Flutuante para machos e fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas no Teste de Kruskal-Wallis.....32
- Tabela 7.** Variação entre os níveis de diferença observada e diferença crítica de Assimetria Global e Assimetria Flutuante para todos os grupos de machos e fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas no Teste de Comparação Múltipla após o Kruskal-Wallis.....33
- Tabela 8.** Variação entre os níveis de diferença observada e diferença crítica de Assimetria Global e Assimetria Flutuante entre as populações e dietas dos grupos de machos e fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas no Teste de Comparação Múltipla após o Kruskal-Wallis.....34
- Tabela 9.** Análise de forma da asa de *Drosophila mojavensis sonorensis*-porcentagem da variação da forma explicada pelos Componentes Principais (PCs).....48
- Tabela 10.** Distância de Mahalanobis entre os seis grupos de tratamento, obtidas a partir do teste de permutação. Dietas: Cladódio (C); Tuna (T). Populações: Las Bocas (B); Nogales (N); Obregon (O). Valores em negrito representam as menores distâncias entre os agrupamentos.....50
- Tabela 11.** ANOVA da plasticidade fenotípica do tamanho da asa direita das populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, submetidas às dietas de cladódios e tunas.....52

**Tabela 12.** Análise de forma do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*-  
porcentagem da variação da forma original explicada pelos Componentes Principais  
(PCs).....65

**Tabela 13.** MANOVA a partir dos cinco primeiros Componentes Principais (PCs) de  
variância da forma do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*.....66

**Tabela 14.** ANOVA a partir dos cinco primeiros Componentes Principais (PCs) de  
variância do tamanho do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*.....68

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1.	Locais de coleta.....	17
3.2.	Criação e meio de cultura.....	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
<b>CAPÍTULO I- ASSIMETRIA DA ASA EM <i>Drosophila mojavensis sonorensis</i> (DIPTERA: DROSOPHILIDAE): HOSPEDEIRO PRINCIPAL VERSUS SAZONAL.....</b>		<b>21</b>
5.	INTRODUÇÃO.....	22
6.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
6.1.	Preparo das amostras.....	26
6.2.	Obtenção dos dados morfométricos.....	28
7.	RESULTADOS.....	30
8.	DISCUSSÃO.....	35
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
<b>CAPÍTULO II - VARIAÇÃO FENOTÍPICA DAS ASAS DE <i>Drosophila mojavensis sonorensis</i> (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) EM RESPOSTA À SAZONALIDADE ALIMENTAR.....</b>		<b>40</b>
10.	INTRODUÇÃO.....	41
11.	METODOLOGIA.....	44
11.1.	Preparo das amostras e obtenção dos dados morfométricos.....	44
11.2.	Análises morfométricas e estatísticas da asa.....	45
12.	RESULTADOS.....	47
13.	DISCUSSÃO.....	53
14.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
<b>CAPÍTULO III – PLASTICIDADE FENOTÍPICA DOS EDEAGOS DE <i>Drosophila mojavensis sonorensis</i> (DIPTERA: DROSOPHILIDAE): HOSPEDEIRO PRINCIPAL VERSUS SAZONAL.....</b>		<b>57</b>
15.	INTRODUÇÃO.....	58

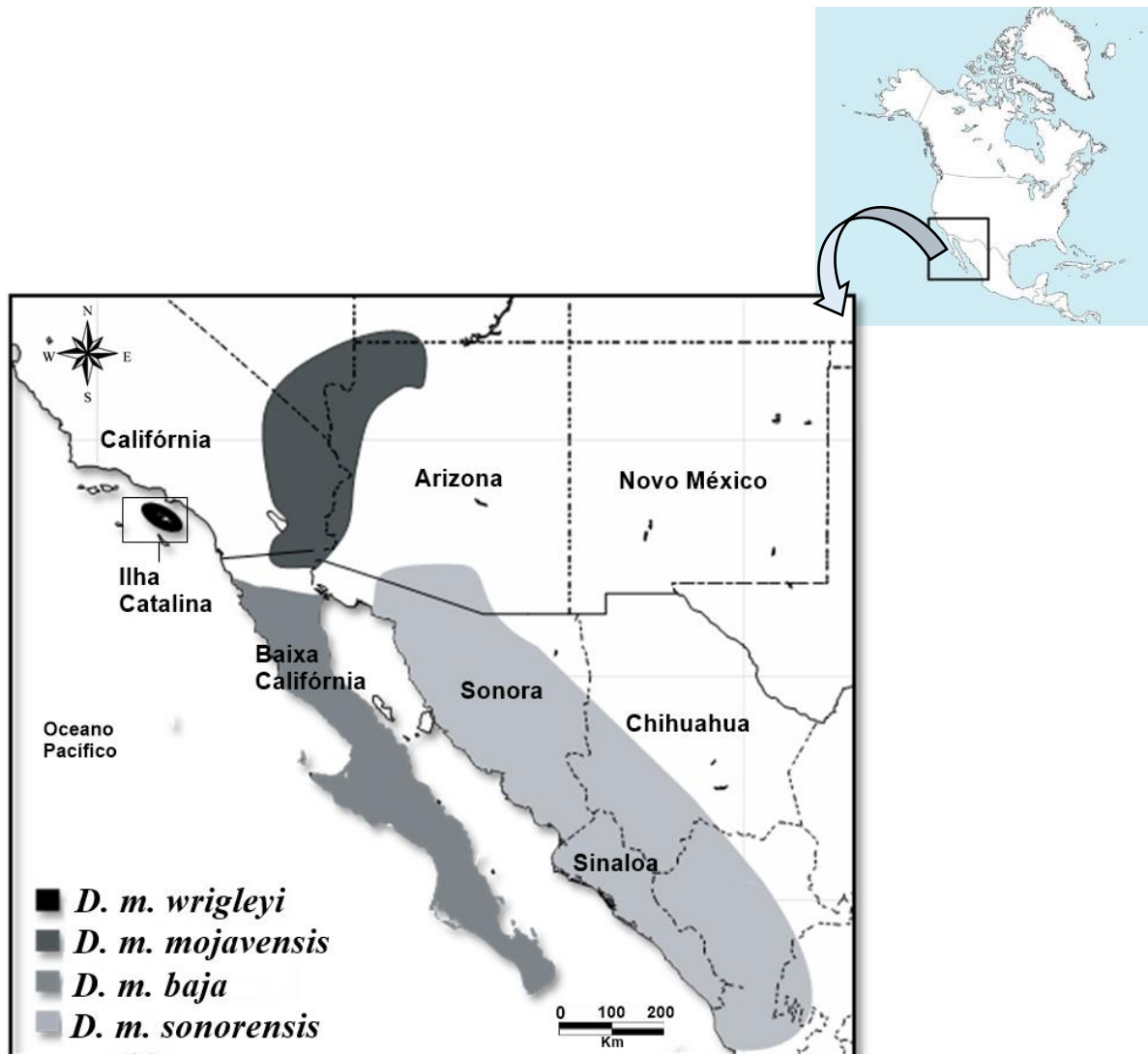
16.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
	16.1. Preparo dos edeagos e obtenção dos dados morfométricos.....	62
	16.2. Análises morfométricas e estatísticas do edeago.....	63
17.	RESULTADOS.....	65
18.	DISCUSSÃO.....	70
19.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
20.	CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS.....	74
21.	REFERÊNCIAS.....	75

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) é composto por moscas que são saprofitófagas, isto é, utilizam tecidos vegetais em decomposição como sítio de desenvolvimento larval, alimentando-se dos microrganismos associados a este processo (MARKOW e O'GRADY, 2008; SOTO et al., 2010). Neste gênero um dos grupos mais bem estudados é o grupo *repleta*, visto que este é um dos poucos grupos de moscas especialistas em que os seus integrantes possuem a habilidade de utilizar tecidos de cactos em decomposição como sítios primário de alimentação, desenvolvimento e oviposição (POWELL, 1997; OLIVEIRA et al., 2012). Outro único grupo dentro do gênero *Drosophila* também especialista é o grupo *nannoptera* (LANG et al., 2014).

Como o grupo *repleta* participa do sistema cacto – levedura – *Drosophila*, este grupo então é um ótimo modelo para verificar o papel evolutivo da utilização de planta hospedeira no processo de diversificação biológica (BARKER e STARMER, 1982; PEREIRA et al., 1983; HEED e MANGAN, 1986; BARKER et al., 1990; POWELL, 1997; ETGES e JACKSON, 2001). Uma das espécies representantes do grupo que utiliza este sistema de desenvolvimento é a *Drosophila mojavensis*, a qual é composta por quatro subespécies que se diferenciam geográfica e ecologicamente (FELLOWS e HEED, 1972; HEED, 1978; HEED, 1982; RUIZ et al., 1990; PFEILER et al., 2009): *Drosophila mojavensis baja*, *Drosophila mojavensis mojavensis*, *Drosophila mojavensis wrigleyi* e *Drosophila mojavensis sonorensis*.

As subespécies de *D. mojavensis* se alimentam, ovipositam e suas larvas se desenvolvem em tecidos necrosados de pelo menos quatro espécies de cactos (FELLOWS e HEED, 1972; HEED, 1978; HEED, 1982; RUIZ et al., 1990). *D. m. baja* ocorre na península da Baixa Califórnia e nas ilhas do Golfo Ocidental da Califórnia, e utiliza o cacto colunar *Stenocereus gummosus* (“Pitaya Agria”). *D. m. mojavensis* ocorre no Deserto de Mojave (do sul da Califórnia até noroeste do Arizona), e utiliza como hospedeiro o cacto *Ferocactus cylindaceus* (barril). *D. m. wrigleyi* é endêmica da Ilha Santa Catalina, Califórnia, e utiliza o cacto *Opuntia littoralis* (Figo-do-Inferno, “Prickly Pear”). E *D. m. sonorensis* ocorre no estado de Sonora e Sinaloa, México, até o sul do Arizona, EUA, e usualmente utiliza o cacto colunar *Stenocereus thurberi* (“Organ Pipe”) (Figura 1).



**Figura 1.** Localização das subespécies de *Drosophila mojavensis* na América do Norte. Linha contínua, separação entre México e Estados Unidos. Linhas tracejadas, separação entre estados. Modificado de Matzin e Markow (2013).

Apesar de cada subespécie de *D. mojavensis* ser especialista, recentemente Therese Ann Markow (comunicação pessoal), realizando coletas de *Drosophila mojavensis* em áreas naturais de ocorrência da subespécie *D. m. sonorensis*, verificou a presença desta em frutos em decomposição de cactos do gênero *Opuntia spp.*, frutos estes que também são conhecidos como “tunas”. Esta observação é relevante pois as tunas são sazonais, e quando não estão disponíveis, a subespécie *D. m. sonorensis* utiliza normalmente os cladódios de *S. thurberi*, seu hospedeiro primário. Isto quer dizer que a subespécie está sujeita a utilização sazonal de uma dieta diferente da usual, em várias etapas do desenvolvimento.

As espécies de cacto (Cactaceae) hospedeiras de *Drosophila*, em geral, podem ser classificadas em dois grandes grupos ecológicos. O primeiro grupo seria o das espécies do gênero *Opuntia* e o segundo dos cactos colunares, o qual compreendem vários gêneros, como o *Trichocereus* na América do Sul e o *Stenocereus* na América do Norte (BREITMEYER e MARKOW, 1997; HASSON et al., 2009). Os cactos de ambos os gêneros, *Opuntia* e *Stenocereus*, possuem grandes quantidades de complexos químicos, como os ácidos graxos, glicosídeos, triterpenos e dióis de esteróis (FOGLEMAN e DANIELSON, 2001). Segundo Fanara et al. (1999), diferenças entre os grupos de cactos, com relação à sua química, distribuição espacial e o intervalo de tempo em que os tecidos em decomposição são adequados para as moscas, podem representar desafios aos adultos e ao desenvolvimento larval.

Segundo SOTO et al. (2010), a variação ambiental causada pela utilização de diferentes hospedeiros pode apresentar novos desafios para as moscas, pois é necessário ocorrer um ajuste do organismo e do seu desenvolvimento a cada novo ambiente, cada qual possuindo características diferentes das quais eles estavam habituados anteriormente. A partir disto, torna-se necessário quantificar as possíveis alterações biológicas oriundas da sazonalidade alimentar de *D. m. sonorensis*, para identificar possíveis alterações na dinâmica e diferenciação populacional decorrentes de agentes estressores, o que pode ser realizado através de estudos envolvendo marcadores morfológicos (AVISE, 2000).

Os marcadores morfológicos são de fácil acesso e manuseio, e se associados com técnicas morfométricas tornam-se um método de estudo simples e confiável (LYRA et al., 2010). A Morfometria é o estudo estatístico da covariância relacionando as mudanças e variações no tamanho e na forma de uma estrutura ou organismo, com os fatores causais (BOOKSTEIN, 1991a; MONTEIRO e REIS, 1999). Esta técnica pode ser dividida em tradicional e geométrica. A morfometria tradicional aborda o estudo da covariância das medidas das distâncias lineares, entre pontos anatomicamente homólogos, que em geral são distâncias, áreas ou ângulos da estrutura estudada (ROHLF e MARCUS, 1993). Já a morfometria geométrica tem como foco a reconstrução da forma e a visualização das diferenças entre estruturas e organismos através de marcos anatômicos, que permitem a descrição e localização clara das regiões de ocorrência das mudanças (FORNEL, 2005; KILNGENBERG, 2013). A visualização contínua das mudanças da forma é

uma ferramenta importante para a compreensão de variação morfológica, e a partir disto a morfometria geométrica é utilizada para responder cada vez mais perguntas sobre a evolução e desenvolvimento dos organismos (KLINGENBERG, 2010; ADAMS, 2013).

Dentre os marcadores morfológicos utilizados em *Drosophila*, foi relatado que as asas e o edeago são sensíveis e respondem a processos seletivos (CARREIRA et al., 2008; MASLY et al., 2011; SOTO et al., 2008a). As asas são estruturas que possuem alta plasticidade fenotípica, e também são alvo de diferentes variações, como genéticas, fenotípicas, variações assimétricas e mudanças evolutivas (MONTEIRO e REIS, 1999; MORIN et al., 1999; CARREIRA et al., 2008; SOTO et al., 2008a; KLINGENBERG, 2014). Dentre os estudos realizados com asa em *Drosophila* os temas mais abordados são, diferenciação e caracterização de espécies (DUJARDIN et al., 2003; HOULE et al., 2003; VILLEMANT et al., 2007; HATADANI e KLACZKO, 2008; LUDOSKI et al., 2008), o efeito de fatores ambientais sobre a estrutura das asas com relação a sua forma e tamanho, o padrão de simetria destas estruturas bilaterais (COSTA et al., 2015), relacionado com as pressões seletivas (SOTO et al., 2008b, 2008c, 2010), e a identificação de distúrbios locais que podem romper a homogeneidade do desenvolvimento (MOLLER e SWADDLE, 1997; HOSKEN et al., 2000; KARK, 2001).

Por outro lado, o edeago, órgão copulador ou intromitente da genitália masculina em *Drosophila*, é utilizado muitas vezes para identificar e caracterizar espécies semelhantes (VILELA, 1983; VILELA e BÄCHLI, 1990; TIDON-SKLORZ e SENE, 1995; MORETEUAU et al., 2003; KULIKOV et al., 2004), em análises de estresse ambiental (ANDRADE et al., 2005), de divergência morfológica relacionada a divergência genética entre populações naturais (FRANCO et al., 2006), e de interação de acasalamento (RICHMOND, 2014). O estudo deste marcador implica no entendimento da evolução genital, rápida e divergente, que pode ser influenciada pela seleção natural e sexual, e também a sua expressão fenotípica pode ser influenciada por fatores ambientais (SOTO et al., 2007, 2008a).

Por conta do que foi apresentado acima, espera-se que as asas e o edeago sejam bons marcadores para analisar o efeito da dieta no desenvolvimento de *D. m. sonorensis* a partir da morfometria geométrica, e possibilitar a compreensão da relação entre a sazonalidade e possíveis alterações fenotípicas, o que poderá influenciar outras características destes organismos.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos de duas dietas semi-naturais utilizadas pela subespécie *Drosophila mojavensis sonorensis*, a usual em cladódios de *Stenocereus thurberi* e a alternativa sazonal nas tunas (frutos) de *Opuntia spp.*, sobre as características morfológicas, através das análises morfométricas da asa e do edeago.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar se houve alguma relação entre o desenvolvimento larval nos dois tipos de dieta com possíveis assimetrias bilaterais nas asas de machos e fêmeas das três populações analisadas desta subespécie, que possam ter sido ocasionadas por estresse no desenvolvimento;

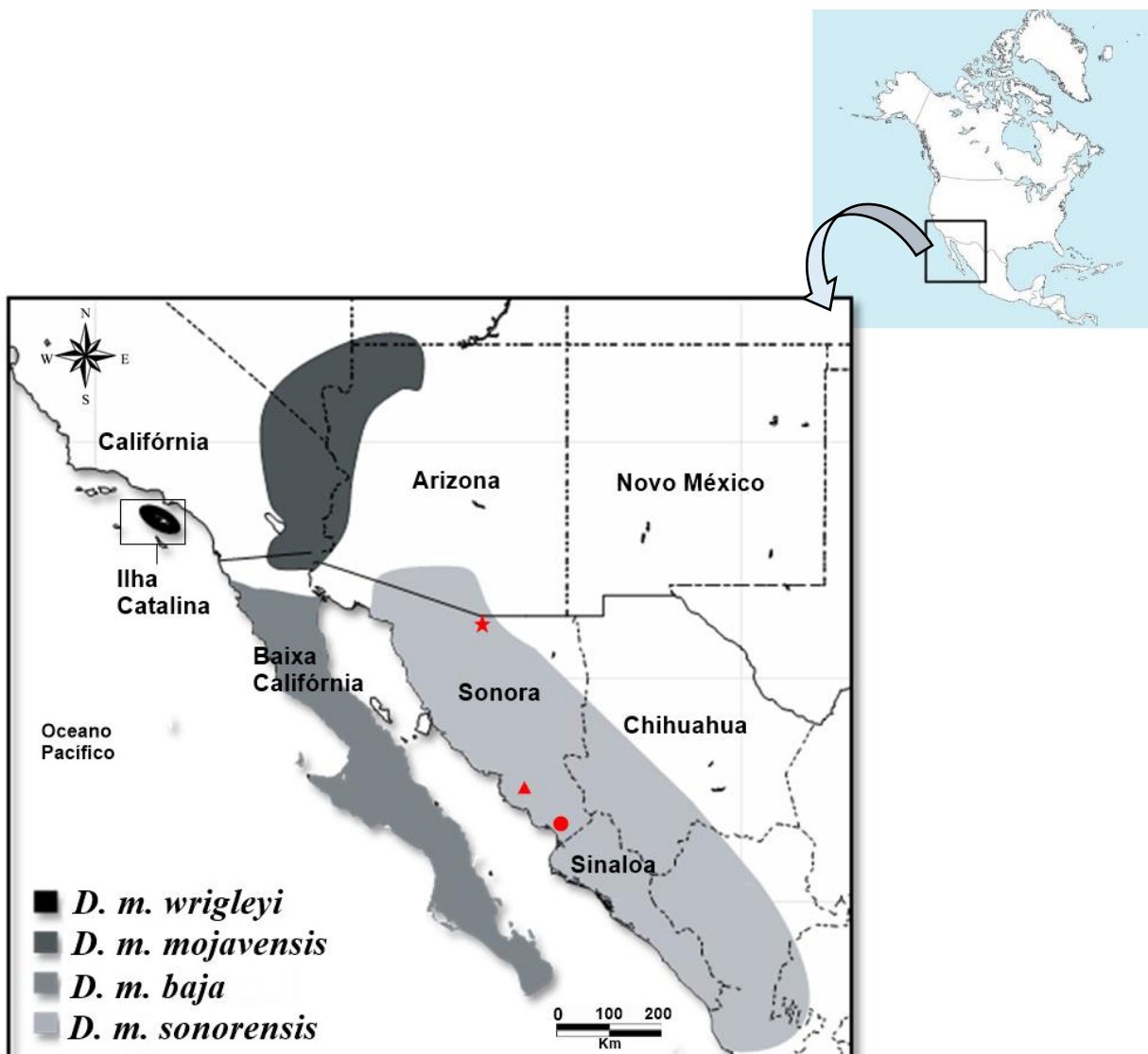
- Detectar possíveis alterações morfológicas nas asas de *D. m. sonorensis*, resultantes da sazonalidade alimentar, as quais podem levar a variações nos padrões evolutivos, ecológicos e fisiológicos desta subespécie;

- Avaliar o efeito das duas dietas, cladódio e tuna, sobre a morfologia do edeago dos machos das três populações de *D. m. sonorensis*, e relacionar com possíveis alterações evolutivas e reprodutivas provenientes da plasticidade fenotípica do órgão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Locais de coleta

Neste trabalho foram utilizados indivíduos de três localidades da subespécie *Drosophila mojavensis sonorensis*, estabelecidas a partir da progênie de fêmeas inseminadas naturalmente no Deserto de Sonora, no estado de Sonora, no México: Nogales, Obregon e Las Bocas (Figura 2).



**Figura 2.** Localização das subespécies de *Drosophila mojavensis* e pontos de amostragem de *Drosophila mojavensis sonorensis*. Linha contínua, separação entre México e Estados Unidos. Linhas tracejadas, separação entre estados. Em vermelho os três pontos de amostragem que constituíram as três amostras populacionais deste trabalho: Nogales (estrela), Obregon (triângulo) e Las Bocas (círculo). Modificado de Matzin e Markow (2013).

### 3.2. Criação e meio de cultura

As fêmeas adultas coletadas nos três pontos de amostragem (Nogales, Las Bocas e Obregon) foram colocadas para ovipositar em garrafas contendo 30 ml de meio de cultura padrão de *Drosophila*. As moscas filhas que emergiram das três isolinhagens, as quais nunca entraram em contato com o meio de cultura preparado com cacto em decomposição, foram mantidas em condições idênticas de meio padrão de banana e levedura, por três gerações. Após este período, foram separados 50 casais de cada linhagem, os quais foram colocados durante 24 horas em câmaras embrionárias contendo placas com ágar a 0,5%, levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e pedaços de tuna, para indução da oviposição.

Após o período de 24h, os casais foram retirados das câmaras embrionárias e depois de 48 horas, tempo para que as larvas eclodissem dos ovos e passassem pelo 1º instar, larvas de 2º instar foram retiradas das placas e colocadas em tubos contendo o meio de cultura semi-natural de cladódio de *Stenocereus thurberi* (cacto colunar), ou dos frutos de *Opuntia spp.* (tuna). Um total de 40 larvas por tubo foram colocadas para evitar o efeito de superpopulação. Foram preparados 10 tubos por dieta e por população, de acordo com o descrito por Soto et al. (2007). Após o desenvolvimento das moscas, os indivíduos adultos que emergiram de cada meio de cultura semi-natural foram identificados, sexados, separados, colocados em tubos com etanol e armazenados a 20°C negativos. Todos os experimentos foram realizados a 25°C ± 1°C em um fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro).

Para obtenção do meio de cultura semi-natural pedaços de cladódios de cactos colunares e de tunas frescos, e também o líquido exsudado dos cladódios e tunas em decomposição ocorrendo naturalmente, foram coletados e levados ao laboratório. Os pedaços de cladódios e tunas frescos foram armazenados a 20°C graus negativos, e o líquido de fermentação foi mantido a 4°C, adicionando 10 g de cladódio/tuna frescos a cada duas semanas, até o início dos experimentos. Para a preparação dos meios semi-naturais pedaços de cladódio ou tuna foram triturados com 200 ml de água destilada em um liquidificador, e foi considerado que metade do triturado corresponderia à água do próprio material vegetal, descontada a quantidade de água adicionada. A partir daí, calculou-se uma proporção de 1% de ágar para a quantidade de água presente na mistura, a qual foi adicionada e em seguida a mistura foi submetida a aquecimento para sua dissolução. Após o

aquecimento, aproximadamente 6 g deste material foi transferido para tubos de vidro. Os tubos foram estocados a 25°C por 24 horas antes da transferência das larvas. Após este período, eles foram inoculados com 0,1 ml do líquido em fermentação da parte do cacto correspondente (cladódio ou tuna). A composição de cada meio semi-natural foi analisada pelo laboratório Exova Inc. (Tabela 1).

Estas etapas do trabalho foram desenvolvidas no ano de 2014 durante o estágio de Pós-Doutorado do Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus e do estágio da Licença Sabática da Profa. Dra. Luciana Paes de Barros Machado, realizados no Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad – LANGEBIO, do Centro de Investigación y de Estudios Avanzados – CINVESTAV, do Instituto Politécnico Nacional – IPN, em Irapuato, Estado de Guanajuato, México, sob supervisão e colaboração da Profa. Dra. Therese Ann Markow. Já os materiais e métodos específicos, referentes às análises morfométricas de asas e edeagos das moscas adultas provenientes de cada meio de cultura, estão descritos a seguir nos capítulos correspondentes.

**Tabela 1.** Composição química das dietas semi-naturais dos cladódios de *Stenocereus thurberi* (cacto colular), e dos frutos de *Opuntia spp.* (tuna), testadas para *Drosophila mojavensis sonorensis*.

	Umidade	Gordura	Proteína	Carboidrato	Açúcar	Caloria
<b>Cladódio</b>	93,1%	0,7%	0,3%	5,2%	0,4%	28/100g
<b>Tuna</b>	92,8%	ND	0,3%	6,8%	5,2%	28/100g

ND = nada detectado (<0,1%)

Gordura = saturada, monoinsaturada, poliinsaturada, trans, omega-3, -6, -9, ácidos graxos.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho estão descritos a seguir nos três capítulos correspondentes a artigos científicos a serem publicados em revistas com Qualis igual ou superior a B1 na área de Biodiversidade da CAPES.

**Capítulo I- Assimetria da asa em *Drosophila mojavensis sonorensis*  
(Diptera: Drosophilidae): hospedeiro principal versus sazonal**

## 5. INTRODUÇÃO

A simetria é uma característica biológica de grande importância em *Drosophila*, pois foi verificado que populações de moscas mais simétricas tendem a apresentar maior estabilidade no seu desenvolvimento, sucesso reprodutivo e taxa de sobrevivência em comparação com populações assimétricas que estão estressadas (SOTO et al., 2008a, 2008b, 2008c). A estabilidade do desenvolvimento resulta de mecanismos de correção, os quais protegem as estruturas de perturbações ambientais (SOTO et al., 2010). Esta estabilidade pode ser rompida, ou, perturbada por fatores como a temperatura, densidade populacional, fragmentação de habitat e variação nutricional (MOLLER e SWADDLE, 1997; LENS et al., 1999; HOSKEN et al., 2000). Um bom indicador da instabilidade do desenvolvimento é o padrão de simetria apresentado por estruturas simétricas em um grupo de organismos. Isto porque, ambos os lados de um organismo estão sob o controle das mesmas vias genéticas durante o desenvolvimento, o que leva a acreditar que se há um desvio no padrão de simetria de um grupo, provavelmente este esteja relacionado com perturbações locais que levaram ao rompimento da homeostasia do desenvolvimento, ocasionando a assimetria (HOSKEN et al., 2000; BREUKER et al., 2006).

A assimetria é um desvio da simetria (KLINGENBERG et al., 2002). Em geral três tipos de assimetria são distinguidos de acordo com a distribuição das diferenças entre as médias dos lados direito e esquerdo de um grupo amostral ou de uma população: assimetria direcional, assimetria flutuante e antissimetria (VAN VALEN, 1962; PALMER e STROBECK 1986, 2003). Os tipos de assimetria possuem diferentes características estatísticas, origens e consequências biológicas (KLINGENBERG, 2015). A assimetria direcional é influenciada por fatores genéticos, possui um padrão de variação entre os lados direito e esquerdo e, é distribuída sobre uma média populacional que difere de zero, com distribuição normal (PALMER e STROBECK, 2003; KLINGENBERG et al., 1998). Pode-se quantificá-la a partir da diferença entre o lado direito e esquerdo, contudo possui uma magnitude muito baixa em insetos que é comumente encontrada em estudos com insetos (KLINGENBERG et al., 1998; PITHER e TAYLOR, 2000). Por outro lado, a assimetria flutuante possui um padrão de variação aleatório com distribuição normal sobre uma média populacional zero entre os lados direito e esquerdo (VAN VALEN,

1962; PALMER, 2003). Este tipo de assimetria é geralmente associada com alterações ambientais que agem como estressores para os organismos, já que expressa a dificuldade de superar perturbações (PALMER, 1994; KLINGENBERG e MCINTYRE, 1998; KLINGENBERG et al., 2015). A antissimetria é o tipo de assimetria no qual uma grande parcela dos indivíduos de uma população é assimétrica, mas diferem nas direções das assimetrias (KLINGENBERG, 2015). O padrão de variação entre os lados direito e esquerdo é correlacionado e bimodal, distribuído sobre uma média zero, porém a frequência de distribuição não possui normalidade (PALMER e STROBECK, 2003; PALMER, 2005).

Uma das estruturas mais utilizadas como indicadora de assimetria em *Drosophila* é a asa, a qual possui alta plasticidade fenotípica, e também é alvo de diferentes variações, como genéticas, fenotípicas e mudanças evolutivas (MONTEIRO e REIS, 1999; MORIN et al., 1999; CARREIRA et al., 2008; SOTO et al., 2008a; KLINGENBERG, 2014). Esta estrutura possui veias que fornecem muitos marcos anatômicos, além do seu desenvolvimento em *Drosophila* já ser bem compreendido (STARK et al., 1999; KLINGENERG e ZAKLAN, 2000). A análise de asa também é vantajosa, por conta da facilidade e velocidade de preparação do material, além da rapidez da digitalização das imagens e baixo custo de obtenção dos dados das amostras. Porém, a danificação de uma asa pode representar uma desvantagem às análises (HOULE et al., 2003; LYRA et al., 2010).

As moscas do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) são saprofitófagas e utilizam plantas hospedeiras no seu ciclo de vida. Os tecidos vegetais em decomposição servem como sítio de desenvolvimento larval e alimentação larval e de adultos, que se alimentam das leveduras associadas a este processo (PEREIRA et al., 1983; MARKOW e O'GRADY, 2008). A troca de hospedeiro faz com que o organismo dessas moscas necessite se ajustar ao novo ambiente, o qual possui características diferentes das encontradas habitualmente (SOTO et al., 2010). Algumas espécies deste gênero participam do sistema cacto – levedura – *Drosophila*, sendo denominadas cactófilas, e representam um bom modelo para verificar o papel evolutivo da utilização de planta hospedeira no processo de diversificação biológica (BARKER e STARMER, 1982; PEREIRA et al., 1983; HEED e MANGAN, 1986; BARKER et al., 1990; POWELL, 1997; ETGES e JACKSON, 2001).



A subespécie cactofílica *Drosophila mojavensis sonorensis* do grupo *repleta* habita o Deserto de Sonora e utiliza geralmente cladódios do cacto colunar *Stenocereus thurberi* (PFEILER et al., 2009). Porém, recentemente Therese Ann Markow (comunicação pessoal), realizando coletas de *D. mojavensis*, constatou que esta subespécie também utiliza frutos (tunas) em decomposição do cacto do gênero *Opuntia spp.* como hospedeiros sazonais. Quando estes frutos não estão disponíveis, as moscas utilizam o seu hospedeiro primário, os cladódios do cacto colunar *S. thurberi*, demonstrando haver uma sazonalidade alimentar.

Sabe-se que os dois hospedeiros possuem composições distintas. Os cladódios de cactos colunares, como é o caso da espécie *S. thurberi*, possuem muitos aleloquímicos como alcalóides, ácidos graxos de cadeia média, esteróides e glicosídeos triterpenos (FOGLEMAN e DANIELSON, 2001). Já os frutos de *Opuntia spp.* possuem uma alta quantidade de açúcares, glicose e frutose, que servem como fonte imediata de energia, além de possuírem menos compostos agressivos que os cladódios (SÁENZ e SEPULVEDA, 1990; FEUGANG et al., 2006; CARREIRA et al., 2014). Segundo Fanara et al. (1999), diferenças entre os grupos de cactos, com relação à sua composição química, distribuição espacial e o intervalo de tempo que os tecidos em decomposição são adequados para as moscas, podem representar desafios aos adultos e ao desenvolvimento larval.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a quantidade e a qualidade dos nutrientes consumidos pelos organismos têm influência sobre diversas características, incluindo história de vida, vulnerabilidade a doenças, fertilidade, reprodução, longevidade e resistência a estresse (RION e KAWECKI, 2007; LEE et al., 2008), além de afetar o padrão transcricional (MATZKIN et al., 2006; MATZKIN, 2012; MATZKIN e MARKOW, 2013), características fisiológicas e o metabolismo (MARKOW et al., 1999; KAUN et al., 2008; REED et al., 2010; MATZKIN et al., 2011, 2013), inclusive em mais de uma geração (MATZKIN et al., 2013).

Assim, a hipótese deste trabalho é que como a mudança da qualidade nutricional pode ter um efeito estressante no organismo, é esperado que o excesso de compostos secundários e a ausência de açúcar na dieta semi-natural de cladódio gere instabilidade no desenvolvimento de *D. m. sonorensis*, e conseqüentemente um maior nível de assimetria. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi testar o efeito de duas dietas semi-naturais, dos hospedeiros primário (cladódios de *S. thurberi*) e sazonal (tunas de *Opuntia spp.*), no desenvolvimento de *D. m. sonorensis* utilizando

o nível de assimetria da asa como índice de instabilidade do desenvolvimento frente a composição diferencial dessas fontes alimentares.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. Preparo das amostras

Para as análises morfométricas de assimetria da asa foi utilizado um total de 1160 indivíduos de ambos os sexos pertencentes a três populações (Las Bocas, Nogales e Obregon), que foram submetidos a duas dietas (cladódios de *Stenocereus thurberi* e tunas de *Opuntia spp.*). Como regra, todos os indivíduos que emergiram foram utilizados nas análises, até um número máximo de 100 indivíduos de cada grupo (Tabela 2).

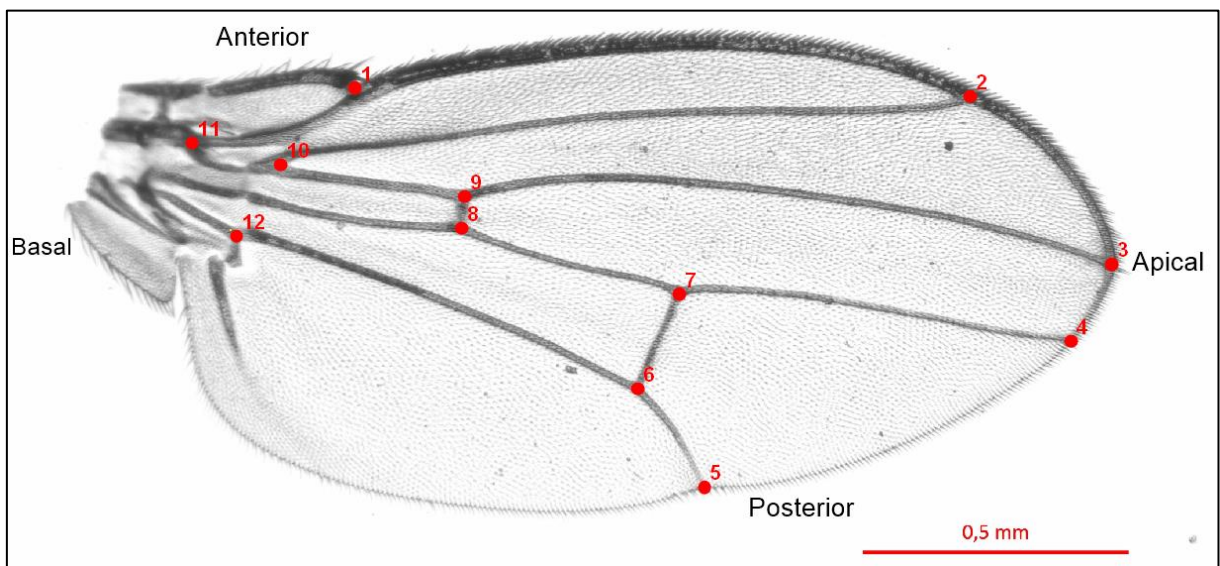
**Tabela 2.** Número e sexo dos indivíduos de cada população de *Drosophila mojavensis sonorensis* utilizados para as análises morfométricas de assimetria da asa.

População	Dieta	Número de machos	Número de fêmeas
<b>Las Bocas</b>	Cladódio	100	100
	Tuna	100	100
<b>Nogales</b>	Cladódio	100	100
	Tuna	74	100
<b>Obregon</b>	Cladódio	96	90
	Tuna	100	100

As asas direita e esquerda de cada indivíduo de *D. m. sonorensis*, de acordo com a dieta, sexo e população, foram removidas, submersas em álcool 70% e montadas em lâminas sobrepostas com lamínulas. Em seguida as imagens das asas foram capturadas utilizando um microscópio óptico (Stemi 2000 C, Zeiss) com aumento de 40X, com câmera 5 MP acoplada, com o auxílio do programa ZEN blue edition v.1.0.1.0 (Carl Zeiss Microscopy GMBH, 2011).

Após a captura das imagens, foi criado para cada grupo um arquivo base no programa tps Utility v.1.61 (ROHLF, 2013), a fim de ser utilizado na obtenção dos marcos anatômicos e das marcações. Em seguida, foram inseridos doze marcos anatômicos do tipo I na região dorsal de cada asa. Estes marcos caracterizam-se por serem pontos no espaço onde três estruturas se encontram, como intersecções de veias, ou, onde a veia encontra a margem da asa (BOOKSTEIN, 1991b;

HOFFMANN, SHIRRIFFS, 2002.). A ordem de introdução dos marcos foi a mesma para todas as asas, caso contrário, poderiam ocorrer problemas com o estabelecimento da homologia espacial das estruturas e suas coordenadas. Isto porque, cada marco anatômico é definido por uma coordenada  $xy$ , a qual é formada por um valor  $x$  (abscissa) e um valor  $y$  (ordenada) no plano cartesiano (MONTEIRO e REIS, 1999). Neste caso, foram obtidas doze coordenadas  $xy$  para cada asa (Figura 3).



**Figura 3.** Vista dorsal da asa direita de *Drosophila mojavensis sonorensis* com a posição dos 12 marcos anatômicos do tipo I.

Em cada grupo de imagens foram realizadas, pela mesma pessoa, duas repetições de marcação em dois dias diferentes, a fim de medir o erro causado pela inserção manual dos marcos (ARNQVIST & MARTENSSON, 1998). Tanto a obtenção de marcos anatômicos, quanto as duas repetições de marcação, foram realizadas a partir do arquivo base utilizando o programa tpsDig2 v.2.19 (ROHLF, 2015).

## 6.2. Obtenção dos dados morfométricos

Para testar a assimetria da forma das asas foi necessário primeiramente realizar a reflexão, já que em análises que envolvem objetos não-simétricos ou estruturas espelhadas como as asas, a reflexão entre o lado esquerdo e o lado direito possibilitam a utilização no mesmo sentido para a mesma análise

(KLINGENBERG e MCINTYRE, 1998; AUFRAY et al., 1999). Neste caso, a assimetria da forma e do tamanho das asas são duas questões diferentes, as quais são abordadas em análises distintas, ao contrário do que acontece com objetos simétricos, como a face ou carapaça de um animal, onde se realiza apenas análise de forma, pois estas variáveis são interdependentes (KLINGENBERG et al., 2002; KLINGENBERG, 2015). Em seguida, realizou-se a Superposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes, alinhando as configurações individuais (DRYDEN e MARDIA, 1998). Este método transforma uma configuração de marcos, superpondo-a sobre uma configuração de referência, de modo que a soma dos quadrados das distâncias entre os pontos correspondentes em ambas as configurações seja a menor possível (MONTEIRO e REIS, 1999). Para que se possa realizar a sobreposição é necessário transladar, proporcionalizar e rotacionar as coordenadas, retirando o efeito de tamanho, sentido e posição.

Em seguida foi realizada a ANOVA de Procrustes para averiguar a existência de assimetria direcional e flutuante. Esta ANOVA utilizou as coordenadas de Procrustes alinhadas como variáveis dependentes, e os graus de liberdade são calculados a partir da multiplicação do número de graus de liberdade de cada fator pelo número total de dimensões do espaço da forma (KLINGENBERG e MCINTYRE, 1998). Os classificadores extraídos dos dados foram: indivíduo, lado, dieta, população e erro. Os indivíduos foram utilizados como fator individual, o lado (direito e esquerdo) foi utilizado com fator fixo, enquanto que a repetição foi considerada um fator de erro. Os classificadores dieta (cladódio e tuna) e população (Las Bocas, Nogales e Obregon) foram considerados como fatores extras. A assimetria foi medida como o desvio existente em relação a sobreposição perfeita entre a asa direita e a asa esquerda de cada indivíduo (MARCHAND et al., 2003). Por conta disto, o fator lado correspondeu à assimetria direcional, já a interação entre lado e indivíduo correspondeu à assimetria flutuante (PALMER e STROBECK, 2003).

A assimetria global, composta pela assimetria flutuante e direcional, foi extraída de cada indivíduo a partir das distâncias de Procrustes entre a asa direita e esquerda (MARCHAND et al., 2003). A distância de Procrustes entre a configuração média da asa direita e a configuração média da asa esquerda foi utilizada como o valor de assimetria direcional de cada grupo. Para obter o valor de assimetria flutuante em cada indivíduo foi necessário subtrair a assimetria direcional da global.

Foi verificado através da Análise de Kruskal-Wallis a variação da assimetria global e flutuante entre os seis grupos formados a partir da interação entre dieta e população. O teste de Kruskal-Wallis é uma extensão do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, e geralmente é utilizado quando os dados não são paramétricos e não é possível utilizar o teste da ANOVA. Este teste compara três ou mais amostras independentes, e indica se há diferença entre pelo menos duas das amostras. A aplicação do teste utiliza os valores numéricos transformados em postos agrupados num só conjunto de dados. A comparação dos grupos é realizada por meio da média dos postos (posto médio) (MCDONALD, 2014).

Todas as análises foram realizadas separadamente para machos e fêmeas. A Superposição dos quadrados mínimos de Procrustes, e a ANOVA de Procrustes foram realizadas utilizando o programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2014), enquanto que a Análise de Kruskal-Wallis foi realizada utilizando o programa R 3.3.0 (R Development core Team, 2016).

## 7. RESULTADOS

As ANOVAs de Procrustes para assimetria da forma das asas das populações e dietas mostraram resultados significativos para todos os traços tanto em fêmeas, quanto em machos de *D. m. sonorensis* (Tabela 3). Os resultados apresentados indicam assimetria direcional e assimetria flutuante em ambos os sexos. A variação explicada pelos quadrados médios da assimetria flutuante é maior que o erro em ambos os sexos.

**Tabela 3.** ANOVA de Procrustes das populações e dietas testando a assimetria da forma de fêmeas e machos de *Drosophila mojavensis sonorensis*.

	Efeito	QM	GL	F
<b>Fêmeas</b>	Dieta	0,0010907	20	27,90*
	População	0,0215003	40	550,00*
	Individual (I)	0,0000390	11720	3,59*
	Lado (L)	0,0001264	20	11,62*
	I x L	0,0000108	11780	7,11*
	Erro	0,0000015	23600	
<b>Machos</b>	Dieta	0,0007493	20	17,24*
	População	0,0230011	40	529,29*
	Individual (I)	0,0000434	11320	3,38*
	Lado (L)	0,0000329	20	2,56*
	I x L	0,0000128	11380	6,96*
	Erro	0,0000018	22780	

QM, quadrados médios; GL, graus de liberdade. \* $p < 0,001$ .

Contudo, os valores referentes a assimetria não são significativos em todos os grupos de tratamento quando os resultados são separados dentro do grupo de fêmeas e machos. A ANOVA de Procrustes para as fêmeas revelou que a diferença entre os lados, assim como, a interação lado X indivíduo foi significativa em ambas as dietas para todas as populações (Tabela 4). Porém, para os machos a ANOVA de Procrustes mostra que a diferença entre os lados só é significativa para machos da população de Nogales tratados com cladódio, e a interação lado X indivíduo foi significativa em ambas as dietas para todas as populações (Tabela 5).

**Tabela 4.** Diferenças na assimetria de forma da asa de fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas na ANOVA de Procrustes.

População	Efeito	Cladódio			Tuna		
		QM	GL	F	QM	GL	F
Las Bocas	Individual (I)	0,0000282	1980	2,30*	0,0000225	1980	2,09*
	Lado (L)	0,0000445	20	3,63*	0,0000499	20	4,61*
	I x L	0,0000122	1980	7,17*	0,0000108	1980	8,75*
	Repetição	0,0000017	4000		0,0000012	4000	
Nogales	Individual (I)	0,0000412	1980	3,48*	0,0000463	1980	4,61*
	Lado (L)	0,0000611	20	5,16*	0,0000284	20	2,83*
	I x L	0,0000118	1980	6,81*	0,0000100	1980	6,11*
	Repetição	0,0000017	4000		0,0000016	4000	
Obregon	Individual (I)	0,0000421	1780	4,29*	0,0000493	1980	5,08*
	Lado (L)	0,0000405	20	4,13*	0,0000269	20	2,77*
	I x L	0,0000098	1780	6,70*	0,0000097	1980	7,01*
	Repetição	0,0000014	3600		0,0000013	4000	

QM, quadrados médios; GL, graus de liberdade. \* $p < 0,001$ .

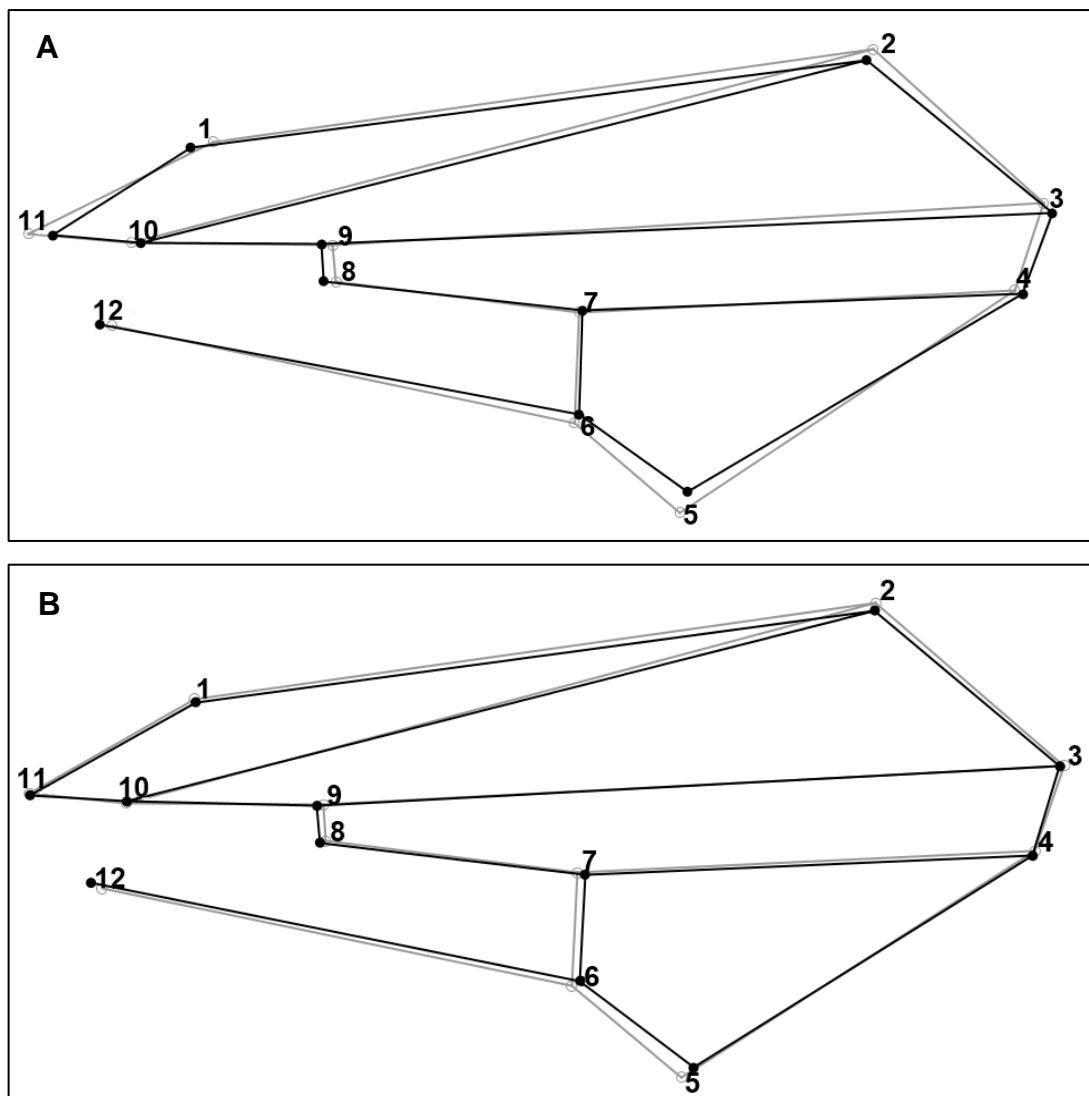
**Tabela 5.** Diferenças na assimetria de forma da asa de machos de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas na ANOVA de Procrustes.

População	Efeito	Cladódio			Tuna		
		QM	GL	F	QM	GL	F
Las Bocas	Individual (I)	0,0000366	1980	2,31*	0,0000230	1980	2,10*
	Lado (L)	0,0000189	20	1,19	0,0000151	20	1,38
	I x L	0,0000159	1980	9,37*	0,0000110	1980	5,67*
	Repetição	0,0000016	4000		0,0000019	4000	
Nogales	Individual (I)	0,0000450	1980	3,26*	0,0000453	1460	3,39*
	Lado (L)	0,0000443	20	3,21*	0,0000116	20	0,87
	I x L	0,0000138	1980	5,25*	0,0000133	1460	8,10*
	Repetição	0,0000026	4000		0,0000016	2940	
Obregon	Individual (I)	0,0000490	1900	4,22*	0,0000570	1980	5,04*
	Lado (L)	0,0000100	20	0,86	0,0000136	20	1,21
	I x L	0,0000116	1900	7,03*	0,0000113	1980	7,83*
	Repetição	0,0000016	3840		0,0000014	4000	

QM, quadrados médios; GL, graus de liberdade. \* $p < 0,001$ .



A análise do diagrama da diferença entre os lados direito e esquerdo em fêmeas demonstrou que a assimetria direcional está relacionada com deformações no eixo anteroposterior, envolvendo principalmente os marcos anatômicos 5, 6 na margem posterior, e o 2 na margem anterior da asa. As deformações também foram associadas com os marcos anatômicos 11 na base e 3 no ápice da asa, ocorrendo um deslocamento com direção a região apical (Figura 4A). Já nos machos a assimetria direcional está relacionada com deformações apenas no eixo anteroposterior, principalmente nos marcos anatômicos 2 e 5, ocorrendo uma leve compressão no eixo antero-posterior (Figura 4B).



**Figura 4.** Diagrama da diferença entre as médias de forma da asa esquerda (linhas cinzas) e asa direita (linhas pretas), correspondendo a assimetria direcional em *Drosophila mojavensis sonorensis*. **A.** Fêmeas. **B.** Machos. Deformações ampliadas 20 vezes.

O teste de Kruskal-Wallis realizado para as fêmeas demonstrou haver diferença entre os níveis de assimetria global quando comparado os seis grupos formados pela interação entre as três populações e as duas dietas, e também quando comparado apenas as populações. No entanto, não houve diferença entre os níveis de assimetria global para dieta nas fêmeas. Enquanto que, para os machos o teste de Kruskal-Wallis demonstrou haver diferença entre os níveis de assimetria global das dietas, das populações e da interação entre as dietas e populações. Com relação aos níveis de assimetria flutuante, não houve diferença significativa para as dietas, populações, ou interação entre as populações e dietas nas fêmeas e nos machos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Diferenças entre os níveis de Assimetria Global e Assimetria Flutuante para machos e fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas no Teste de Kruskal-Wallis.

		Assimetria Global		Assimetria Flutuante	
Interação		H	GL	H	GL
<b>Fêmeas</b>	Dieta (D)	0,43	1	1,27	1
	População (P)	8,77*	2	3,65	2
	D x P	11,88*	5	6,27	5
<b>Machos</b>	Dieta (D)	6,73**	1	1,93	1
	População (P)	12,27**	2	3,94	2
	D x P	18,57**	5	8,82	5

\*\*p<0,01 ; \*p<0,05

Comparando os níveis de assimetria global e flutuante a partir do teste posteriori do Kruskal-Wallis, foi possível verificar que as fêmeas e os machos apresentaram níveis semelhantes e não significativos de assimetria global na interação entre os grupos de dietas e populações (Tabela 7). Sendo que a diferença verificada entre as três populações, e entre as dietas é provavelmente em decorrência dos valores de assimetria direcional dos grupos. Quando comparado as dietas dentro das populações, o único valor significativo foi nos machos da população de Las Bocas. Enquanto que a diferença entre as populações foi significativa apenas na assimetria global de Las bocas – Obregon e Nogales –

Obregon (Tabela 8). As populações de Nogales e Obregon apresentaram níveis maiores de assimetria direcional na dieta de cladódio, enquanto que a população de Las Bocas na dieta de tuna (Figura 5). Os níveis de assimetria flutuante também foram semelhantes entre os grupos de tratamento dos machos, sendo que a diferença existente entre os grupos foi causada pela assimetria direcional. Os machos das populações de Las Bocas e Nogales apresentaram níveis mais altos de assimetria direcional na dieta de cladódio, enquanto que a população de Obregon na dieta de tuna (Figura 6).

**Tabela 7.** Variação entre os níveis de diferença observada e diferença crítica de Assimetria Global e Assimetria Flutuante para todos os grupos de machos e fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas no Teste de Comparação Múltipla após o Kruskal-Wallis.

Comparação	Fêmea			Macho		
	AG	AF	DC	AG	AF	DC
	DO	DO		DO	DO	
<b>CB-CN</b>	26,64	2,83	70,75	4,49	36,85	68,36
<b>CB-CO</b>	42,49	43,55	72,69	49,27	28,63	69,07
<b>CB-TB</b>	9,90	1,12	70,75	47,01	37,61	68,36
<b>CB-TN</b>	14,18	14,06	70,75	18,50	13,61	74,12
<b>CB-TO</b>	35,62	5,18	70,75	<b>77,12</b>	64,56	68,36
<b>CN-CO</b>	69,13	46,38	72,69	53,76	8,21	69,07
<b>CN-TB</b>	16,74	1,71	70,75	51,50	0,76	68,36
<b>CN-TN</b>	40,82	11,23	70,75	22,99	23,23	74,12
<b>CN-TO</b>	62,26	8,01	70,75	<b>81,61</b>	27,71	68,36
<b>CO-TB</b>	52,39	44,67	72,69	2,26	8,97	69,07
<b>CO-TN</b>	28,31	57,61	72,69	30,77	15,02	74,77
<b>CO-TO</b>	6,87	38,37	72,69	27,84	35,92	69,07
<b>TB-TN</b>	24,08	12,94	70,75	28,50	23,99	74,12
<b>TB-TO</b>	45,52	6,30	70,75	30,11	26,95	68,36
<b>TN-TO</b>	21,44	19,24	70,75	58,61	50,94	74,12

Em negrito os valores significativos.

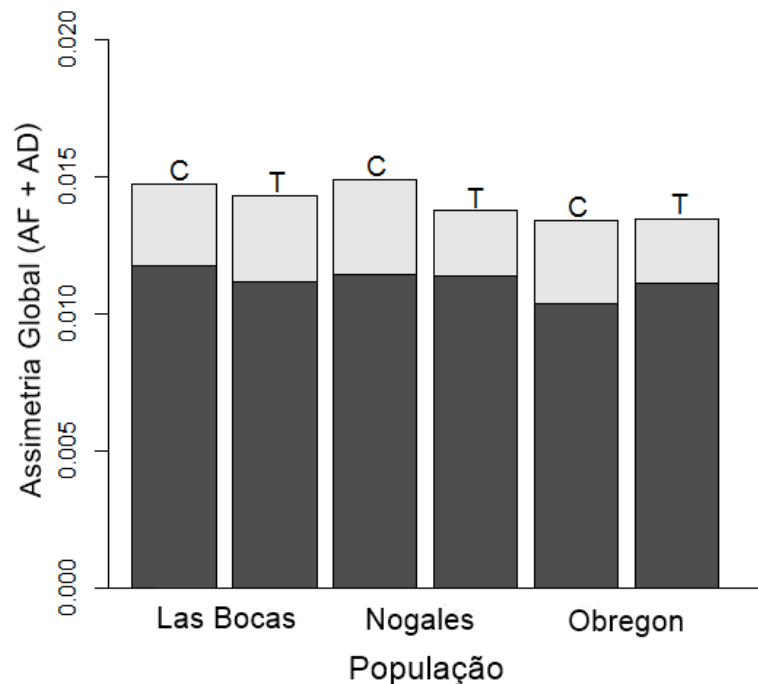
AG, assimetria global; AF, assimetria flutuante; DO, diferença observada; DC, diferença crítica; CB, cladódio-Las Bocas; CN, cladódio-Nogales; CO, cladódio-Obregon; TB, tuna-Las Bocas; TN, tuna-Nogales; TO, tuna-Obregon; C, cladódio; T, tuna.

**Tabela 8.** Variação entre os níveis de diferença observada e diferença crítica de Assimetria Global e Assimetria Flutuante entre as populações e dietas dos grupos de machos e fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis* baseadas no Teste de Comparação Múltipla após o Kruskal-Wallis.

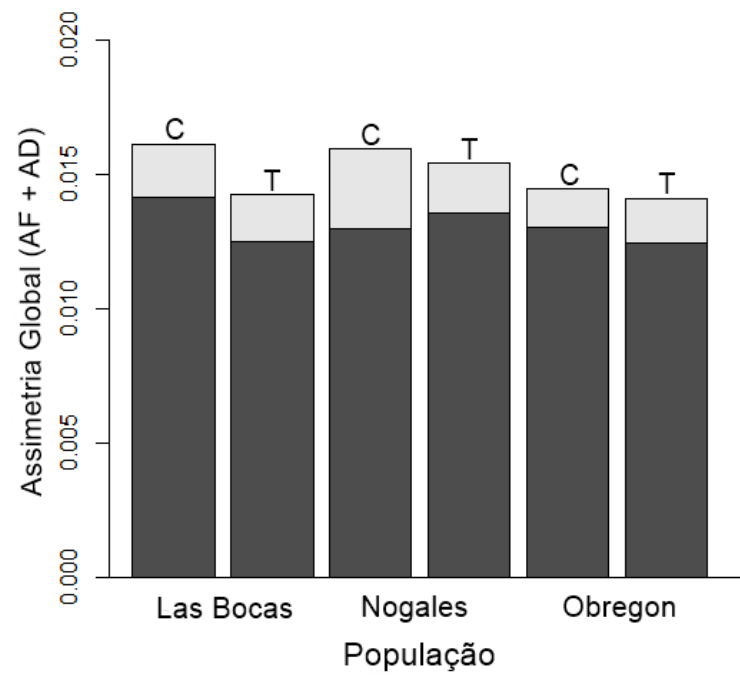
Comparação	Fêmea			Macho		
	AG	AF	DC	AG	AF	DC
	DO	DO	DC	DO	DO	DC
<b>CB-TB</b>	3,48	1,00	16,04	<b>17,18</b>	14,16	16,04
<b>CO-TO</b>	1,79	12,20	15,66	9,26	12,37	15,88
<b>CN-TN</b>	14,20	3,52	16,04	5,90	7,33	15,13
<b>C-T</b>	9,29	15,87	27,51	<b>35,83</b>	19,22	27,06
<b>B-N</b>	1,28	7,88	40,80	18,21	8,16	40,87
<b>B-O</b>	<b>43,82</b>	23,91	41,34	<b>39,97</b>	28,15	39,62
<b>N-O</b>	<b>45,10</b>	31,80	41,34	<b>58,19</b>	19,99	41,06

Em negrito os valores significativos.

AG, assimetria global; AF, assimetria flutuante; DO, diferença observada; DC, diferença crítica; CB, cladódio-Las Bocas; CN, cladódio-Nogales; CO, cladódio-Obregon; TB, tuna-Las Bocas; TN, tuna-Nogales; TO, tuna-Obregon; C, cladódio; T, tuna.



**Figura 5.** Gráfico da Assimetria Global das fêmeas de *Drosophila mojavensis sonorensis*. AF, assimetria flutuante (cinza escuro); AD, assimetria direcional (cinza claro); C, cladódio; T, tuna.



**Figura 6.** Gráfico da Assimetria Global dos machos de *Drosophila mojavensis sonorensis*. AF, assimetria flutuante (cinza escuro); AD, assimetria direcional (cinza claro); C, cladódio; T, tuna.

## 8. DISCUSSÃO

A assimetria como uma medida de estresse durante o desenvolvimento não é unanimidade entre os pesquisadores. Alguns trabalhos têm observado que não ocorre assimetria quando os organismos são submetidos a condições estressantes, enquanto outros consideram que apesar da assimetria ser um indicador de estresse com alta robustez, seus níveis são muito baixos para *Drosophila*, sugerindo que diferentes estudos morfométricos analisando a forma da asa devem ser realizados para observar o real impacto causado por agentes estressores (LEUNG e FORBES, 1996; FREEMAN et al., 2003; HOFFMANN et al., 2005). Nossos resultados demonstraram que houve instabilidade no desenvolvimento em ambas as dietas semi-naturais, cladódios de *Stenocereus thurberi* e tunas de *Opuntia spp.*, com níveis baixos de assimetria.

Os níveis baixos de assimetria observados nos organismos podem ser explicados por conta da variação individual ser muito menor que a variação entre os indivíduos (KLINGENBERG et al., 2001). Hoffmann et al. (2002) analisou alterações na forma e assimetria da asa em *Helicoverpa punctigera* expostos a pesticidas e estresse causado pelo frio, e não conseguiram detectar nenhum tipo de assimetria, enquanto que alterações na forma foram observadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Hoffmann et al. (2005), os quais realizaram um experimento com *Drosophila melanogaster* e sugeriram que alterações na forma são respostas mais comuns ao estresse do que a assimetria, pois as moscas não apresentaram nenhuma alteração assimétrica nas asas, enquanto que na análise de forma, mesmo que sutil as alterações, foi possível verificá-las, sugerindo que este último atributo é um indicador de estresse melhor em alguns casos do que a assimetria. Hoffmann e Shirriffs (2002) também apontaram a forma da asa como um bom indicador de estresse para os insetos.

Nossos resultados sugerem que a assimetria global (flutuante + direcional) na dieta de cladódio foi maior que na dieta de tuna para praticamente todas as populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, mas provavelmente esta diferença está relacionada com níveis diferentes de assimetria direcional entre estas populações. Segundo Palmer e Strobeck (2003) o fato de uma estrutura apresentar assimetria direcional, diferença entre os lados direito e esquerdo, pode estar ligado a fatores genéticos e não ser reflexo do desenvolvimento. Assim como, a assimetria

direcional pode ser conservada com o passar das gerações, e a diferença nos níveis de assimetria é resultante do curto tempo de estabelecimento de linhagens em laboratório, ocorrendo possivelmente uma seleção para desvios na simetria mais branda que no meio natural (KLINGENBERG et al., 1998; KLINGENBERG et al., 2001; HOFFMANN et al., 2005; COSTA et al., 2015).

Entretanto, não houve diferença significativa entre os níveis de assimetria flutuante para nenhum dos sexos, o que sugere que os níveis de estresse encontrados nas duas dietas são semelhantes. Ambas dietas representam, cada uma com sua particularidade de composição, uma condição estressante que afetou o desenvolvimento de *D. m. sonorensis*. Trabalhos com outras espécies cactofílicas têm demonstrado resultados diferentes. Por exemplo, Hasson et al. (2009) verificou que o nível de assimetria flutuante em alguns pares de espécies do cluster *Drosophila buzzatii* é afetado pelo cacto hospedeiro, e que comumente o hospedeiro primário é mais favorável ao desenvolvimento e o secundário é mais estressante. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por Soto et al. (2008b) em um estudo com *D. buzzatii* e *D. koepferae*, demonstrando que ocorreu um aumento da assimetria flutuante relacionada com o desenvolvimento dos organismos no cacto considerado hospedeiro secundário. Esses autores apontam que as condições específicas do hospedeiro secundário seriam as causadoras da instabilidade no desenvolvimento das larvas, condições estas que não estão presentes no hospedeiro primário. Porém, por outro lado, Soto et al. (2010), investigando a relação entre o cacto hospedeiro e a instabilidade do desenvolvimento de *D. gouveai* e *D. antonietae* tratados com um hospedeiro primário e outro secundário, verificaram que a assimetria flutuante foi maior quando os indivíduos utilizaram o hospedeiro primário.

A assimetria flutuante é principalmente relacionada ao nível de estresse ambiental, e tem sido apontada por muitos trabalhos como um bom indicador de instabilidade durante o desenvolvimento (LENS et al., 1999; ANCIAES e MARINI, 2000; HOGG et al., 2001; MARKOW e O'GRADY, 2005; HOFFMANN e WOODS, 2003; HASSON et al., 2009; KLINGENBERG, 2015). Porém, Soto et al. (2010) sugerem que a assimetria direcional também pode estar relacionada com instabilidade no desenvolvimento, e que a assimetria flutuante não pode ser utilizada como um indicador sensível de qualidade genética e fenotípica, pois não há uma relação consistente entre assimetria flutuante e valor adaptativo.

Como, no nosso caso, o nível de assimetria flutuante foi significativo e não houve diferença entre cladódio e tuna, nós levantamos duas hipóteses para explicar estes fatos. A primeira é de que a resposta das três populações seja semelhante quando sujeitas à mesma variação dietética. Resultados semelhantes já foram encontrados em outros trabalhos que verificaram que um mesmo cacto hospedeiro pode exercer influência semelhante na viabilidade e história de vida de organismos de espécies diferentes (SOTO et al., 2007, 2008c). Costa et al. (2015), em um estudo sobre distribuição geográfica de *D. antonietae*, verificou que apesar de existir uma variação na assimetria global entre as populações, estas apresentaram níveis semelhantes de assimetria flutuante, os quais também relacionaram com respostas semelhantes dadas pelas populações quando submetidas ao mesmo nível de estresse.

A segunda hipótese é de que cladódio e tuna exerçam pressões seletivas diferentes no desenvolvimento larval das moscas, e conseqüentemente estresse em níveis semelhantes. Rogério P. Mateus (comunicação pessoal) analisando tempo de desenvolvimento, peso da massa seca e viabilidade nas mesmas linhagens utilizadas no atual trabalho e nas mesmas dietas, encontrou que tuna e cladódio influenciam de forma distinta os organismos. O tempo de desenvolvimento foi menor, e o peso em massa seca dos adultos e a viabilidade larva-pupa foram maiores na dieta de tuna. Já na dieta de cladódio, a viabilidade total e a viabilidade pupa - adulto foram maiores. Feugang et al. (2006) afirma que a elevada concentração de açúcares em tuna serve como fonte imediata de energia, e que os compostos secundários presentes em outras partes do cacto, como os cladódios, se apresentam como um desafio químico aos animais que se utilizam desta matéria, e possivelmente seria um fator estressante.

Os alcaloides são produtos secundários do metabolismo das plantas e, no caso dos cactos, especificamente nos cladódios, são determinantes para as moscas na escolha de um hospedeiro (HEED e MANGAN, 1986). Também são considerados os principais compostos químicos causadores de estresse. Por exemplo, Soto et al. (2014) demonstraram que há uma relação direta entre alcaloides e alterações em características bionômicas em espécies cactofílicas de *Drosophila*, sendo que doses elevadas de alcaloides reduzem a viabilidade e estendem o tempo de desenvolvimento, porém não afetam as asas. No caso de organismos tolerantes não ocorreu alterações significativas de nenhum dos traços.



Mair et al. (2003) verificaram que a restrição alimentar causada pela diminuição da quantidade de levedura e açúcar no meio alimentar laboratorial, levou a um aumento no tempo de vida das moscas adultas, causando uma reversão da mortalidade. Isto significa que, no atual trabalho, a diferença na qualidade alimentar referente a ausência de açúcar na dieta semi-natural de cladódio estaria aumentando o tempo de desenvolvimento e diminuindo a taxa de mortalidade nas moscas adultas. Portanto, as larvas que se desenvolvem em cladódio e resistem à fase larval, são favorecidas futuramente nas demais fases do desenvolvimento. Já as larvas que se desenvolvem mais rápido e em maior tamanho em tuna, tem mais dificuldade na metamorfose e na eclosão de novos adultos. Isto significa que, tanto os açúcares do fruto em grande quantidade, quanto os compostos secundários do cladódio, afetam o desenvolvimento larval, o qual só é percebido no decorrer do desenvolvimento da mosca.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantidade de açúcares e a presença de compostos secundários tem uma relação direta com os níveis de estresse encontrados no atual trabalho. Isto porque, tanto a dieta semi-natural de cladódio que possui mais compostos secundários e menos açúcares, e a dieta semi-natural de tuna, a qual possui mais açúcares em sua composição e menos compostos secundários, causaram estresse nas moscas. Consequentemente, os níveis de assimetria flutuante foram semelhantes entre as dietas, já os níveis de assimetria direcional foram diferentes, o que acabou influenciando os níveis de assimetria global entre as populações e tratamentos.

As populações se mostraram diferentes geneticamente, através do obtido para a assimetria direcional, porém com uma resposta semelhante quando submetidas à variação dietéticas, isto porque, um hospedeiro específico, tuna ou cladódio, influenciou de forma semelhante todos os organismos que se utilizaram destes substratos. Isto foi verificado por meio dos níveis significativos de assimetria flutuante, que não variaram entre os conjuntos de organismos analisados.

Por fim, os motivos pelos quais níveis diferentes de assimetria direcional são aferidos em organismos semelhantes ainda não estão bem esclarecidos na literatura. Isto faz com que mais estudos genéticos sejam necessários para ajudar a resolver questões morfológicas, as quais podem influenciar a biologia, ecologia e evolução das moscas. Além disso, estudos mais aprofundados a respeito da composição química de hospedeiros diferentes, e da influência de determinados compostos no desenvolvimento dos insetos também são igualmente importantes.

**Capítulo II - Variação Fenotípica das asas de *Drosophila mojavensis*  
*sonorensis* (Diptera: Drosophilidae) em Resposta à Sazonalidade  
Alimentar**

## 10. INTRODUÇÃO

*Drosophila mojavensis sonorensis* ocorre em uma área que compreende os estados de Sonora e Sinaloa, no México, até o sul do Arizona, nos E.U.A. (PFEILER et al., 2009). Esta subespécie pertence ao complexo *mulleri*, o qual se encontra dentro do grupo *repleta* (VILELA 1983; WASSERMAN 1982, 1992). Estes organismos participam do sistema cacto – levedura – *Drosophila*, o qual representa um bom modelo para verificar o papel evolutivo da utilização de planta hospedeira no processo de diversificação biológica (BARKER e STARMER, 1982; PEREIRA et al., 1983; HEED e MANGAN, 1986; BARKER et al., 1990; POWELL, 1997; ETGES e JACKSON, 2001). Usualmente *D. m. sonorensis* utiliza como hospedeiro o cacto colunar *Stenocereus thurberi*, porém recentemente foi constatado que estas moscas estavam utilizando quando disponível os frutos em decomposição de cactos do gênero *Opuntia spp.* (Therese Ann Markow, comunicação pessoal). Esta observação é relevante, pois as tunas são sazonais, e quando não estão disponíveis, os organismos retomam a utilização dos cladódios do cacto colunar.

A troca de hospedeiro demanda um ajuste no organismo dos insetos com relação ao novo ambiente, o qual possui características diferentes das encontradas comumente (SOTO et al., 2010). Segundo Fanara et al. (1999), há diferenças entre os grupos de cactos, com relação à sua química, distribuição espacial e o intervalo de tempo em que os tecidos em decomposição são adequados para as moscas, o que pode representar desafios aos adultos e ao desenvolvimento larval. As espécies de cacto hospedeiras de *Drosophila*, em geral, podem ser classificadas em dois grandes grupos ecológicos. O primeiro grupo seria o das espécies do gênero *Opuntia spp.*, o segundo dos cactos colunares, o qual compreendem vários gêneros, como *Trichocereus*, *Cereus* e *Pilosocereus* na América do Sul e o *Stenocereus*, *Pachycereus* e *Carnegiea* na América do Norte (HASSON et al., 2009). Os cladódios dos cactos de ambos os gêneros possuem grandes quantidades de complexos químicos, como os ácidos graxos, glicosídeos, triterpenos e dióis de esteróis (FOGLEMAN e DANIELSON, 2001). Entretanto, os frutos de *Opuntia spp.* possuem uma alta quantidade de açúcares, glicose e frutose, que servem como fonte imediata de energia, além de possuírem menos compostos agressivos que os cladódios (SÁENZ e SEPULVEDA, 1990; FEUGANG et al., 2006; CARREIRA et al., 2014).

Vários são os fatores ambientais que podem influenciar a estrutura das asas, entre eles está a dieta, a qual é baseada no hospedeiro utilizado pelas moscas. As propriedades físicas e químicas de diferentes hospedeiros como os cactos podem influenciar as características de história de vida, tais como vulnerabilidade a doenças, fertilidade, reprodução, longevidade e resistência a estresse (RION e KAWECKI, 2007; LEE et al., 2008), além de afetar o padrão transcricional (MATZKIN et al., 2006; MATZKIN, 2012; MATZKIN e MARKOW, 2013), características fisiológicas e o metabolismo (MARKOW et al., 1999; KAUN et al., 2008; REED et al., 2010; MATZKIN et al., 2011, 2013).

A asa de *Drosophila* é uma estrutura que possui alta plasticidade fenotípica, e também é alvo de diferentes variações, tais como genéticas, fenotípicas, assimétricas e evolutivas (MONTEIRO & REIS, 1999; SOTO et al., 2008a; KLINGENBERG, 2014). Esta estrutura possui veias que possibilitam análises morfométricas a partir dos vários marcos anatômicos, além do seu desenvolvimento já ser bem compreendido em *Drosophila* (STARK et al., 1999; KLINGENERG e ZAKLAN, 2000; MORAES et al., 2004). A morfometria é o estudo estatístico da covariância relacionando as mudanças e variações no tamanho e na forma de uma estrutura ou organismo, com os fatores causais (BOOKSTEIN, 1991a; MONTEIRO e REIS, 1999). A morfometria pode ser dividida em tradicional e geométrica. A morfometria tradicional aborda o estudo da covariância das medidas das distâncias lineares, entre pontos anatomicamente homólogos, que em geral são distâncias, áreas ou ângulos da estrutura estudada (ROHLF e MARCUS, 1993). Por outro lado, a morfometria geométrica trabalha com a reconstrução da forma e, a visualização das variações da forma é o núcleo central desta técnica (KLINGENBERG, 2013).

A forma na sua definição geométrica é a base da morfometria, definição esta que inclui todas as características geométricas de um objeto, todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos de tamanho, posição e orientação (BOOKSTEIN, 1989; DRYDEN e MARDIA, 1998). A visualização contínua das mudanças da forma é uma ferramenta importante para a compreensão de variação morfológica, a partir disto a morfometria geométrica é utilizada para responder cada vez mais questões sobre a evolução e desenvolvimento dos organismos (KLINGENBERG, 2010; ADAMS, 2013). Dentre os estudos morfométricos de forma realizados, os temas mais abordados são: diferenciação e caracterização de espécies (HOULE et al., 2003; VILLEMANT et al., 2007;

HATADANI e KLACZKO, 2008; LUDOSKI et al., 2008), o padrão de simetria e o efeito de fatores ambientais sobre a estrutura das asas com relação a sua forma e tamanho (COSTA et al., 2015; SOTO et al., 2008b, 2008c, 2010), e a identificação de distúrbios locais que podem romper a homogeneidade do desenvolvimento (MOLLER e SWADDLE, 1997; HOSKEN et al., 2000; KARK, 2001).

A compreensão dos aspectos adaptativos da evolução do desenvolvimento deve levar em consideração as relações com as características morfológicas e as funções resultantes, pois é neste nível que o valor adaptativo dos organismos é influenciada (KLINGENBERG, 2002). A partir disto, a hipótese deste trabalho é que os indivíduos de *D. m. sonorensis* tratados nas diferentes dietas sofram alterações morfométricas das asas, em decorrência dos diferentes compostos químicos e nutricionais presentes nos dois tratamentos semi-naturais. Tornando-se necessário quantificar as possíveis alterações morfológicas oriundas da troca de hospedeiro, para identificar possíveis alterações na dinâmica e diferenciação populacional decorrentes de agentes estressores, o que pode ser realizado através de estudos pautados na estrutura da asa, utilizada como marcador morfológico (AVISE, 2000). Por conta disto, o objetivo deste trabalho é qualificar e quantificar, por meio da morfometria geométrica, possíveis alterações morfológicas nas asas de *D. m. sonorensis*, resultantes da mudança na qualidade alimentar, resultante da variação entre o hospedeiro primário usual (*S. thurberi*) e o hospedeiro secundário sazonal (*Opuntia spp.*), as quais podem levar a variações nos padrões evolutivos, ecológicos e fisiológicos desta subespécie.

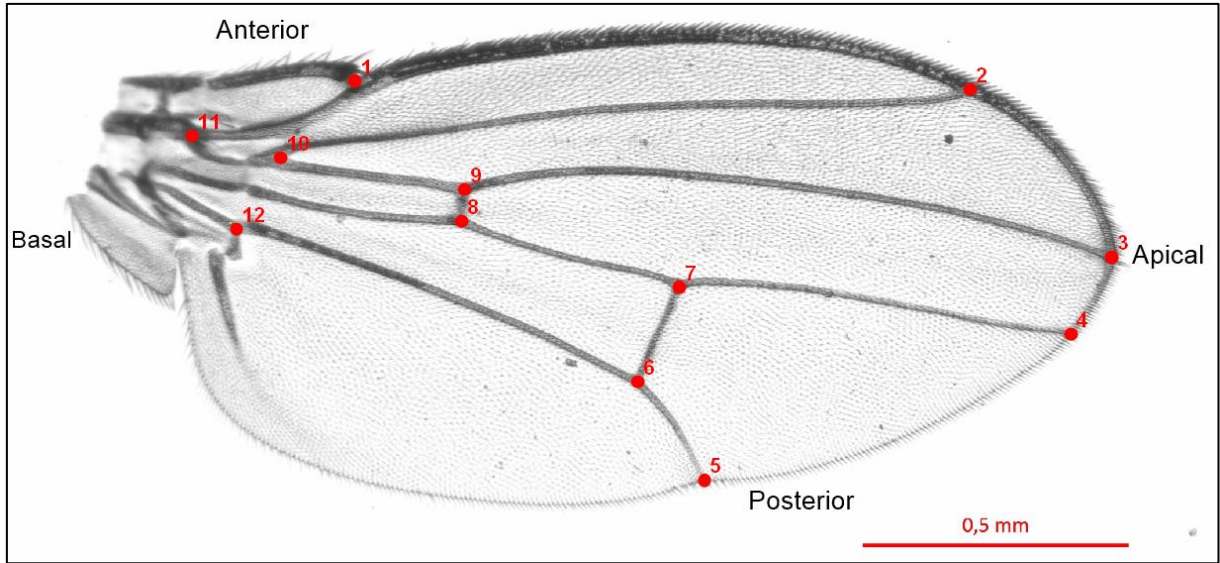
## 11. METODOLOGIA

### 11.1. Preparo das amostras e obtenção dos dados morfométricos

Para as análises morfométricas da forma das asas, foi utilizado um total de 570 machos de *D. m. sonorensis* das populações de Las Bocas, Nogales e Obregon, compondo seis grupos de tratamento: Las Bocas – cladódio; Las Bocas – tuna; Nogales – cladódio; Nogales – tuna; Obregon – cladódio; Obregon – tuna. A asa direita de cada indivíduo de acordo com o grupo de tratamento foi removida, submersa em álcool 70% e montada em lâmina sobreposta com lamínula. Em seguida as imagens das asas foram capturadas por meio de uma câmera 5 MP acoplada a um microscópio óptico (Stemi 2000 C, Zeiss) em aumento de 40X, com o auxílio do programa ZEN blue edition v.1.0.1.0 (Carl Zeiss Microscopy GMBH, 2011). Foi criado para cada grupo de imagens um arquivo base no programa tps Utility v.1.61 (ROHLF, 2013), a fim de ser utilizado na obtenção dos marcos anatômicos e das marcações.

Foram inseridos doze marcos anatômicos do tipo I nas imagens da região dorsal de cada asa (Figura 7). Estes marcos caracterizam-se por serem pontos no espaço onde três estruturas se encontram, como intersecções de veias, ou, onde a veia encontra a margem da asa (BOOKSTEIN, 1991b; HOFFMANN e SHIRRIFFS, 2002). A ordem de introdução dos marcos foi a mesma para todas as asas, caso contrário, poderiam ocorrer problemas com o estabelecimento da homologia espacial das estruturas e suas coordenadas (Figura 7). Isto porque, cada marco anatômico é definido por uma coordenada  $xy$ , a qual é formada por um valor  $x$  (abscissa) e um valor  $y$  (ordenada) no plano cartesiano (MONTEIRO e REIS, 1999). Neste caso, foram obtidas doze coordenadas  $xy$  para cada asa.

Em cada grupo de imagens foram realizadas pela mesma pessoa, duas repetições de marcação em dois dias diferentes, a fim de reduzir erros causados pela inserção manual dos marcos (ARNQVIST e MARTENSSON, 1998). Este processo foi realizado com o programa tpsDig2 v.2.19 (ROHLF, 2015).



**Figura 7.** Vista dorsal da asa direita de *Drosophila mojavensis sonorensis* com a posição dos 12 marcos anatômicos do tipo I.

## 11.2. Análises morfométricas e estatísticas

Foi realizada a Superposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes (GPA), alinhando as configurações individuais (BOOKSTEIN, 1996; DRYDEN e MARDIA, 1998). Este método transforma uma configuração de marcos, superpondo-a sobre uma configuração de referência, de modo que a soma dos quadrados das distâncias entre os pontos correspondentes em ambas as configurações seja a menor possível (MONTEIRO e REIS, 1999). Para que se possa realizar a sobreposição é necessário transladar, proporcionalizar e rotacionar as coordenadas, retirando o efeito de tamanho, sentido e posição. Os dados extraídos da GPA foram utilizados nas análises posteriores do MorphoJ e exportados para as análises realizadas no programa R.

Para testar a variação nas dietas e populações, fez-se primeiramente uma Análise dos Componentes Principais (PCA), a qual extraiu os componentes principais dos dados alinhados de Procrustes, a partir de uma matriz de correlação das coordenadas de Procrustes, utilizando o programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2014). Em seguida, os dados do PCA foram utilizados em uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) foi empregada utilizando o programa R 3.3.0 (R Development core Team, 2016), com o objetivo de testar se as variações nas dietas e populações afetam a forma. A MANOVA é uma extensão lógica da



ANOVA, que compara médias utilizando diversas variáveis, estruturadas em uma matriz específica para esta análise (NEFF e MARCUS, 1980; FRENCH et al., 2010). Com isso, foi utilizado o valor de Pillai's Trace para avaliar as diferenças multivariadas da forma entre as dietas, e entre as populações. Este teste foi utilizado por ser o mais robusto, sendo que quanto menor o seu valor, mais significativo serão os resultados (PAZ e NEIVA, 2014).

Foi realizada a Análise das Variáveis Canônicas (CVA) utilizando o programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2014), com o objetivo de comparar os seis grupos de tratamentos, formados pelas populações e dietas. A CVA verifica a posição dos grupos no espaço multivariado decorrente das variáveis canônicas e principalmente localiza e descreve as deformações das asas. Segundo Khattree e Naik (2000) a CVA reduz a dimensionalidade dos dados, semelhante aos componentes principais e correlações canônicas, utilizando amostras com observações repetidas. Esta análise procura, com base em um grande número de características originais correlacionadas, obter combinações lineares dessas características denominadas variáveis canônicas de tal forma que a correlação entre essas variáveis seja nula. Com os dados obtidos da CVA foi testada a distância de Mahalanobis a partir de um teste de permutação, verificando a distância entre os grupos de tratamentos utilizados na CVA. A distância de Mahalanobis reflete diretamente o grau de separação entre os grupos, medindo as diferenças entre os grupos em relação à variação dentro dos grupos no espaço multivariado, a qual independe do sentido da variação interna (KLINGENBERG e MONTEIRO, 2005).

Também foi feita uma Análise Discriminante para cada população utilizando o programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2014), a qual separou os grupos das dietas semi-naturais de cladódio e tuna fazendo previsões futuras para qual grupo as variáveis iriam pertencer. A Análise Discriminante identifica as variáveis que discriminam os grupos e, assim, elabora previsões a respeito de uma nova observação, identificando o grupo mais adequado a que ela deverá pertencer, em função de suas características. Para alcançar esse objetivo, a análise gera funções discriminantes (combinações lineares das variáveis) que ampliam a discriminação dos grupos descritos pelas variáveis dependentes (FÁVERO et al., 2009). Por fim, realizou-se a análise de tamanho das asas, a qual utilizou uma matriz de tamanho obtida dos dados do tamanho do centróide extraídos do programa MorphoJ 1.06d (KLINGENBERG, 2014). Esta matriz de dados foi então utilizada para comparar as

médias de tamanho dos grupos de tratamento com a análise de ANOVA com auxílio do programa Statistica 8.0 (STATSOFT, Inc.).

## 12. RESULTADOS

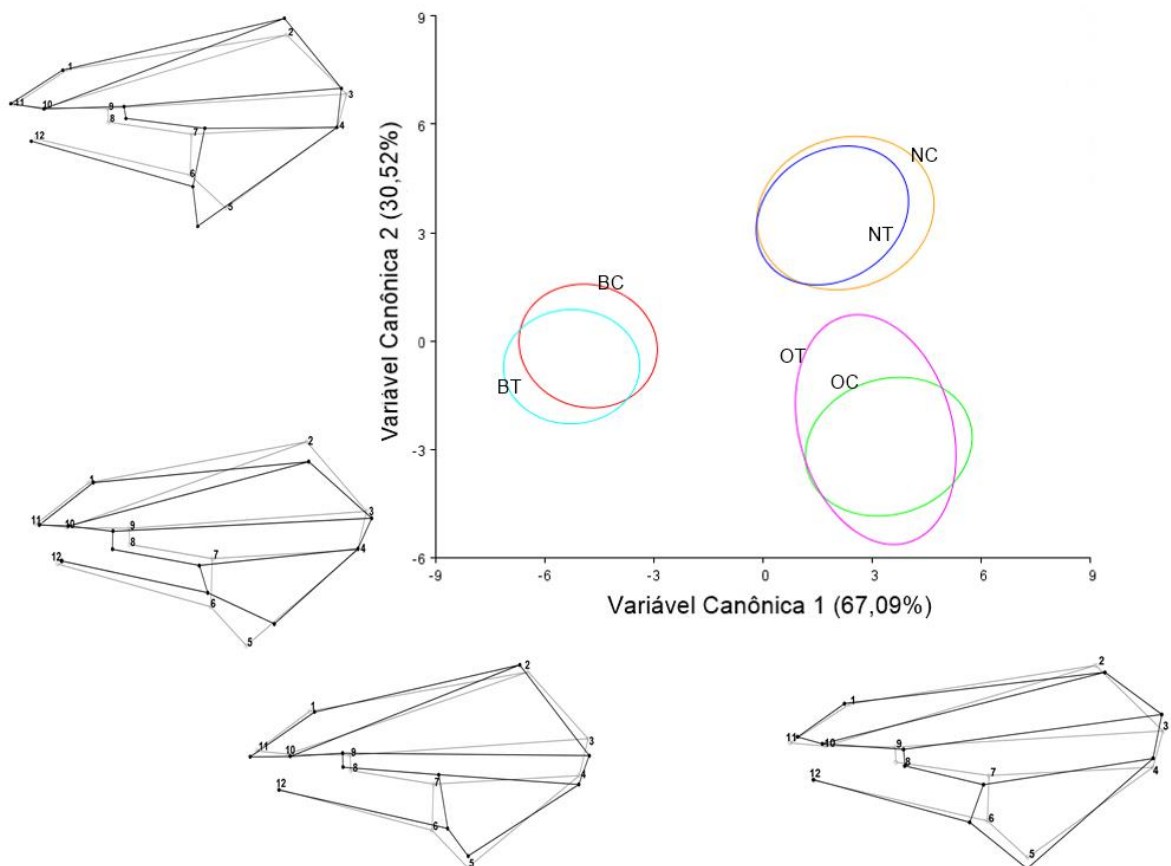
A Análise dos Componentes Principais (PCA) baseada em uma matriz de correlação das coordenadas de procrustes forneceu 20 componentes principais, dos quais 13 explicaram 95,86% da variação total e por conta disso foram incluídos na Análise de Variância Multivariada (MANOVA) (Tabela 9). A MANOVA realizada com os PC's demonstrou que o fator dieta influencia na forma das asas das moscas de *Drosophila mojavensis sonorensis* (Pillai's trace= 0,2072;  $p < 0,001$ ). Da mesma forma, o fator população influenciou significativamente a forma das asas das moscas (Pillai's trace= 1,7847;  $p < 0,001$ ).

**Tabela 9.** Análise de forma da asa de *Drosophila mojavensis sonorensis*-porcentagem da variação da forma explicada pelos Componentes Principais (PCs).

PCs	Autovalores	Proporção da variância explicada (%)	Acumulativo (%)
PC 1	0,00012246	21,44	21,44
PC 2	0,00008886	15,55	37,00
PC 3	0,00008619	15,09	52,09
PC 4	0,00005911	10,35	62,44
PC 5	0,00004448	7,78	70,23
PC 6	0,00003905	6,83	77,06
PC 7	0,00003262	5,71	82,77
PC 8	0,00001757	3,07	85,85
PC 9	0,00001524	2,66	88,52
PC 10	0,00001297	2,27	90,79
PC 11	0,00001169	2,04	92,84
PC 12	0,00001033	1,81	94,65
PC 13	0,00000693	1,21	95,86

A Análise das Variáveis Canônicas (CVA) resumiu as variáveis em cinco eixos, sendo que, destes, os dois primeiros explicaram 97,62% da variância total entre os grupos. Esta análise mostrou que existe diferença entre todos os grupos, no entanto a diferença entre as populações é muito maior que a diferença entre as dietas. O primeiro eixo canônico (CV1) explicou 67,09% da variância total dos

dados, e está relacionado principalmente com a distinção entre as populações de Nogales e Obregon da população de Las Bocas. Nogales e Obregon, que se apresentaram na porção positiva da CV1, possuem a asa mais distendida na porção apical e uma retração na porção basal. Já Las Bocas posicionou-se na porção negativa da CV1, apresentando a asa mais comprimida na região pósterio-apical. O segundo eixo canônico (CV2) explicou 30,52% da variação total dos dados, o qual separa a população de Nogales da população de Obregon. Nogales, que se apresentou na porção positiva da CV2, e apresentou uma expansão no eixo antero-posterior. Já para Obregon, que se encontra na porção negativa da CV2, ocorreu uma compressão no eixo anteroposterior da asa. A população de Nogales apresentou a menor variação entre as duas dietas, já que os níveis de diferenciação entre as dietas para Las Bocas e Obregon foram semelhantes (Figura 8).



**Figura 8.** Distribuição dos seis grupos de tratamento de *Drosophila mojavensis sonorensis* no espaço das Variáveis Canônicas. Entre parênteses estão representadas as porcentagens da variância na forma. Os diagramas das asas representados em cada eixo expressam a variação da forma para os extremos positivos e negativos da variável canônica 1 e 2. As linhas escuras dos diagramas representam as deformações nas asas, e as linhas claras a média das deformações da configuração consenso.

A distância de Mahalanobis utilizando os dados da Análise das Variáveis Canônicas, permitiu verificar que os grupos mais próximos morfologicamente são os das dietas dentro de uma mesma população: Cladódio e tuna de Las Bocas (1,806;  $p < 0,001$ ); cladódio e tuna de Nogales (1,307;  $p < 0,001$ ); cladódio e tuna de Obregon (1,592;  $p < 0,001$ ). Este resultado reforça a ideia de que a diferença entre as dietas é muito inferior do que a diferença entre as populações, aproximando assim os grupos de tratamento dentro de cada população correspondente (Tabela 10).

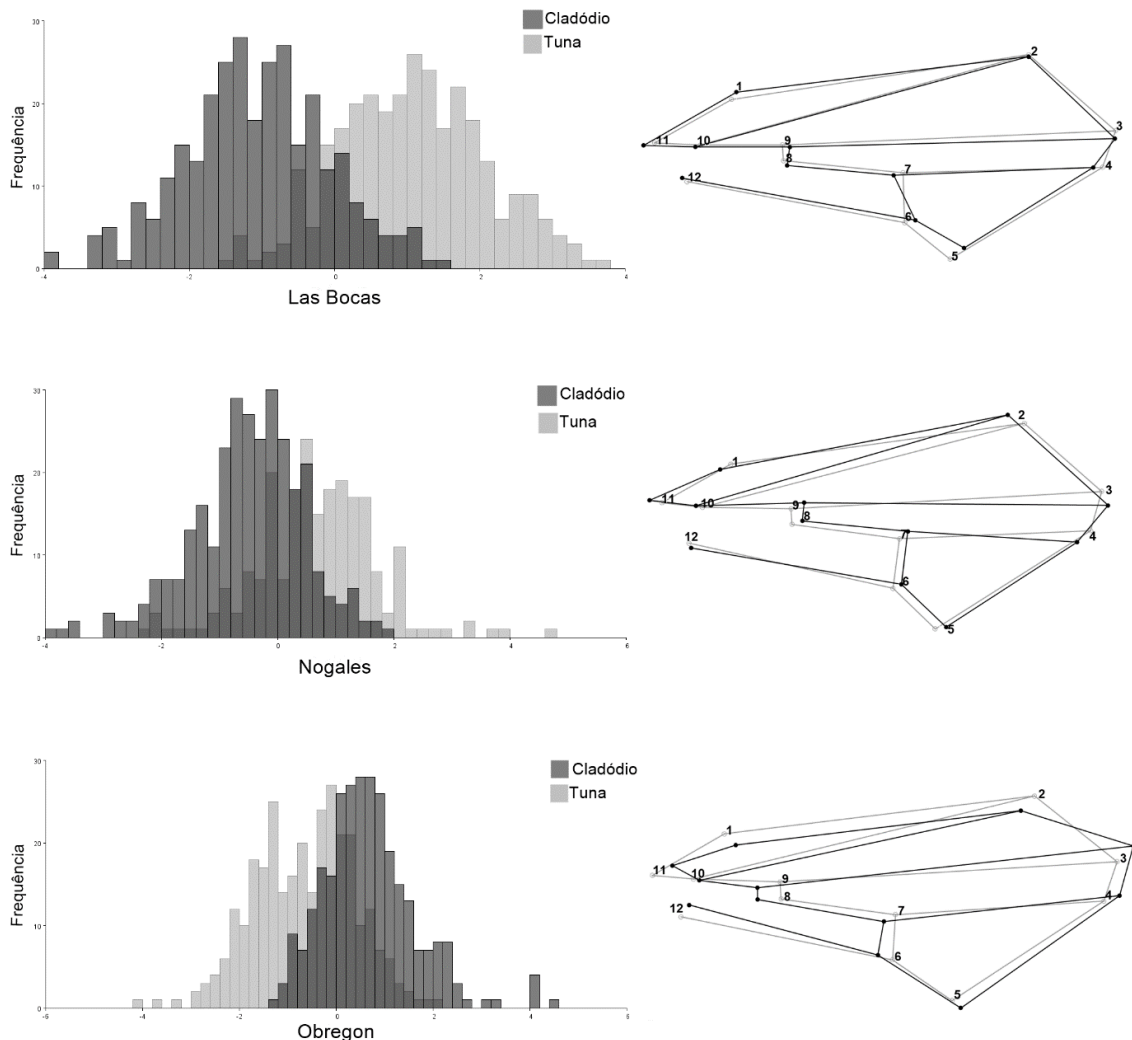
**Tabela 10.** Distância de Mahalanobis entre os seis grupos de tratamento, obtidas a partir do teste de permutação. Dietas: Cladódio (C); Tuna (T). Populações: Las Bocas (B); Nogales (N); Obregon (O). Valores em negrito representam as menores distâncias entre os agrupamentos.

Distância de Mahalanobis					
AGRUPAMENTOS	C – B	C – N	C – O	T – B	T – N
C – N	8,068*				
C – O	8,864*	6,690*			
T – B	<b>1,806*</b>	8,754*	9,231*		
T – N	7,738*	<b>1,307*</b>	6,744*	8,354*	
T – O	8,399*	6,178*	<b>1,592*</b>	8,641*	6,152*

\* $p < 0,001$

A Análise de Função Discriminante analisou e classificou os grupos das duas dietas semi-naturais (cladódio e tuna) para cada população, já que cada gráfico representa a média de um grupo em relação ao outro. Assim, o grupo de tratamento de Las Bocas da dieta de tuna teve uma classificação correta de 85% dos indivíduos, apresentando assim uma asa mais retraída na região póstero-apical. Enquanto que, o grupo de Las Bocas de cladódio teve uma classificação correta de 83%, exibindo uma asa mais distendida na região póstero-apical. As maiores variações morfométricas foram evidenciadas nos marcos anatômicos 4, 5, 6 e 7. Na população de Nogales, 73,65% dos indivíduos da dieta de tuna foram classificados corretamente, enquanto que 70,5% foram classificados corretamente na dieta de cladódio. As maiores variações morfométricas nas asas dos indivíduos foram evidenciadas nos marcos anatômicos 2, 3 e 4, com a dieta de tuna apresentando uma expansão na região antero-apical, e os indivíduos de cladódio com uma

retração desta região. Por fim, na população de Obregon, foram classificados corretamente 71,35% do grupo de cladódio, e 68,3% do grupo de tuna. O grupo de cladódio apresentando uma retração na região anterior da asa, e um alongamento no eixo apical-basal, enquanto que o grupo de tuna mostrou uma distensão na região anterior e apical, com uma retração na porção posterior. De uma maneira geral, houve uma grande variação morfométrica em todos os marcos anatômicos, exceto para o marco 10 (Figura 9).



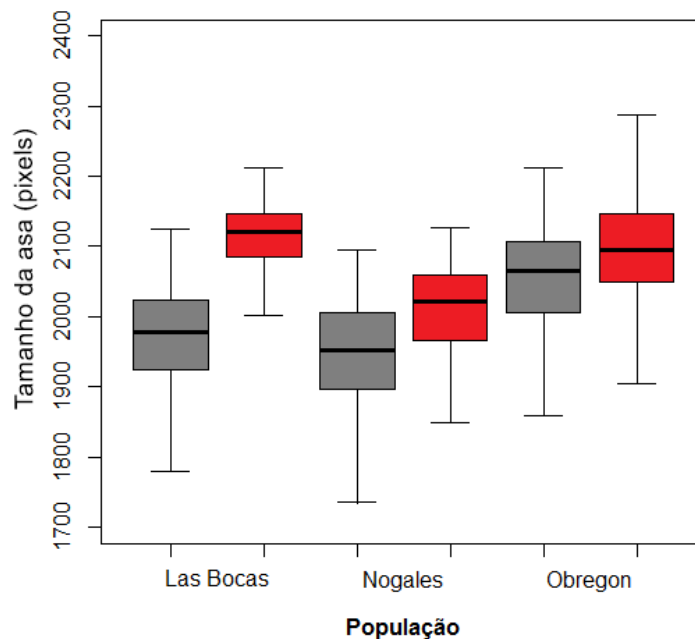
**Figura 9.** Análise Discriminante da forma das asas entre as dietas de cladódio e tuna na população de Las Bocas, Nogales e Obregon. A direita da imagem, os diagramas derivados da Análise Discriminante referente a cada população. As linhas escuras dos diagramas representam as deformações nas asas dos machos de tuna, e as linhas claras dos machos de cladódio. Deformações ampliadas 20 vezes.

A comparação da média do tamanho das asas dos grupos dos tratamentos revelou que, moscas tratadas com tunas apresentaram asas maiores que daquelas tratadas com cladódio em todos os casos. A maior diferença foi encontrada entre cladódio e tuna na população de Las Bocas, além do grupo de tratamento de tuna desta população ter apresentado a asa maior que todos os demais grupos de tratamento. Por outro lado, as populações de Nogales e Obregon apresentaram respostas semelhantes à variação dietética. Com relação a diferença de tamanho das asas entre as populações, Nogales apresentou as menores asas, ficando Obregon na posição intermediária e Las Bocas mostrando asas maiores que as demais populações (Tabela 11, Figura 10).

**Tabela 11.** ANOVA da plasticidade fenotípica do tamanho da asa direita das populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, submetidas às dietas de cladódios e tunas.

	GL	SQ	QM	F
<b>População (P)</b>	2	6,1476	3,07378	171,29***
<b>Dieta (D)</b>	1	1,1543	1,15434	64,32***
<b>P x D</b>	2	4,3891	2,19454	122,29***
<b>Resíduo</b>	1134	20,3489	0,01794	

\*\*\*p<0,001



**Figura 10.** Plasticidade fenotípica do tamanho da asa direita em pixels (média +/- desvio padrão) das populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, submetidas às dietas de cladódios (linhas cinzas) e tunas (linhas vermelhas).

### 13. DISCUSSÃO

As análises da variação morfométrica das asas de *Drosophila mojavensis sonorensis* revelaram que a conformação alar apresenta diferenças evidentes entre as populações na forma principalmente com relação aos marcos anatômicos da região apical. A forma e o tamanho variaram em proporções diferentes, evidenciando o fato de que estes dois fatores são independentes e sofrem pressões seletivas diferentes (HOFFMANN e SHIRRIFFS, 2002). As diferenças morfológicas entre as populações, as menores distâncias de Mahalanobis entre as dietas dentro de uma mesma população, bem como a distribuição observada pela CVA, indicam que há diferenças genéticas entre Las Bocas, Nogales e Obregon. Isto porque, o fator populacional se mostrou mais forte que o fator dieta ao agrupar os indivíduos em suas respectivas populações no espaço multivariado. Carreira et al. (2006) comparando duas espécies irmãs que tem nichos sobrepostos, *D. buzzatii* e *D. koepferae*, e testando a utilização de dois cactos hospedeiros, *Opuntia sulphurea* e *Trichocereus terscheckii*, também observaram diferenças entre as linhagens de uma mesma espécie. Estas diferenças foram consideradas genéticas, e a interação destas com os componentes ambientais foram responsáveis pela variação obtida nas asas de ambas as espécies.

Além da variação genética evidenciada entre as populações de *D. m. sonorensis*, a qual afetou diretamente a forma e tamanho das asas, os fenótipos também responderam de maneira distinta a dieta. Isto sugere que o agente estressor analisado, a dieta, não exerce pressão seletiva de forma homogênea nestes organismos. A partir disso, nossas análises também demonstram que as populações de Nogales e Obregon apresentam respostas mais semelhantes a plasticidade fenotípica da forma e do tamanho, apesar de não serem as mais próximas geograficamente. Esta semelhança na resposta à variação dietética causou conseqüentemente uma proximidade morfológica entre as duas populações.

Pressões seletivas distintas podem advir de formas distintas de exploração do ambiente dependendo dos diferentes organismos, o que pode afetar a morfologia de uma estrutura (FITZ PATRICK, 1985). O fato de regiões distintas da asa estarem sendo afetadas pela dieta, não possibilitou a associação com questões de modularidade. Por muito tempo acreditou-se que a asa da mosca poderia ser



dividida em unidades, anterior e posterior, as quais estariam sofrendo pressões seletivas diferentes (CAVICCHI et al., 1991; PEZZOLI et al., 1997; SOTO et al., 2008b). Considerava-se que havia integração do desenvolvimento desta estrutura, o que poderia afetar outros fatores da asa (PALMER e STROBECK, 1986; PALMER, 1994; MARKOW, 1995). Porém, a ausência de relativa independência entre os módulos e a escassez de correlação dentro dos módulos indicou que não há modularidade nas asas destes organismos (KLINGENBERG e ZAKLAN, 2000; KLINGENBERG, 2008, 2009, 2010).

O nível de concentração de alcaloides foi relatado como fator causador de estresse em *Drosophila*, determinando inclusive a escolha de um cacto hospedeiro (SOTO et al., 2014). Também foi observado que há uma redução do tamanho das moscas proporcionalmente ao aumento da concentração de alcaloides, composto este que é principalmente encontrado nos cladódios (CORIO et al., 2013). Os cladódios são diferentes biologicamente das tunas no que se refere a composição química e leveduras associadas à decomposição (FOGLEMANN e ABRIL, 1990). Feugang et al. (2006) afirma que a elevada concentração de açúcares em tuna serve como fonte imediata de energia aos animais. Porém, o fato dos cactos colunares serem mais complexos (FOGLEMANN e ABRIL, 1990) pode favorecer *D. m. sonorensis*, pois assim há uma menor competitividade de nicho.

Hasson et al. (2009) afirma que, no que diz respeito ao valor adaptativo das moscas, tem sido verificado que ele é afetado pelo cacto hospedeiro, e que comumente o hospedeiro primário é mais favorável ao desenvolvimento das larvas. Na maioria das vezes a sobrevivência, tempo de desenvolvimento e a morfologia da asa são afetados negativamente pelo cacto hospedeiro secundário. Isto porque, as plantas possuem vários mecanismos de defesa química contra os insetos, que podem afetar o desenvolvimento destes organismos (SCHOONHOVEN et al., 2005). O formato da asa muitas vezes muda em resposta ao estresse (HOFFMANN et al., 2005). No entanto, Soto et al. (2008b), em um estudo com *Drosophila buzzatii* e *Drosophila koepferae*, não detectou variação significativa na forma da asa quando as espécies foram submetidas a um segundo cacto hospedeiro, apesar dos diferentes compostos químicos. Da mesma forma, Carreira et al. (2006) verificou que apenas o tamanho da asa foi afetado com a troca de hospedeiro nestas mesmas espécies.

Por outro lado, Jones (1998), estudando as bases genéticas de *Drosophila sechellia*, a qual utiliza os frutos de *Morinda citrifolia*, evidenciou que a utilização de um hospedeiro com alta toxicidade estava causando isolamento da espécie em relação a sua espécie irmã, *Drosophila simulans*, a qual não possui resistência a este hospedeiro. Em outro trabalho, Jones (2004) verificou que a planta hospedeira pode interferir na produção de ovos em *D. sechellia*. O fato da espécie ser especialista faz com que haja uma diminuição na produção de ovos, relacionado com um efeito pleiotrópico negativo das mudanças genéticas, o que não ocorre com *D. simulans*, a qual é generalista. Da mesma forma, Tao et al. (2014) estudando borboletas monarcas (*Danaus plexippus*) verificou que o fator dieta foi capaz de afetar a forma das asas por conta da variação na toxicidade dos compostos presentes nos diferentes tratamentos. Estes resultados corroboram os encontrados em nosso trabalho, no qual o efeito dieta foi estressante o bastante para afetar a forma e o tamanho das asas.

A utilização de diferentes hospedeiros em *Drosophila* já foi relacionada com mudanças morfológicas, incluindo variação nas asas (CARREIRA et al., 2006; SOTO et al., 2008b; 2008c; 2010; HASSON et al., 2009), e também com outras características, tais como viabilidade (CORIO et al., 2013), produção de ovos (JONES, 2004), tempo de desenvolvimento (FANARA et al., 2004), oviposição (FANARA e HASSON, 2001; SOTO et al., 2012), e atividade enzimática (MATZKIN, 2005). Com isso, nossos resultados reforçam a ideia proposta por vários autores de que a forma das asas é um bom indicador de estresse ambiental, já que a variação entre os indivíduos é mais fácil de ser detectada e visualizada do que variações individuais (KLINGENBERG et al., 2001; HOFFMANN e SHIRRIFFS, 2002; HOFFMANN et al., 2002; HOFFMANN et al., 2005). Estas variações morfológicas entre os indivíduos de *D. m. sonorensis* podem causar modificações nas interações ecológicas, no sucesso reprodutivo e na habilidade de voo das moscas, como as já observadas em outros insetos (RION e KAWECKI, 2007; LEE et al., 2008; TAO et al., 2014).

## 14. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho sugere que, populações com respostas análogas às dietas podem gerar proximidade morfológica quando analisadas. Apesar disto, a variação não é homogênea, o que indica que a dieta não afeta igualmente as três populações. Isto provavelmente se deve ao fato dos organismos possuírem suas particularidades ao explorar o mesmo tipo de ambiente, no caso, as dietas de tuna e cladódio. As populações também são diferentes geneticamente, e são essas diferenças aliadas aos componentes ambientais que influenciam a variação da morfologia das asas de *Drosophila mojavensis sonorensis*.

Os cladódios e as tunas são diferentes em vários traços biológicos e químicos, interferindo diretamente no grau de estresse causado por estes hospedeiros as moscas que se utilizam deles. O grau de estresse é determinante na escolha do melhor hospedeiro, e supõe-se que explorar hospedeiros distintos exija uma maior complexidade dos indivíduos para tolerar a variação encontrada entre os cactos. Em resumo, a capacidade de *D. m. sonorensis* explorar tanto o cladódio de *Stenocereus thurberi*, seu hospedeiro primário, quanto a tuna, fruto do cacto do gênero *Opuntia*, seu hospedeiro secundário ou sazonal, pode beneficiar os indivíduos no que diz respeito a um aumento de fontes alimentares, sítio de reprodução e desenvolvimento, o que pode favorecer a redução da competitividade intra e interespecífica por nicho.

Por fim, o trabalho atual sugere que futuras análises sejam realizadas para averiguar se as alterações morfológicas observadas nas asas podem influenciar outros traços dos organismos, como a capacidade de voo e dispersão, o sucesso reprodutivo e as interações que estejam relacionadas com processos evolutivos, sazonalidade alimentar e troca de hospedeiro.

**Capítulo III – Plasticidade fenotípica dos edeagos de *Drosophila mojavensis sonorensis* (Diptera: Drosophilidae): hospedeiro principal versus sazonal**

## 15. INTRODUÇÃO

O grupo *repleta* é um dos mais bem estudados do gênero *Drosophila* por ser um dos poucos grupos que é especialista, com capacidade de utilizar tecidos de cactos em decomposição como hospedeiro primário, participando assim do sistema cacto – levedura - *Drosophila* (BARKER e STARMER, 1982; PEREIRA et al., 1983; BARKER et al., 1990; POWELL, 1997; ETGES e JACKSON, 2001; OLIVEIRA et al., 2012). As espécies deste grupo são intimamente relacionadas. Porém, há grande diferença com relação a genitália, a qual serve como caráter diagnóstico (VILELA, 1983), principalmente para espécies crípticas.

*Drosophila mojavensis* se encontra dentro do complexo *mojavensis* (WASSERMAN 1982, 1992; RUIZ et al., 1990; SANCHEZ-FLORES et al., 2016), juntamente com *D. navojoa* e *D. arizonae*. Esta espécie possui quatro subespécies que se diferenciam geográfica, filogenética e ecologicamente: *D. m. baja*, *D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi* e *D. m. sonorensis* (REED et al., 2006; MACHADO et al., 2007; PFEILER et al., 2009). Estas subespécies se alimentam, ovipositam e suas larvas se desenvolvem em tecidos em decomposição de pelo menos quatro tipos de cactos: *Stenocereus gummosus* (“pitaya agria”), *Ferocactus cylindraceus* (“barrel cactus”), espécies do gênero *Opuntia* (“prickly-pear”), incluindo *O. littoralis*, e *Stenocereus thurberi* (“organ pipe”), respectivamente (FELLOWS e HEED, 1972; HEED, 1978; HEED, 1982; RUIZ et al., 1990; PFEILER et al., 2009). A subespécie *D. m. sonorensis* ocorre no estado de Sonora e Sinaloa, México, até o sul do Arizona, EUA, e como descrito acima, usualmente utiliza o cladódio do cacto colunar *Stenocereus thurberi* (“Organ Pipe”) (PFEILER et al., 2009). No entanto, recentemente foi observado que estas moscas estavam utilizando como hospedeiro secundário os frutos (tunas) de cactos do gênero *Opuntia*, que são sazonais.

Os dois hospedeiros utilizados por *D. m. sonorensis*, cladódio do cacto colunar e tunas, se diferenciam com relação a composição química, distribuição espacial e o intervalo de tempo em que os tecidos em decomposição são adequados para a exploração, o que pode representar desafios aos adultos e ao desenvolvimento larval (FANARA et al., 1999). Os cladódios dos cactos de *Stenocereus* e *Opuntia* possuem grandes quantidades de complexos químicos, como os ácidos graxos, glicosídeos, triterpenos e dióis de esteróis (FOGLEMAN e DANIELSON, 2001). Entretanto, os frutos de *Opuntia* possuem uma alta quantidade

de açúcares, glicose e frutose, que servem como fonte imediata de energia, além de possuírem menos compostos agressivos que os cladódios (SÁENZ e SEPULVEDA, 1990; FEUGANG et al., 2006; CARREIRA et al., 2014).

A troca de hospedeiro faz com que o organismo dos insetos necessite se ajustar ao novo ambiente, o qual possui características diferentes das encontradas habitualmente (SOTO et al., 2010). Esta troca pode influenciar a vulnerabilidade a doenças, a qual pode aumentar em hospedeiros com mais gordura e diminuir em hospedeiros mais proteicos (REED et al., 2010; LEE et al., 2008), o padrão transcripcional, onde cada hospedeiro modifica a expressão de genes ligados a adaptação (MATZKIN, 2012; MATZKIN e MARKOW, 2013), a viabilidade larval que pode ser reduzida no hospedeiro alternativo (MATZKIN, 2012), o desenvolvimento e metabolismo, os quais reduziram-se diante de altas taxas de açúcares em relação à proteína, chegando a aumentar a taxa de mortalidade (MATZKIN et al., 2011), e a resistência ao estresse, que aumenta em alguns casos diante da restrição alimentar (RION e KAWECKI, 2007). Por isso, características morfológicas têm sido utilizadas em estudos evolutivos e ecológicos (FRANCO et al., 2006).

O fato da genitália dos artrópodes evoluir rapidamente acaba tornando-a um marcador morfológico específico (ARNQVIST, 1997). A genitália masculina das espécies do gênero *Drosophila* tende a apresentar evolução rápida e divergente, sendo fundamental conectar os processos de variação intraespecífica com a diversificação interespecífica para compreender os mecanismos evolutivos desta estrutura (ANDRADE et al., 2005). Estes mecanismos fornecem informações relacionadas ao processo de especiação devido ao papel potencial dessas estruturas no isolamento reprodutivo, e no alcance da diversidade das características reprodutivas que acabam influenciando a divergência populacional (RICHMOND et al., 2012).

Dentre os órgãos que compõe a genitália masculina em *Drosophila*, o edeago, que é o órgão intromitente, é utilizado muitas vezes como característica morfológica para identificação e caracterização taxonômica das espécies, principalmente de espécies crípticas (VILELA, 1983; VILELA e BÄCHLI, 1990; TIDON-SKLORZ e SENE, 1995; FRANCO et al., 2006). Além disso, a morfometria desse órgão tem sido utilizada para apoiar estudos sobre estresse ambiental (ANDRADE et al., 2005; SOTO et al., 2008a), divergência morfológica relacionada a divergência genética entre populações naturais (FRANCO et al., 2006), e interação de acasalamento

(RICHMOND, 2014). Isso acaba tornando importante os estudos relacionados ao edeago, pois a morfologia genital desempenha um grande papel no isolamento reprodutivo entre grupos próximos (MARKOW, 1991). Além do que, alterações na forma e no tamanho do edeago podem influenciar a dinâmica de acasalamento em vários níveis (RICHMOND et al., 2012). Por conta disso, muitas hipóteses foram levantadas no decorrer do tempo para explicar a evolução rápida e diversificada da genitália. Destas, três se destacam: chave-e-fechadura (DUFOR, 1844), pleiotropia (MAYR, 1963), e seleção sexual (EBERHARD, 1985).

A hipótese chave-e-fechadura propõe que as estruturas genitais apresentam plasticidade limitada por conta de haver um encaixe quase perfeito entre a genitália masculina e a genitália feminina. Por esta razão, as variações genotípicas e fenotípicas ocorrem em baixos níveis e estão sob o controle da seleção estabilizadora, ocorrendo um desenvolvimento canalizado da genitália (ARNQVIST e THORNHILL, 1998). A hipótese de pleiotropia defende que praticamente não há variação nas estruturas genitais, visto que há uma relação genética entre estas estruturas com as demais não-genitais. O que causaria a evolução rápida e divergente neste caso seria a mudança nas frequências alélicas em *loci* que influenciam pleiotropicamente toda a morfologia (MAYR, 1963; ARNQVIST, 1997). Por fim, segundo a hipótese de seleção sexual, há uma seleção contínua sobre a estrutura genital masculina, relacionada com a variação no sucesso reprodutivo, que ocasionaria a variação e modificação da morfologia do edeago (ARNQVIST, 1997; EBERHARD et al., 1998; ARNQVIST e ROWE, 2002). Apesar das diversas suposições, nenhuma das hipóteses conseguiu elucidar definitivamente os reais motivos da evolução da genitália masculina (HOSKEN e STOCKLEY, 2004).

Estudos morfométricos com edeago tem mostrado que, além deste órgão ser influenciado pela seleção natural e sexual, pode haver interferência de fatores epigenéticos e ambientais na sua expressão fenotípica, como o estresse causado por variações na temperatura e na dieta, indicando que há plasticidade e sensibilidade nesta estrutura (ANDRADE et al., 2005). Estas descobertas levaram a rejeição da hipótese chave-e-fechadura, apesar de não ter esclarecido as causas da divergência morfológica entre as populações e espécies (ATCHLEY et al., 1992; ARNQVIST e THORNHILL, 1998).

O edeago de *D. m. sonorensis* é considerado o mais variável e por conta disso com formas que se sobrepõem aos edeagos das demais subespécies,

indicando que a evolução do órgão neste grupo é mais complexa e está mais sujeita a fatores evolutivos adicionais (RICHMOND et al., 2012). Sabe-se também que as plantas hospedeiras exercem um papel importante na variação da morfologia do edeago (SOTO et al., 2008a), e que estudos da variação intraespecífica deste órgão e suas consequências para a dinâmica das espécies são escassos (SOTO et al., 2007).

Com isso, a hipótese deste trabalho é que a variação de hospedeiro e sítio de desenvolvimento das moscas afete também a morfologia do edeago, tanto a forma quanto o tamanho. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar a plasticidade fenotípica do tamanho e da forma do edeago dos machos de *D. m. sonorensis* em resposta ao desenvolvimento desta subespécie em dois substratos diferentes: cladódios de *Stenocereus thurberi*, e tunas de *Opuntia spp.*. Estudar a influência da sazonalidade alimentar na estrutura do edeago pode fornecer importantes informações evolutivas, tais como se esta condição está causando estresse e pode afetar futuramente a reprodução e dinâmica dos indivíduos nas populações.



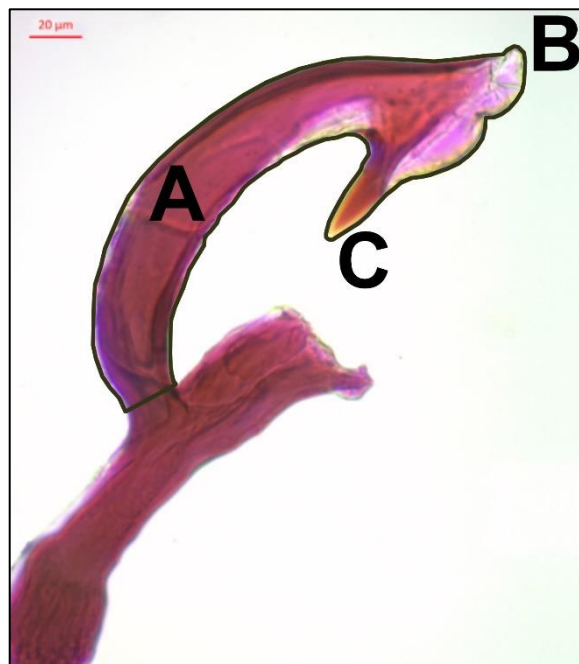
## 16. MATERIAIS E MÉTODOS

### 16.1. Preparo dos edeagos e obtenção dos dados morfométricos

Para as análises morfométricas de tamanho e forma do edeago, foi utilizado um total de 300 machos de *D. m. sonorensis* das populações de Las Bocas, Nogales e Obregon, sendo 50 indivíduos de cada um dos seguintes grupos de tratamento: Las Bocas – cladódio; Las Bocas – tuna; Nogales – cladódio; Nogales – tuna; Obregon – cladódio; Obregon – tuna.

A preparação das lâminas permanentes dos edeagos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Wheeler e Kambysselis (1966), modificada por Kaneshiro (1969). Os dois últimos tergitos do abdômen, contendo a terminália masculina (*hipandrium*, *epandrium* e *aedeagus*) de cada macho, foram removidos com auxílio de estilete e transferidos para um microtubo com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% e mantidos em repouso por 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida a peça foi lavada em água destilada e transferida para outro microtubo, o qual continha o corante diluído de Gage (fucsina ácida e ácido clorídrico 10%), sendo mantida neste corante por 15 dias. Após o período de coloração, a peça foi transferida para uma placa de vidro escavada contendo uma gota de glicerina, a qual permitiu a dissecação da terminália, isolando o edeago dos demais apêndices.

Foi montada uma lâmina com duas lamínulas fixadas com Bálsamo do Canadá nas suas extremidades, com 24 horas de antecedência à sua utilização. Esta estrutura formou uma base de apoio para a movimentação do edeago durante a captura de imagem. Assim, o edeago foi colocado no centro da lâmina (no espaço entre as duas lamínulas fixadas nas extremidades), onde uma gota fresca de Balsamo do Canadá foi colocada, e sobre ele foi adicionado uma outra lamínula maior cobrindo todo o espaço. Toques suaves na lamínula foram realizados a fim de posicionar cada edeago em vista lateral na lâmina. As imagens foram capturadas num aumento de 400x (Figura 11), utilizando o microscópio óptico Primo Star da Zeiss, com câmera 5 MP acoplada, e com o auxílio do programa ZEN blue edition (CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH, 2011). Todos os edeagos utilizados neste trabalho foram depositados no Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).



**Figura 11.** Vista lateral do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*, mostrando a delimitação da região distal utilizada para a realização dos contornos e posteriores análises morfométricas. A = Tronco; B = Cabeça; C = Processo ventral.

## 16.2. Análises morfométricas e estatísticas do edeago

O edeago é uma estrutura que não possui pontos anatômicos reais, o que dificulta a marcação. Por esta razão, a utilização da análise de contornos fechados é a mais adequada (ROHLF, 1990). As fotos digitalizadas foram contornadas no programa Adobe Photoshop CC (2015) para a criação de arquivos de contorno em preto e branco. Foi considerada nas análises a parte distal do edeago (Figura 11), a qual é a porção do órgão efetivamente envolvida na cópula.

A quantificação morfológica foi realizada através da Análise de Descritores Elípticos de Fourier, utilizada no estudo de contornos fechados complexos (KUHL e GIARDINA, 1982), por meio do programa SHAPE 1.3 (IWATA e UKAI, 2002). Esta análise descreve o contorno bidimensional fechado de qualquer estrutura através de séries de Fourier, uma soma ponderada de funções trigonométricas (senos e cossenos) denominadas harmônicas. A orientação do tamanho e da forma do contorno foi padronizada de acordo com o tamanho e alinhamento da primeira elipse da harmônica, que corresponde à primeira aproximação de Fourier para a

informação do contorno (LESTREL, 2008). Desta forma, a representação da estrutura analisada é baseada somente na forma do contorno.

A partir dos descritores elípticos, uma matriz de variância-covariância foi gerada, na qual foram consideradas 25 harmônicas, e cada uma gerou quatro coeficientes por indivíduo. O número de harmônicas consideradas na análise define a precisão da descrição do contorno (LIU et al., 1996). Assim, foram geradas 100 variáveis de forma, que foram submetidas à Análise de Componentes Principais (PCA). Os componentes principais reduzem a dimensionalidade das variáveis. Cada componente principal (PC) foi considerado uma variável quantitativa de forma, que foi utilizado como variável independente nas análises morfométricas. Apenas os componentes principais que explicam mais de 2% da variação foram utilizados nos cálculos. Essas variáveis também foram utilizadas como descritores de forma em análises subsequentes, e a área do contorno (em pixels) foi utilizada como medida de tamanho.

Os PC's extraídos a partir dos dados de forma foram submetidos a análise de MANOVA para verificar quais fatores influenciaram significativamente a forma dos edeagos entre as dietas, populações e interação entre esses fatores. Já para a análise de tamanho, os valores em pixels para cada indivíduo foram submetidos ao teste da ANOVA, para verificar se houve diferença no tamanho entre as dietas, populações e a interação entre os fatores. Estas análises foram realizadas no programa R 3.3.0 (R Development core Team, 2016), e Statistica 8.0 (STATSOFT, Inc.).

## 17. RESULTADOS

Foram incluídos na análise de forma todos os seis grupos amostrais de *Drosophila mojavensis sonorensis*. Cinco componentes principais com valores acima de 2% de significância foram utilizados nas análises, os quais descreveram 93,71% da variação total (Tabela 12). Este número de PC's é fornecido pelo pacote Shape.

**Tabela 12.** Análise de forma do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*-porcentagem da variação da forma original explicada pelos Componentes Principais (PCs).

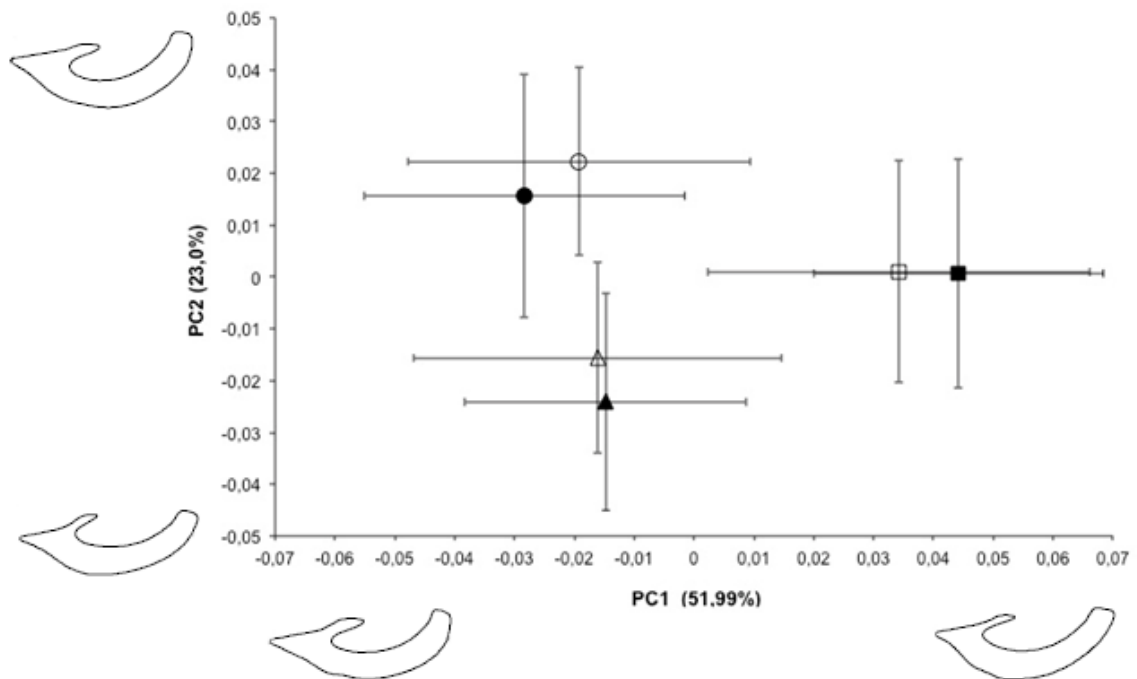
PCs	Autovalores	Proporção da variância explicada (%)	Acumulativo (%)
PC 1	1,557730x10 <sup>3</sup>	51,99	51,99
PC 2	6,891854 x10 <sup>4</sup>	23,00	75,00
PC 3	3,244748 x10 <sup>4</sup>	10,83	85,83
PC 4	1,524838 x10 <sup>4</sup>	5,09	90,92
PC 5	8,347660E x10 <sup>5</sup>	2,78	93,71

Os valores dos PC's para forma foram empregados em uma análise de MANOVA, a qual revelou que o fator dieta não influencia na forma dos edeagos, porém entre as populações e na interação população x dieta as diferenças são significativas (Tabela 13). Comparando os dois primeiros PCs (PC1 x PC2), que juntos explicaram 75% da variância total da forma, as três populações apresentaram distribuição isolada neste espaço multivariado morfométrico, com as dietas de cada população localizando-se mais próximas entre si do que com as das demais populações. Para PC1, não houve diferença significativa entre Nogales e Las Bocas, porém estas duas foram significativamente diferentes de Obregon. Esta diferença ocorreu principalmente na forma da porção distal do edeago (cabeça) e na largura do tronco. Para PC2, a diferença foi significativa entre todas as amostras, ocorrendo na curvatura do tronco e no tamanho da base do processo ventral (Figura 12).

**Tabela 13.** MANOVA a partir dos cinco primeiros Componentes Principais (PCs) de variância da forma do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*.

	Pillai's trace	GL Efeito	GL erro	F
<b>População (P)</b>	1,11	10	588	73,61***
<b>Dieta (D)</b>	0,02	5	294	1,26
<b>P x D</b>	1,21	25	1470	18,78***

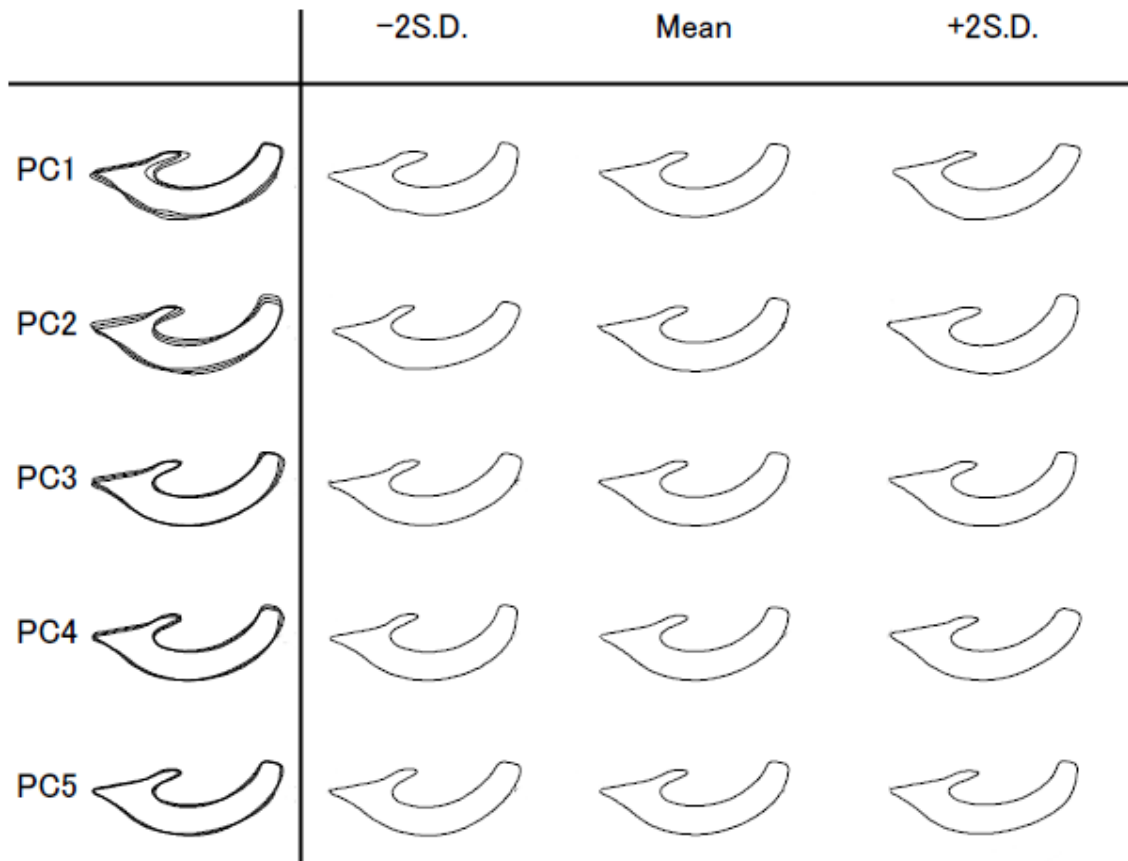
\*\*\*p<0,001



**Figura 12.** Distribuição espacial da variação morfológica da forma do edeago para os Componentes Principais 1 e 2 (PC1 e PC2), com o desvio padrão de cada média das três populações de *Drosophila mojavensis sonorensis* desenvolvidas nas dietas de cladódio e tuna. Círculos = Nogales; Triângulos = Las Bocas; Quadrados = Obregon. Símbolos cheios = tuna; Símbolos vazios = cladódio. Os contornos de edeagos representados em cada eixo expressam a variação da forma para cada componente principal em dois desvios padrão da média.

A variação na forma do edeago entre cladódio e tuna foi diferente para cada população (Figura 12), demonstrando que o efeito da mudança de dieta não é o mesmo para cada uma delas, e que as diferenças nas respostas podem ser devido às diferenças genéticas entre as populações. A distância fenotípica entre as dietas de cladódio e tuna foram principalmente influenciadas pelo PC 2 na população de Las Bocas, PC 4 na população de Nogales, e PCs 3, 4 e 5 na população de Obregon (Tabela 12).

A visualização da variação da forma da vista lateral do edeago descrita pelos cinco PCs foi ilustrada pela reconstrução do contorno da média e do desvio padrão. As linhas que não se sobrepuseram na primeira coluna da figura representam a variação do edeago refletida pelo PC correspondente ( $\pm 2$  desvios padrão). Com isto, foi possível visualizar as formas com diferença mais pronunciada entre os grupos (PC 1, 2 e 4), para as formas menos diferenciadas (PC 3 e 5). A área de maior variação no PC1 está no comprimento e na largura do processo ventral, e na largura do tronco. O PC2 apresentou variações na largura da cabeça e do tronco, bem como da porção basal do tronco. Por fim, o PC4 apresentou variações semelhantes ao PC2 no que diz respeito a largura da cabeça, além de variações na largura da base do tronco (Figura 13).



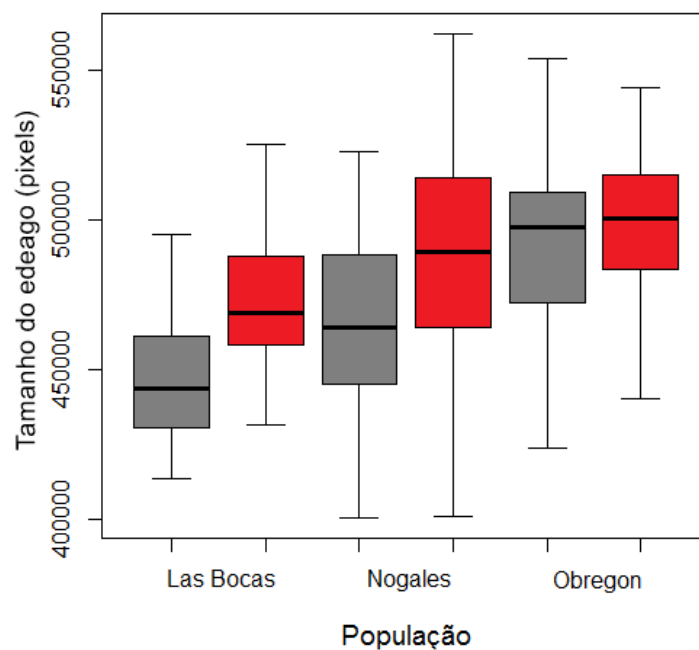
**Figura 13.** Variação da forma do edeago em *Drosophila mojavensis sonorensis* entre a dieta de cladódio e tuna descrita pelos cinco primeiros Componentes Principais (PCs) através da reconstrução do contorno. Primeira coluna, estão representadas todas as áreas de variação do edeago expressas por linhas sobrepostas. Demais colunas, variação dos contornos sem sobreposição. Mean = média; -2S.D. = menos dois desvios padrão; +2S.D. = mais dois desvios padrão.

Utilizando os dados de tamanho do contorno em pixel em uma análise de ANOVA, demonstrou haver diferença entre as populações, dietas e a interação população x dieta (Tabela 14). De modo geral, os edeagos das moscas submetidas à dieta de tuna foram maiores que os edeagos daquelas submetidas à dieta de cladódio. Dentre as populações, Las Bocas apresentou um edeago significativamente menor do que as demais populações, Nogales exibiu um edeago de tamanho intermediário e Obregon apresentou o maior edeago. Observou-se que a resposta do tamanho do edeago para a alteração na dieta nestas populações foi semelhante, isto é, ocorreu um aumento do tamanho em todas as populações, porém este aumento não foi significativo na população de Obregon (Figura 14).

**Tabela 14.** ANOVA a partir dos cinco primeiros Componentes Principais (PCs) de variância do tamanho do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis*.

	GL	SQ	QM	F
<b>População (P)</b>	2	0,278	0,139	37,94***
<b>Dieta (D)</b>	1	0,110	0,11	26,05***
<b>P x D</b>	5	0,420	0,084	26,06***
<b>Erro</b>	298	1,258	0,004	

\*\*\*p<0,001



**Figura 14.** Plasticidade fenotípica do tamanho do edeago (média +/- desvio padrão do número de pixels da área do contorno do edeago) das populações de *Drosophila mojavensis sonorensis*, submetidas às dietas de cladódios (linhas cinzas) e tunas (linhas vermelhas).

## 18. DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que, a morfologia do edeago de *Drosophila mojavensis sonorensis* apresenta variação fenotípica, tanto para a forma quanto para o tamanho, em resposta a sazonalidade de hospedeiro, isto é, a alteração de cladódios de *Stenocereus thurberi* para os frutos (tunas) de *Opuntia*. Porém, os níveis detectados foram diferentes para os dois fatores. De modo geral, o tamanho foi mais variável do que a forma, que apresentou valores muito baixos. Segundo Masly et al. (2011), forma e tamanho podem responder de maneira diferente a variações ambientais, podendo conseqüentemente evoluir de maneira independente. A alta variância fenotípica, verificada aqui para o edeago de *D. m. sonorensis*, já foi observada em outros estudos com *Drosophila*, e vem servindo de argumento contrário a hipótese chave-fechadura (ANDRADE et al., 2005; SOTO et al. 2007; SOTO et al., 2008a; RICHMOND, 2014). Por exemplo, Andrade et al. (2005), analisando a plasticidade fenotípica do edeago de *D. mediopunctata* em resposta a variação de temperatura, encontrou valores significativos apenas para tamanho, afirmando que este fator é mais suscetível às mudanças ambientais. Por outro lado, Richmond (2014) investigando o papel do tamanho e da forma do edeago nas interações de acasalamento entre as subespécies de *D. mojavensis* e a espécie irmã *D. arizonae*, encontrou que o tamanho é o fator principal de influência na interação de acoplamento (encaixe dos órgãos reprodutores) entre machos e fêmeas, cabendo à forma o papel secundário.

Segundo a hipótese de seleção sexual, há uma seleção contínua sobre as estruturas reprodutivas que ocasionaria uma variação dentro das populações, refletindo-se nas diferenças populacionais (ARNQVIST e ROWE 2002). Las Bocas, Nogales e Obregon apresentaram uma discrepância na morfologia do edeago, bem como respostas diferentes quando submetidas aos dois tratamentos, sugerindo um padrão de evolução genital diferente para cada localidade. Esta variação morfológica intrapopulacional já foi verificada para *D. m. sonorensis* anteriormente por Richmond et al. (2012). Estes autores analisaram as quatro subespécies de *D. mojavensis* e constataram que *D. m. mojavensis*, *D. m. wrigleyi* e *D. m. baja* não possuem sobreposição com relação a forma do edeago, e que a variação dentro dos agrupamentos é baixa. Ou seja, não há grandes divergências da forma dentro de cada subespécie. Por outro lado, o edeago de *D. m. sonorensis* apresentou uma



grande variação intrapopulacional, ocasionando ampla sobreposição em relação às demais subespécies. Os autores sugerem que esta variação fenotípica encontrada em *D. m. sonorensis* é resultante das pressões seletivas causadas em decorrência de ser a única subespécie que vive em simpatria com a espécie irmã *D. arizonae* (RUIZ e HEED 1988), e do fluxo gênico vindo de *D. m. baja* através do Mar de Cortez (REED et al., 2006).

As populações de Nogales e Las Bocas se encontraram mais próximas no espaço de distribuição da forma para três dos cinco primeiros Componentes Principais (PC1, 3 e 5 – Tabela 11), e apresentaram também respostas semelhantes para variação do tamanho (Figura 22). Por outro lado, a população de Obregon foi a que apresentou mais diferenças com as outras duas com relação à forma (para quatro dos cinco primeiros PCs - Tabela 11), e os seus indivíduos criados em cladódio e tuna não apresentaram diferenças significativas. Esta diferença na resposta de cada população a variação fenotípica pode estar ligada com graus diferentes de canalização no desenvolvimento da genitália masculina (SOTO et al., 2007; SOTO et al., 2008a), com fatores epigenéticos e ambientais (ATCHLEY et al., 1992), e com um controle poligênico integrado, o qual é alterado durante a cladogenese e a evolução dos grupos (FALCONER, 1989; FRANCO et al., 2006).

A região do edeago que mais variou entre as dietas, cladódio e tuna, foi a cabeça (ou porção distal), sendo esta a região de maior importância no encaixe reprodutivo e diferenciação dos grupos, já que é a primeira área de contato com o sistema reprodutor feminino. Muitos estudos corroboram com o encontrado aqui, e afirmam que esta região é a de maior variação, e por consequência, um local de forte influência evolutiva, sendo utilizada para diferenciar espécies ou grupos de indivíduos (TIDON-SKLORZ e SENE, 1995; PRADO et al., 2004; FRANCO et al., 2006; SOTO, 2012).

Soto et al. (2007) em um trabalho com *D. buzzatii* e *D. koepferae*, moscas cactófilas da América do Sul, examinaram a morfologia do edeago e a influência de dois cactos hospedeiros diferentes, *Opuntia sulphurea* e *Trichocereus candicans*. Os autores detectaram diferenças significativas no tamanho e na forma dos edeagos, sendo os valores de forma os responsáveis por diferenciar as espécies e os tratamentos utilizados. A heterogeneidade da forma observada em *D. buzzatii* e *D. koepferae* quando tratadas em duas dietas é justificada pela existência de cenários que promovem modificações diferentes influenciando a evolução genital.

Semelhante a este caso, as diferenças ambientais entre cladódios de *S. thurberi* e tunas de *Opuntia*, também sujeitam os organismos a cenários diferentes, e podem fazer com existam modificações na evolução genital para *D. m. sonorensis*.

Os edeagos das moscas tratadas com tuna foram maiores em duas (Las Bocas e Nogales) das três populações. Pelo fato de haver um aumento acentuado da genitália quando o macho se desenvolve nos frutos, é possível que ocorram problemas futuros de compatibilidade e reconhecimento no acasalamento, já que se sabe que as fêmeas têm maior facilidade para reconhecer os machos de seu próprio grupo, e o sucesso reprodutivo tende a diminuir com o aumento do órgão reprodutor masculino, pois não se estabelece uma interação de acasalamento, ocasionando mais pseudocópulas (RICHMOND, 2014). Segundo Soto et al. (2007) o tamanho do edeago não é apenas fenotipicamente plástico, mas também possui heterogeneidade substancial entre as linhagens de *Drosophila* na sua resposta às alterações ambientais, relacionando a plasticidade a uma base genética.

## 19. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desenvolver-se em dietas diferentes afetou a morfologia do edeago de *D. m. sonorensis*. Forma e tamanho são independentes e apresentaram graus diferentes de variação fenotípica. O tamanho foi mais variável e se caracterizou como o principal fator na diferenciação das populações e das dietas. Estas alterações podem influenciar a ecologia, a biologia, a evolução e o desempenho destes organismos em níveis diferentes, principalmente o que estiver relacionado ao processo reprodutivo.

O fato desta subespécie ser a mais variável de seu grupo é reforçado pela variabilidade morfológica entre as populações, que é ocasionado pelas diferenças em seus conjuntos genéticos e pelo isolamento geográfico. Verificou-se que, quanto maior a variação no tamanho menor a variação na forma entre as dietas correspondentes à uma população, e vice e versa. Esta variação se intensificou e foi mais evidente na região da cabeça, ou porção distal do edeago. Com isto, este local mais variável futuramente poderá influenciar a evolução do grupo, visto que, é a região mais importante para o acoplamento entre macho e fêmea no momento da reprodução das moscas.

Enfim, poucos são os estudos direcionados à variação morfológica intraespecífica do edeago ocasionada por mudanças nos fatores ecológicos, e suas consequências para a dinâmica das espécies. A partir disso, estudos comparando grupos próximos são necessários para determinar se as pequenas alterações naturais podem afetar a evolução rápida de estruturas complexas como os edeagos.

## 20. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

*Drosophila mojavensis sonorensis* apresentou alterações morfológicas das asas e do edeago, entre as dietas e populações distintas. No entanto, as dietas não afetaram de forma homogênea a morfologia das três populações, indicando que a exploração dos hospedeiros é específica para cada uma. Além disso, as populações de *D. m. sonorensis* são geneticamente diferentes, que em conjunto com os fatores ambientais, pode estar diretamente relacionado com as alterações morfológicas encontradas tanto para as asas, quanto para os edeagos.

Ambas as dietas causaram estresse no desenvolvimento, resultando em assimetria das asas. Porém, o estresse foi causado por fatores químicos específicos de cada hospedeiro, os quais afetaram fases diferentes do desenvolvimento das moscas. Estudos aprofundados a respeito da composição química dos frutos e cladódios de cactos diferentes, podem facilitar a detecção dos compostos responsáveis pelas alterações morfológicas, e qual a influência destas alterações para a biologia dos insetos que se utilizam destes hospedeiros.

Por fim, a alta capacidade de exploração de nichos diversificados pode favorecer *D. m. sonorensis*, reduzindo assim a competição intra e interespecífica. As alterações verificadas no trabalho atual indicam também que são necessários mais estudos correlacionando a variação fenotípica de estruturas de insetos de grupos próximos com a variação de hospedeiro, e a influência na dinâmica de populações, bem como na evolução das espécies.

## 21. REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix*, v. 24, n. 1, p. 7-14, 2013.
- ANCIAS, M.; MARINI, M. A. The effects of fragmentation on fluctuating asymmetry in passerine birds of Brazilian tropical forests. *J. Appl. Ecol.*, 37: 1013-1028, 2000.
- ANDRADE, C. A. C.; HATADANI, L. M.; KLACZKO, L. B. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: effect of the temperature. *Journal of Thermal Biology*, v. 30, n. 7, p. 518-523, 2005.
- ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 60, n. 3, p. 365-379, 1997.
- ARNQVIST, G.; MARTENSSON, T. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, v. 44, n. 1-2, p. 73-96, 1998.
- ARNQVIST, G.; ROWE, L. Correlated evolution of male and female morphologies in water striders. *Evolution*, v. 56, n. 5, p. 936-947, 2002.
- ARNQVIST, G.; THORNHILL, R. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider (Heteroptera: Gerridae: Insecta). *Genetical Research*, v. 71, n. 03, p. 193-212, 1998.
- ATCHLEY, W. R.; COWLEY, D. E.; VOGL, C.; MCLELLAN, T. Evolutionary divergence, shape change, and genetic correlation structure in the rodent mandible. *Systematic Biology*, v. 41, n. 2, p. 196-221, 1992.
- BÄCHLI, G. 2016. *TaxoDros: the database on taxonomy of Drosophilidae*. TaxoDros V.1.04, Database 2016/4. Disponível em: <<http://taxodros.unizh.ch/>>. Acessado em: 27 junho 2016.
- BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T. *Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast- Drosophila system*. Academic Press, North Ryde, New South Wales, Australia, 362p, 1982.
- BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T.; MACINTYRE, R. J. *Ecological and evolutionary genetics of Drosophila*. Plenum, New York, 524p., 1990.

BOOKSTEIN, F. L. "Size and shape": a comment on semantics. *Systematic Biology*, v. 38, n. 2, p. 173-180, 1989.

BOOKSTEIN, F. L. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge. 455 p., 1991a.

BOOKSTEIN, F. L. Thin-plate splines and the atlas problem for biomedical images. In: *Biennial International Conference on Information Processing in Medical Imaging*. Springer Berlin Heidelberg, p. 326-342, 1991b.

BREUKER, C. J.; PATTERSON, J. S.; KLINGENBERG, C. P. A Single Basis for Developmental Buffering of *Drosophila* Wing Shape. *PLoS one*, v. 1, n. 1, p. e7, 2006.

CARREIRA, V. P.; PADRÓ, J.; KOCH, N. M.; FONTANARROSA, P.; ALONSO, I.; SOTO, I. M. Nutritional Composition of *Opuntia sulphurea* G. Don Cladodes. *Cactus and Succulent Society of America*, Haseltonia, v. 19, pp. 38-45, 2014.

CARREIRA, V. P.; SOTO, I. M.; HASSON, E.; FANARA, J. J. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *Journal of evolutionary biology*, v. 19, n. 4, p. 1275-1282, 2006.

CARREIRA, V.P.; SOTO, I.M.; FANARA, J. J.; HASSON, E. A study of wing morphology and fluctuating asymmetry of interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genetica* 133: 1–11, 2008.

CORIO, C.; SOTO, I. M.; CARREIRA, V.; PADRÓ, J.; BETTI, M. I.; HASSON, E. An alkaloid fraction extracted from the cactus *Trichocereus terscheckii* affects fitness in the cactophilic fly *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 109, n. 2, p. 342-353, 2013.

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

DRYDEN, I. L.; K. V. MARDIA. *Statistical shape analysis*. John Wiley & Sons, New York. 347 p, 1998.

DUFOUR, L. Anatomie générale des Diptères. *Ann. Sci. Nat*, v. 1, p. 244-264, 1844.

EBERHARD, W. G. Sexual selection and animal genitalia. *Harvard Univ. Press*: Cambridge, MA, 1985.

EBERHARD, W. G.; HUBER, B. A.; RODRIGUEZ, R. L.; BRICENO, R. D.; SALAS, I.; RODRIGUEZ, V. One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution*, 52:415–431, 1998.

ETGES, W. J.; JACKSON, L. L. Epicuticular hydrocarbon variation in *Drosophila mojavensis* cluster species. *J. Chem. Ecol.*, v.27, p. 2125-2149, 2001.

FALCONER, D. S. Introduction to quantitative genetics. London, *Longman*, 2<sup>ed.</sup>, p. 456, 1989.

FANARA, J. J.; FONTDEVILA, A.; HASSON, E. Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. *Evol. Ecol.*, v.13, p.173-190, 1999.

FANARA, J. J.; MENSCH, J.; FOLGUERA, G.; HASSON, E. Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* reared in different natural hosts. *Evolutionary Ecology*, v. 18, n. 3, p. 203-214, 2004.

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*, v. 55, n. 12, p. 2615-2619, 2001.

FELLOWS, D. F.; HEED, W. B. Factors affecting host plant selection in desert-adapted cactophilic *Drosophila*. *Ecology*, v.53, p.850-858, 1972.

FEUGANG, J. M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F. C.; ZOU, C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia spp.*) cladodes and fruits. *Front Biosci*, v. 11, n. 1, p. 2574-2589, 2006.

FOGLEMEN, J. C.; ABRIL, J. R. Ecological and evolutionary importance of host plant chemistry. In: *Ecological and evolutionary genetics of Drosophila*. Springer US, p. 121-143, 1990.

FOGLEMEN, J. C.; DANIELSON, P. B. Chemical interactions in the cactus-microorganism -*Drosophila* model system of the Sonora desert. *American Zoologist* 41: 877–889, 2001.

FRANCO, F. F.; PRADO, P. R.; SENE, F. M.; COSTA, L. F.; MANFRIN, M. H. Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related cactophilic species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in South America. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 78, n. 2, p. 203-212, 2006.

FREEMAN, D. C.; GRAHAM, J. H.; EMLÉN, J. M.; TRACY, M. A. R. Y.; HOUGH, R. A.; ALADOS, C. L.; ESCÓS, J. Plant developmental instability: new measures, applications, and regulation. *Developmental instability: causes and consequences*, p. 367-386, 2003.

FRENCH, A.; MACEDO, M.; POULSEN, J.; WATERSON, T.; YU, A. Multivariate analysis of variance (MANOVA). [http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/manova/MANOVA\\_newest.pdf](http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/manova/MANOVA_newest.pdf), 2010.

HASSON, E.; SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; CORIO, C.; SOTO, E. M.; BETTI, M. I. Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. *Ecotoxicology research developments*, pp. 89-109, 2009.

HATADANI, L. M.; KLACZKO, L. B. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica*, v. 133, n. 3, p. 335-342, 2008.

HEED, W. B. Ecology and genetics of Sonoran desert *Drosophila*. In: *Ecological genetics: The interface*. Springer New York, p. 109-126, 1978.

HEED, W. B.; MANGAN, R. L. Community ecology of Sonoran Desert *Drosophila*. In: *The genetics and biology of Drosophila* (M. Ashburner, H. Carson e J. N. Thompson, eds.), *Academic Press*, San Diego, CA, pp. 311 – 245, 1986.

HOFFMANN, A. A.; SHIRRIFFS, J. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution*, v. 50, pp. 1068–1073, 2002.

HOFFMANN, A. A.; COLLINS, E.; WOODS, R. E. Wing shape and wing size changes as indicators of environmental stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths: comparing shifts in means, variances and asymmetries. *Environmental Entomology*, V. 31, p. 965 – 971, 2002.

HOFFMANN, A. A.; WOODS, R. E. Associating environmental stress with developmental stability: problems and patterns. In: *Developmental Instability: Causes and Consequences* (ed. M Polak), Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 387-401, 2003.

HOFFMANN, A. A.; WOODS, R. E.; COLLINS, E.; WALLIN, K.; WHITE, A.; MCKENZIE, J. A. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Aust. J. Entomol.* V. 44, pp. 233–243, 2005.

HOGG, I. D.; EADIE, J. M.; WILLIAMS, D. D.; TURNER, D. Evaluating fluctuating asymmetry in a stream-dwelling insect as an indicator of low level thermal stress: a large-scale field experiment. *Journal of Applied Ecology*, v. 38, 1326–1339, 2001.



HOSKEN, D. J.; BLANCKENHORN, W. U.; WARD, P. I. Developmental stability in yellow dung flies (*Scathophaga stercoraria*): fluctuating asymmetry, heterozygosity and environmental stress. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 13, p. 919–926, 2000.

HOSKEN, D. J.; STOCKLEY, P. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 19, n. 2, p. 87-93, 2004.

HOULE, D.; MEZEY, J.; GALPERN, P.; CARTER, A. Automated measurement of *Drosophila* wings. *BMC Evolutionary Biology*, v. 3, p. 25–37, 2003.

IWATA, H.; UKAI, Y. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity*, v. 93, n. 5, p. 384-385, 2002.

JONES, C D. The genetic basis of *Drosophila sechellia*'s resistance to a host plant toxin. *Genetics*, v. 149, n. 4, p. 1899-1908, 1998.

JONES, C. D. Genetics of egg production in *Drosophila sechellia*. *Heredity*, v.92, p.235-241, 2004.

KANESHIRO, K. Y. A study of the relationships of hawaiian *Drosophila* species based on the external male genitalia. *The University of Texas Publication*, v.6918, p.55-69, 1969.

KARK, S. Shifts in bilateral asymmetry within a distribution range: The case of the chucar partridge. *Evolution*, v. 55, p. 2088 – 2096, 2001.

KAUN, K. R.; CHAKOBORTY-CHATTERIEE, M.; SOKOLOWSKI, M. B. Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. *J. Exp. Biol.*, v.211, p.3160–3166, 2008.

KHATTREE, R.; NAIK, D. N. *Multivariate data reduction and discrimination with SAS software*. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 558 p., 2000.

KLINGENBERG, C. P. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry*, v. 7, p.843–934, 2015.

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

KLINGENBERG, C. P. Morphological integration and developmental modularity. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, p. 115-132, 2008.

KLINGENBERG, C. P. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evolution & development*, v. 11, n. 4, p. 405-421, 2009.

KLINGENBERG, C. P. Studying morphological integration and modularity at multiple levels: concepts and analysis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 369, n. 1649, p. 1-9, 2014.

KLINGENBERG, C. P.; BARLUENGA, M.; MEYER, A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, v. 56, n. 10, p. 1909-1920, 2002.

KLINGENBERG, C. P.; MCINTYRE, G. S. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, v.52, p.1363–1375, 1998.

KLINGENBERG, C. P.; MONTEIRO, L. R. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*, v. 54, n. 4, p. 678-688, 2005.

KLINGENBERG, C. P.; ZAKLAN, S. D. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*, v.54, p.1273–1285, 2000.

KLINGENBERG, C. P.; BADYAEV, A. V.; SOWRY, S. M.; BECKWITH, N. J. Inferring developmental modularity from morphological integration: Analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. *Am. Nat.* V. 157, pp. 11–23, 2001.

KUHL, F. P.; GIARDINA, C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer graphics and image processing*, v. 18, n. 3, p. 236-258, 1982.

LEE, K. P.; SIMPSON, S. J.; WILSON, K. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct. Ecol.*, v.22, p.1052–1061, 2008.

LENS, L.; DONGEN, S.; WILDER, C. M.; BROOKS, T. M.; MATTHYSEN, E. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. *Proc. R. Soc. Ser. B* 266, 1241–1246, 1999.

LESTREL, P. E. *Fourier descriptors and their applications in biology*. Cambridge University Press, 2008.

LEUNG, B.; FORBES, M. R. Fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness: effects of trait type as revealed by meta-analysis. *Ecoscience*, v. 3, n. 4, p. 400-413, 1996.

LIU, J.; MERCER, J. M.; STAM, L. F.; GIBSON, G. C.; ZENG, Z. B.; LAURIE, C. C. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics*, v. 142, n. 4, p. 1129-1145, 1996.

LUDOŠKI, J.; FRANCUSKI, L.; VUJIC, A.; MILANKOV, V. The *Cheilosis canicularis* group (Diptera: Syrphidae): species delimitation and evolutionary relationships based on wing geometric morphometrics. *Zootaxa*, v. 1825, p. 40-50, 2008.

LYRA, M. L.; HATADANI, L. M.; DE AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; KLACZKO, L. B. Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. *Bulletin of entomological research*, v. 100, n. 01, p. 19-26, 2010.

MACHADO, C. A.; MATZKIN, L. M.; REED, L. K.; MARKOW, T. A. Multilocus nuclear sequences reveal intra- and interspecific relationships among chromosomally polymorphic species of cactophilic *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 16:3009–3024, 2007.

MAIR, W., GOYMER, P., PLETCHER, S. D., PARTRIDGE, L. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science*, v. 301, n. 5640, p. 1731-1733, 2003.

MARCHAND, H.; PAILLAT, G.; MONTUIRE, S.; BUTET, A. Fluctuating asymmetry in bank vole populations (*Rodentia Arvicolinae*) reflects stress caused by land-scape fragmentation in the Mont-Saint-Michel Bay. *Biol. J. Linn. Soc.* 80,37–44, 2003.

MARKOW, T. A. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology*, v. 40, n. 1, p. 105-120, 1995.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Funct. Ecol.*, v.22, p.747– 759, 2008.

MARKOW, T. A.; RAPHAEL, B.; BREITMEYER, C. M.; DOBBERFUHL, D.; ELSER, J.; PFEILER, E. J. Elemental stoichiometry of *Drosophila* and their hosts. *Funct. Ecol.*, v.13, p.78–84, 1999.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. *Drosophila: a guide to species identification and use*. Academic Press, 2005.

MARKOW, T. A. Sexual isolation among populations of *Drosophila mojavensis*. *Evolution*, v. 45, n. 6, p. 1525-1529, 1991.

MASLY, J. P.; DALTON, J. E.; SRIVASTAVA, S.; CHEN, L.; ARBEITMAN, M. N. The genetic basis of rapidly evolving male genital morphology in *Drosophila*. *Genetics*, v. 189, n. 1, p. 357-374, 2011.

MATZKIN, L. M.; MARKOW, T. A. Transcriptional differentiation across the four subspecies of *Drosophila mojavensis*. *Speciation: Natural Processes, Genetics and Biodiversity*. pp.121-135, 2013.

MATZKIN L. M.; WATTS T. D.; BITLER B. G.; MACHADO C. A.; MARKOW T. A. Functional genomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology* 15: 4635–4643, 2006.

MATZKIN, L. M. Activity variation in alcohol dehydrogenase paralogs is associated with adaptation to cactus host use in cactophilic *Drosophila*. *Mol. Ecol.*, v.14, p.2223–2231, 2005.

MATZKIN, L. M. Population transcriptomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Mol. Ecol.*, v.21, p.2428–2439, 2012.

MATZKIN, L. M.; JOHNSON, S.; PAIGHT, C.; BOZINOVIC, G.; MARKOW, T.A. Dietary Protein and Sugar Differentially Affect Development and Metabolic Pools in Ecologically Diverse *Drosophila*. *J. Nutr.*, v.141, p.1127–1133, 2011.

MATZKIN, L. M.; JOHNSON, S.; PAIGHT, C.; MARKOW, T. A. Preadult Parental Diet Affects Offspring Development and Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, v.8, e59530, 2013.

MAYR, E. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1963.

MCDONALD, J. H. Multiple comparisons: Controlling the false discovery rate: Benjamini–Hochberg procedure. *Handbook of Biological Statistics*. Baltimore, Maryland: Sparkly House Publishing, p. 254-260, 2014.

MØLLER, A. P.; SWADDLE, J. P. *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, UK, 1997.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. Princípios de morfometria geométrica. Editora *Holus*, Ribeirão Preto. 189 p., 1999.

MORAES, E. M.; SPRESSOLA, V. L.; PRADO, P. R. R.; COSTA, L. F.; SENE, F. M. Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v.42, p. 154-158, 2004.

NEFF, N. A.; MARCUS, L. F. *A survey of multivariate methods for systematics*. Printed at the American Museum of Natural History, 1980.

OLIVEIRA, D. C. S. G.; ALMEIDA, F. C.; O'GRADY, P. M.; ARMELLA, M. A.; DESALLE, R.; ETGES, W. J. Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.64, p.533-544, 2012.

PALMER, A. R. Antisymmetry. In *Variation: A Central Concept in Biology*; Hallgrímsson, B., Hall, B.K., Eds.; Elsevier: *Burlington, MA, USA*, pp. 359–397, 2005.

PALMER, A. R. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Springer Netherlands, p. 335-364., 1994.

PALMER, A. R.; STROBECK, C. CH 17. Fluctuating asymmetry analyses revisited. *Developmental Instability: Causes and Consequences*, Oxford University Press, *Oxford*, p. 279-319, 2003.

PALMER, A. R.; STROBECK, C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* v. 17, pp. 391-421, 1986.

PAZ, M. G. T.; NEIVA, E. R. O Poder discriminante da escala de configuração do poder organizacional na perspectiva macro organizacional e sua utilização como instrumento de caracterização do perfil cultural das organizações. *Revista Psicologia Organizações e Trabalho*, v. 14, n. 2, p. 153-168, 2014.

PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R.; SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Cien. Cult.*, v.35, p.1313-1319, 1983.

PEZZOLI, M.C.; GUERRA, D.; GEORGI, G.; GAROIA, F.; CAVICCHI, S. Developmental constraints and wing shape variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, V. 79, p. 527–572, 1997.

PFEILER, E.; CASTREZANA, S.; REED, L. K.; MARKOW, T. A. Genetic, ecological and morphological differences among populations of the cactophilic *Drosophila mojavensis* from southwestern USA and northwestern Mexico, with descriptions of two new subspecies. *J. Nat. Hist.*, v.43, p.923-938, 2009.

PITHER, J.; TAYLOR, P. D. Directional and fluctuating asymmetry in the black-winged damselfly *Calopteryx maculata* (Beauvois) (Odonata: Calopterygidae). *Canadian Journal of Zoology*, v. 78, n. 10, p. 1740-1748, 2000.

POWELL. J. R. *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila model*. Oxford Univ. Press., 562p., 1997.

PRADO, P. R. P.; FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H.; COSTA, L. D. F.; SENE, F. M. An easy and fast way to analyze morphometric characters. In: *Proc Third Braz Symp Mathem Comp Biol.* p. 329-340, 2004.

R Development Core Team. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Available at <http://www.R-project.org/>.

REED, L. K.; WILLIAMS, S.; SPRINGSTON, M.; BROWN, J.; FREEMAN, K.; DESROCHES, C. E.; SOKOLOWSKI, M. B.; GIBSON, G. Genotype-by-Diet Interactions Drive Metabolic Phenotype Variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.185, p.1009–1019, 2010.

REED, L. K.; NYBOER, M.; MARKOW, T. A. Evolutionary relationships of *Drosophila mojavensis* geographic host races and their sister species *Drosophila arizonae*. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 5, p. 1007-1022, 2006.

RICHMOND, M. P. The role of aedeagus size and shape in failed mating interactions among recently diverged taxa in the *Drosophila mojavensis* species cluster. *BMC evolutionary biology*, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

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

RION, S.; KAWECKI, T. J. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *J. Evol. Biol.*, v.20, p.1655–1664, 2007.

ROHLF, F. J. TPSUtil, Utility program useful when working with tps files, Version 1.61. State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>, 2013.

ROHLF, F. J. TPSDig, Digitize Landmarks and Outlines, Version 2.19. State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>, 2015.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

RUIZ, A.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M. Evolution of the *mojavensis* cluster of cactophilic *Drosophila* with descriptions of two new species. *Journal of Heredity*, v.81, p.30-42, 1990.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand, p.421, 2005.

SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E. Nota características químicas y físicas de pulpa de tuna (*Opuntia ficus indica*). *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos*, v. 30, n. 4, p. 551-555, 1990.

SOTO, E.; GOENAGA, J.; HURTADO, J.; HASSON, E. Oviposition and performance in natural hosts in cactophilic *Drosophila*. *Evol. Ecol.*, v.26, p.975–990, 2012.

SOTO, I. M. Aedeagal divergence in sympatric populations of two sibling species of cactophilic *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): evidence of character displacement?. *Neotropical entomology*, v. 41, n. 3, p. 207-213, 2012.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; SOTO, E. M.; HASSON, E. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *J. Evol. Biol.*, v. 21, p.598-609, 2008b.

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

SOTO, I. M.; MANFRIN, M. H.; HASSON, E. Host-dependent phenotypic plasticity of aedeagus morphology in a pair of cactophilic sibling *Drosophila* species of the *repleta* group (Diptera: Drosophilidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v.46, p.368-373, 2008a.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; CORIO, C.; PADRÓ, J.; SOTO, E. M.; HASSON, E. Differences in tolerance to host cactus alkaloids in *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii*. *PLoS one*, v. 9, n. 2, p. e88370, 2014.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; CORIO, C.; SOTO, E. M.; HASSON, E. Host use and developmental instability in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 137, p.165-175, 2010.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; FANARA, J. J.; HASSON, E. R. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evol. Biol.*, v.7, p.77-87, 2007.

STARK, J.; BONACUM, J.; REMSEN, J.; DESALLE, R. The evolution and development of dipteran wing veins: a systematic approach. *Annual review of entomology*, v. 44, n. 1, p. 97-129, 1999.

STATSOFT, Inc. Statistica (data analysis software system). version 8.0. [www.statsoft.com.2007](http://www.statsoft.com.2007).

TAO, L.; BERNS, A. R.; HUNTER, M. D. Why does a good thing become too much? Interactions between foliar nutrients and toxins determine performance of an insect herbivore. *Functional ecology*, v. 28, n. 1, p. 190-196, 2014.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Fauna of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in the northern area of the "Cadeia do Espinhaço", states of Minas Gerais and Bahia, Brazil: biogeographical and ecological aspects. *Iheringia Ser. Zool*, v. 78, p. 85-94, 1995.

VAN VALEN, L. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, v. 16, pp. 1-7, 1962.

VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera: Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v.27, p.1–114, 1983.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, v. 63, n. Suppl., 1990.

VILLEMANT, C.; SIMBOLOTTI, G.; KENIS, M. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*, v. 32, n. 4, p. 625-634, 2007.

WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: *Drosophila Inversion Polymorphism* (C. B. Krimbas e J. R. Powell, eds.), p.455–552. CRC Press, Boca Raton, EUA, 1992.

WASSERMAN, M. Evolution and speciation in selected species groups. Evolution in the *replete* group. In: *The genetics and biology of Drosophila* (M. Ashburner, H. L. Carson e J. N. Thompson, Jr., eds.), vol. 3b, p.61-139. Academic, London, United Kingdom, 1982.

WHEELER, M. R.; KAMBYSELLIS, M. P. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. The University of Texas Publication 6615: 533-565, 1966.

ZEN (blue edition), 2011. © Carl Zeiss Microscopy GmbH.