



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE - UNICENTRO

SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS - SEAA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA - PPGBioEvol

Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO

KAROLINE APARECIDA VIEIRA DOS SANTOS

Adaptação divergente de *Drosophila mercatorum* a diferentes ambientes da Mata Atlântica

GUARAPUAVA-PR

2021

KAROLINE APARECIDA VIEIRA DOS SANTOS

Adaptação divergente de *Drosophila mercatorum* a diferentes ambientes da Mata Atlântica

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro Oeste, em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Biologia Evolutiva.

Orientador: Dr. Rogério Pincela Mateus

Coorientadora: Dra. Luciana Paes de Barros Machado

GUARAPUAVA-PR

2021

Catalogação na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

Santos, Karoline Aparecida Vieira dos

S237a Adaptação divergente de *Drosophila mercatorum* a diferentes ambientes
da Mata Atlântica / Karoline Aparecida Vieira dos Santos. — Guarapuava,
2021.
xii, 87.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Associação Ampla entre
UEPG e UNICENTRO. Área de concentração: Biologia Evolutiva, 2021.

Orientador: Rogério Pincela Mateus
Coorientadora: Luciana Paes de Barros Machado

Banca examinadora: Maria Luisa Tunes Buschini, Maria Claudia Colla
Ruvolo Takasusuki

Bibliografia

1. Variação ambiental. 2. Tempo de desenvolvimento. 3. Glicogênio. 4. Triglicerídeos. 5. Proteínas totais. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 570

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, *Mariliane Pelonio dos Santos* e *Marcos José Vieira dos Santos*, com todo amor e gratidão! Obrigada tudo.

“Enquanto todo mundo espera a cura do mal
E a loucura finge que isso tudo é normal
Eu finjo ter paciência

O mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo e o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência”

Paciência - Lenine

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professor Dr. Rogério Pincela Mateus e professora Dra. Luciana Paes de Barros Machado, pelo auxílio durante a realização deste trabalho, pela paciência, pela convivência e amizade.

A professora Dra. Emanuele Gustani por toda ajuda na parte estatística, por sempre estar de prontidão para sanar as minhas dúvidas e por toda a contribuição para o fechamento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Evolução, pelo convívio em laboratório. Deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos a minha ex-colega de laboratório Camila Heloise dos Santos pela amizade que criamos, e por toda forma de auxílio, cada ajuda foi de grande valia.

Aos meus Pais Marcos e Mariliane, por terem me dado a vida, amor, educação, me fornecerem estudo, e expressarem orgulho das minhas conquistas, se estou onde cheguei foi por vocês! As minhas irmãs Vanessa e Marielen, pelo companheirismo, por serem sempre as minhas melhores amigas e sempre de alguma forma me protegerem por ser a irmã caçula, vocês são guerreiras e me inspiram na vida, amo vocês! Ao meu “Quarteto Fantástico” Mariana, Heloisa, Isabela e Arthur, vocês são a minha alegria, e a tia ama vocês profundamente!

Ao meu noivo Matheus, por escolher dividir a vida comigo, por todos os momentos de apoio, por me fornecer calmaria nos momentos de ansiedade, por ficar comigo de manhã à tarde nos finais de semana no laboratório durante o período dos experimentos, por todo amor e incentivo! Amo você!

As minhas amigas, Maria Cristina e Camila, por serem tão presentes mesmo nesses tempos de isolamento. Por toda amizade, companheirismo, momentos divertidos, momentos de conversas e conselhos trocados. Vocês são muito importantes na minha vida! Presentes que a biologia me deu.

Aos meus colegas do PPG da turma de 2019, agradeço por todo o convívio durante o cumprimento das disciplinas. Aqui, agradeço em especial a Daiane, que deixou de ser colega e se tornou uma amiga! Obrigada por todos os momentos de conversa e desabafo, e por sempre me fazer ver o lado bom das coisas! Você é incrível!

Aos professores e funcionários membros do PPG em Biologia Evolutiva pela contribuição em minha formação.

À Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo suporte físico, à CAPES pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada

RESUMO

Os insetos são modelos para estudos sobre a influência de fatores bióticos e abióticos em componentes do valor adaptativo, como os caracteres de história de vida e do metabolismo. Dentro os insetos da ordem Diptera, *Drosophila melanogaster* é uma das espécies mais estudadas. No entanto, as análises em espécies e populações do Neotropical, região com a maior diversidade de habitats e fontes de recursos, são escassas. *Drosophila mercatorum* é uma espécie Neotropical do grupo *repleta* que é coletada em abundância em áreas abertas e matas, com e sem associação com vegetação xerofítica, de vários biomas brasileiros. Este trabalho teve como objetivo contribuir com o entendimento da adaptação e variação populacional de caracteres de história de vida, como viabilidade (VI), tempo de desenvolvimento (TD) e peso seco (PS), além do armazenamento de componentes do metabolismo, triglicerídeo (TG), glicogênio (GL) e proteína (PT), em populações provenientes da Mata Atlântica, com e sem associação a vegetação xerofítica, das regiões Sudeste e Sul do Brasil. No primeiro capítulo avaliamos e comparamos esses caracteres de populações de *D. mercatorum* recém coletadas e mantidas em meio de cultura padrão (banana/ágar) com outras espécies Neotropicais, *D. willistoni*, do subgênero *Sophophora*, e *D. maculifrons* e *D. ornatifrons* do subgênero *Drosophila*, assim como *D. mercatorum*. As populações de *D. mercatorum* da região Sudeste apresentaram valores significativamente menores que da região Sul para todos os parâmetros analisados, com exceção da viabilidade em que não houve diferença entre as populações desta espécie. A comparação interespécifica não refletiu as relações filogenéticas, especialmente para os metabólitos. Os resultados sugerem que a maior VI (e menor TD) de *D. mercatorum* e *D. willistoni* estaria relacionada com a habilidade destas espécies na exploração de uma maior variação de ambientes, enquanto que a menor capacidade de armazenamento dos metabólitos de *D. mercatorum* poderia ser um evento compensatório (*trade-off*) a sua maior habilidade de exploração ambiental. No segundo capítulo avaliamos os efeitos de diferentes tipos de dieta que diferem em quantidade de proteína:carboidrato (HPS, EPS e LPS) para verificar se as possíveis diferenças entre populações geograficamente distantes são modificações decorrentes da plasticidade fenotípica em resposta ao estresse nutricional, ou se essas diferenças são provenientes da diversificação regional. Nossos resultados sugerem estar ocorrendo, além do efeito dietético, um efeito populacional entre os indivíduos das regiões Sul e Sudeste, tanto nos caracteres bionômicos, quanto nos conteúdos metabólicos em ambos os tipos de vegetação, e podem ser reflexo dos ambientes aos quais as populações estão adaptadas, em conjunto dos fatores estressantes das dietas testadas sobre cada população.

Palavra-chave: Viabilidade, Tempo de desenvolvimento, Variação ambiental, Glicogênio, Triglicerídeos, Proteínas totais.

ABSTRACT

Insects are models for studies on the influence of biotic and abiotic factors on adaptive value components, such as life history and metabolism characters. Among the insects of the order Diptera, *Drosophila melanogaster* is one of the most studied species. However, analyzes of species and populations in the Neotropics, a region with the greatest diversity of habitats and sources of resources, are scarce. *Drosophila mercatorum* is a Neotropical species of the *repleta* group that is abundantly collected in open areas and forests, with and without association with xerophytic vegetation, from several Brazilian biomes. This work aimed to contribute to the understanding of adaptation and population variation of life history characters, such as viability (VI), development time (DT) and dry weight (PS), in addition to the storage of metabolic components, triglycerides (TG), glycogen (GL) and protein (PT), in populations from the Atlantic Forest, with and without association with xerophytic vegetation, from the Southeast and South regions of Brazil. In the first chapter we evaluated and compared these characters from populations of *D. mercatorum* recently collected and maintained on standard culture medium (banana/agar) with other Neotropical species, *D. willistoni*, of the subgenus *Sophophora*, and *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* subgenus *Drosophila*, as well as *D. mercatorum*. The populations of *D. mercatorum* from the Southeast region showed significantly lower values than those from the South region for all parameters analyzed, with the exception of viability in which there was no difference between the populations of this species. The interspecific comparison did not reflect the phylogenetic relationships, especially for the metabolites. The results suggest that the higher VI (and lower TD) of *D. mercatorum* and *D. willistoni* would be related to the ability of these species to explore a greater range of environments, while the lower storage capacity of *D. mercatorum* metabolites could be a trade-off event in your greatest environmental exploration ability. In the second chapter, we evaluated the effects of different types of diet that differ in protein:carbohydrate (HPS, EPS and LPS) to verify whether the possible differences between geographically distant populations are changes due to phenotypic plasticity in response to nutritional stress, or whether these differences are due to regional diversification. Our results suggest that, in addition to the dietary effect, a population effect is occurring among individuals in the South and Southeast regions, both in bionomic characters and in metabolic contents in both types of vegetation, and may be a reflection of the environments in which the populations are adapted, together with the stressors of the diets tested on each population.

Keyword: Viability, Development time, Environmental variation, Glycogen, Triglycerides, Total proteins.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	
Figure 1 Viability of second instar larva to adult for populations of <i>Drosophila willistoni</i> (CAJ, PMA and POA), <i>D. mercatorum</i> (SER, CAJ, SAN and POA), <i>D. maculifrons</i> (CAJ and PMA) and <i>D. ornatifrons</i> (CAJ and PMA). Viability was calculated as the ratio emerged adults/total larvae.	43
Figure 2 Development time from second instar larva to emerged adults for populations of <i>Drosophila willistoni</i> (CAJ, PMA and POA), <i>D. mercatorum</i> (SER, CAJ, SAN and POA), <i>D. maculifrons</i> (CAJ and PMA) and <i>D. ornatifrons</i> (CAJ and PMA). The development times were measured in hours.	44
Figure 3 dry weights in milligrams of adult female and male from populations of <i>Drosophila willistoni</i> (CAJ, PMA and POA), <i>D. mercatorum</i> (SER, CAJ, SAN and POA), <i>D. maculifrons</i> (CAJ and PMA) and <i>D. ornatifrons</i> (CAJ and PMA). Individual dry weights were calculated from samples of 15 recently emerged flies of <i>D. willistoni</i> , and 5 recently emerged flies of <i>D. mercatorum</i> , <i>D. maculifrons</i> and <i>D. ornatifrons</i> .	45
Figure 4 Triglycerides (A), Glycogen (B), and Total Protein (C) concentrations per mg of dry weight of adult female and male from populations of <i>Drosophila willistoni</i> (CAJ, PMA and POA), <i>D. mercatorum</i> (SER, CAJ, SAN and POA), <i>D. maculifrons</i> (CAJ and PMA) and <i>D. ornatifrons</i> (CAJ and PMA). Values are means and SE for homogenates of 15 flies for <i>D. willistoni</i> and 5 flies for <i>D. mercatorum</i> , <i>D. maculifrons</i> and <i>D. ornatifrons</i> .	46
Capítulo 2	
Figura 1 Heatmaps da variação dos caracteres bionômicos e dos conteúdos metabólicos das populações coletadas em matas sem a presença de vegetação xerofítica do Sul (POA) e do Sudeste (CAJ) do Brasil, submetidas a três dietas HPS, EPS e LPS.	57
Figura 2 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de <i>D. mercatorum</i> não associadas a vegetação xerofítica, CAJ e POA. VLA= Viabilidade larva-adulto; TLA = Tempo de desenvolvimento larva adulto; Trig = Triglicerideos; Glico= Glicogênio; Prot= Proteína.	58
Figura 3 Heatmaps da variação dos caracteres bionômicos e dos conteúdos metabólicos das populações coletadas em matas com a presença de vegetação xerofítica do Sul (SAN) e do Sudeste (SER) do Brasil, submetidas a três dietas HPS, EPS e LPS.	60
Figura 4 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de <i>D. mercatorum</i> associadas a vegetação xerofítica, SAN e SER. VLA= Viabilidade larva-adulto; TLA = Tempo de desenvolvimento larva adulto; Trig = Triglicerideos; Glico= Glicogênio; Prot= Proteína.	61
Figura 5 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) das viabilidades (%) larva-pupa (VLP) e larva-adulto (VLA) das populações de Porto Alegre/RS (POA), Santiago/RS (SAN), Cajuru/SP (CAJ) e Serrana/SP (SER) de <i>Drosophila mercatorum</i> , submetidas as três dietas HPS, EPS e LPS.	77

Figura 6 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) dos tempos de desenvolvimento (em horas) larva-pupa (TLP) e larva-adulto (TLA) das populações de Porto Alegre/RS (POA), Santiago/RS (SAN), Cajuru/SP (CAJ) e Serrana/SP (SER) de <i>Drosophila mercatorum</i> ., submetidas às dietas HPS, EPS e LPS.	78
Figura 7 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) do peso seco (μg) de machos e fêmeas das populações Porto Alegre/RS (POA), Santiago/RS (SAN), Cajuru/SP (CAJ) e Serrana/SP (SER) de <i>Drosophila mercatorum</i> nas três dietas, HPS, EPS e LPS	79
Figura 8 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) das concentrações de triglicerídeos, glicogênio e proteínas totais, por peso seco ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), de machos e fêmeas de populações (POA, SAN, CAJ e SER) de <i>Drosophila mercatorum</i> .	80

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1
Table 1 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of viability for <i>Drosophila willistoni</i> , <i>D. mercatorum</i> , <i>D. maculifrons</i> and <i>D. ornatifrons</i> . SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.
Table 2 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of development time for <i>Drosophila willistoni</i> , <i>D. mercatorum</i> , <i>D. maculifrons</i> and <i>D. ornatifrons</i> . SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.
Table 3 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of dry weight for <i>Drosophila willistoni</i> , <i>D. mercatorum</i> , <i>D. maculifrons</i> and <i>D. ornatifrons</i> . SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.
Table 4 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of Triglycerides, Glycogen e Total Protein contents per mg of dry weight for <i>Drosophila willistoni</i> , <i>D. mercatorum</i> , <i>D. maculifrons</i> and <i>D. ornatifrons</i> . SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.
Capítulo 2
Tabela 1 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de <i>D. mercatorum</i> não associadas a vegetação xerofítica, CAJ e POA. POP = população; GL = graus de liberdade; F = estatística de teste; Num GL = graus de liberdade para o numerador; Dem GL = graus de liberdade para o denominador comum; Pr (>F) = valor de p. *** = p<0,001.
Tabela 2 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de <i>D. mercatorum</i> associadas a vegetação xerofítica, SER e SAN. POP = população; GL = graus de liberdade; F = estatística de teste; Num GL = graus de liberdade para o numerador; Dem GL = graus de liberdade para o denominador comum; Pr (>F) = valor de p. ***p<0,001.
Tabela 3 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Viabilidade Larva-adulto (VLA) nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,106$; $F = 3,212$; $GL = 106$ *** $p < 0,001$.
Tabela 4 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Tempo de desenvolvimento Larva-adulto (TLA) nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,7163$; $F = 48,12$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.
Tabela 5 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de triglicerídeos nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,7348$; $F = 52,71$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

Tabela 6 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Glicogênio nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,1822$; $F = 5,158$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

Tabela 7 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Proteína nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,4233$; $F = 14,7$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

Tabela 8 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Viabilidade Larva-adulto (VLA) nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,04733$; $F = 1,96$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$.

Tabela 9 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Tempo de desenvolvimento Larva-adulto (TLA) nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,7858$; $F = 71,93$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$.

Tabela 10 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de triglicerídeos nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,7522$; $F = 59,69$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$.

Tabela 11 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Glicogênio nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,4843$; $F = 19,15$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$.

Tabela 12 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Proteína nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,6896$; $F = 43,95$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg = microgramas

CAJ = Cajuru-SP

DPB = Dieta Padrão de Banana

EPS = Equal Protein/Sugar ratio – Proporção igual proteína/açúcar na dieta

GL = Glicogênio

HPS = High Protein/Sugar ratio – Alta proporção proteína/açúcar na dieta

LPS = Low Protein/Sugar ratio – Baixa proporção proteína/açúcar na dieta

MÁX = Temperatura média máxima

MIN = Temperatura média mínima

°C = Graus Celsius

PMA = Parque Municipal das Araucárias

POA = Porto Alegre-RS

PS = Peso seco

PT = Proteína

SAN = Santiago-RS

SER = Serrana-SP

TD = Tempo de desenvolvimento

TG = Triglicerídeo

Tº = Temperatura média

UR = Umidade relativa

VI = Viabilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1	Áreas de estudo e linhagens.....	18
3.2	Desenho experimental	18
4	RESULTADOS	19
4.1	CAPÍTULO 1	19
4.1.1	BACKGROUND.....	20
4.1.2	MATERIALS AND METHODS.....	22
4.1.2.1	Collection areas	22
4.1.2.2	Experimental design	23
4.1.2.3	Analysis of life history traits	23
4.1.2.4	Analysis of metabolic pools	24
4.1.2.5	Statistical analyses.....	24
4.1.3	RESULTS	25
4.1.3.1	Viability (VI)	25
4.1.3.2	Development time (DT)	25
4.1.3.3	Dry weight (DW) of adults	26
4.1.3.4	Metabolic pools	26
4.1.4	DISCUSSION	27
4.1.5	CONCLUSIONS.....	31
4.1.6	REFERENCES.....	33
4.2	CAPÍTULO 2	47
4.2.1	RESUMO:	47
4.2.2	ABSTRACT	48
4.2.3	INTRODUÇÃO.....	49
4.2.4	METODOLOGIA.....	51
4.2.4.1	Linhagens, dietas e desenho experimental	51
4.2.4.2	Análises de caracteres bionômicos	53
4.2.4.3	Análises metabólicas	54
4.2.4.4	Análises estatísticas	55

4.2.5	RESULTADOS.....	55
4.2.5.1	Populações não associadas a vegetação xerofítica	55
4.2.5.2	Populações associadas a vegetação xerofítica	59
4.2.6	DISCUSSÃO.....	62
4.2.7	CONCLUSÃO:.....	66
4.2.8	REFERÊNCIAS:	66
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A ordem Diptera é composta por aproximadamente 150.000 espécies descritas, classificadas em 150 famílias e 10.000 gêneros, sendo uma das mais ricas da Classe Insecta, com cerca de 15% das espécies viventes (PAPE et al., 2009). A família Drosophilidae possui aproximadamente 4.500 espécies distribuídas em duas subfamílias e cerca de 77 gêneros (BÄCHLI, 2021). Os membros dessa família ocupam uma grande diversidade de nichos ecológicos e têm ampla distribuição (MARKOW; O'GRADY, 2008), sendo capazes de utilizar uma gama diferenciada de substratos como fonte energética para realização de atividades vitais, como a alimentação, coorte, cópula, oviposição, e desenvolvimento larval (RAMPASSO, 2019). Entre os gêneros presentes na família Drosophilidae, *Drosophila* é um dos modelos mais utilizados nas Ciências Biológicas, sendo a espécie *Drosophila melanogaster* a mais estudada. As pesquisas com essa espécie são amplamente aplicadas, desde relacionadas a questões ambientais, quanto ao estudo de doenças humanas (O'GRADY; DESALLE, 2018).

No gênero *Drosophila*, há uma grande variação entre as espécies quanto à capacidade de exploração de recursos, desde aquelas generalistas até outras especialistas. Devido à sua proximidade ao homem, muitas espécies generalistas desse gênero se dispersaram pelo mundo, ditas como espécies cosmopolitas. Outras, as quais possuem capacidade limitada de dispersão e/ou são especialistas com restrições quanto aos recursos que podem utilizar para sobrevivência na natureza, são categorizadas como espécies endêmicas (TIDON-SKLORZ; SENE, 1999).

Em geral, as espécies generalistas apresentam maiores níveis de tolerância a estresse e utilizam uma variedade maior de recursos, conseguindo facilmente substituir um recurso escasso por outro, sendo menos afetadas por fatores ambientais. Por outro lado, espécies especialistas apresentam tolerâncias ambientais mais específicas e limitadas pela distribuição de seus recursos, sendo, portanto, diretamente afetadas em processos de fragmentação de habitats, o que pode resultar em populações menores e isoladas, e até mesmo na extinção de populações locais (KOLASA; LI, 2003; NOSSIL, 2012; CARVALHO, 2019).

As moscas do gênero *Drosophila* são conhecidas como fitosaprófagas (THROCKMORTON, 1975), pois elas utilizam, para oviposição e desenvolvimento larval, principalmente tecidos vegetais em processos iniciais de decomposição (MARKOW; O'GRADY, 2008; SOTO et al., 2010). Os substratos utilizados pelas espécies podem ser: frutos (ATKINSON; SHORROCKS, 1997), flores (BRNCIC, 1983), cladódios (HEED, 1978), além de outros tecidos vegetais (CARSON, 1971). Porém, fungos carnosos (JAENIKE et al., 1983) e guano de morcego (TOSI et al., 1990) também

podem ser utilizados. Substâncias simioquímicas são liberadas durante o processo de decomposição, assim, atraem os drosofilídeos para o local; posteriormente as larvas e os adultos alimentam-se dos microrganismos, principalmente leveduras, associados ao processo de decomposição (VACEK et al. 1985; JAENIKE, 1983; BARKER et al. 1994; CARSON, 1971; SEVENSTER; VAN ALPHEN, 1996; VILELA, 2001; MARKOW; O'GRADY, 2008; SOTO et al., 2010). As leveduras são consideradas uma importante fonte de alimento para a maioria das espécies de *Drosophila* (BEGON, 1982; BECHER et al., 2012).

Segundo Starmer et al (1986), algumas espécies de *Drosophila* exibem uma relação específica com determinadas espécies ou grupos de leveduras, e a importância desses microrganismos não é somente de cunho nutritivo, já que as leveduras auxiliam na preparação do substrato, metabolizando nutrientes e possíveis substâncias de defesa dos tecidos vegetais, tornando o substrato adequado para o desenvolvimento larval. Por outro lado, os drosofilídeos realizam a dispersão das leveduras para outros ambientes (GILBERT, 1980) em um processo mutualístico (STARMER; FOGLEMAN, 1986).

O gênero *Drosophila* está atualmente dividido em dez subgêneros (BAHDER et al., 2016; POWELL, 1997). Destes, *Drosophila* e *Sophophora* são os que apresentam maior diversidade de espécies. O subgênero *Drosophila* é o mais numeroso em espécies, com cerca de 720 espécies descritas, subdivididas em 43 grupos (BÄCHLI, 2021), e é o maior representante da família Drosophilidae na região Neotropical (VAL et al., 1981). O subgênero *Sophophora*, foi inicialmente descrito por Sturtevant em 1939, compreende aproximadamente 335 espécies, distribuídas em nove grupos (BÄCHLI, 2021). Estima-se que a divergência desses subgrupos tenha ocorrido entre 40 (RUSSO; TAKEZAKI; NEI, 1995) e 63 (TAMURA et al., 2004) milhões de anos atrás.

Um dos maiores grupos neotropicais dentro do subgênero *Drosophila* é o grupo *repleta*, que atualmente é constituído por 119 espécies descritas, divididas em cinco subgrupos: *repleta*, *mercatorum*, *hydei*, *mulleri* e *fasciola* (BÄCHLI, 2021). Esse grupo apresenta um diferencial com relação aos demais grupos de drosofilídeos: metade das espécies é cactófila, isto é, as larvas utilizam cladódios de cactos em decomposição durante o seu desenvolvimento. Porém, somente os adultos destas espécies cactófilas são generalistas. A outra metade do grupo possui larvas e adultos generalistas (STARMER; GILBERT 1982; PEREIRA et al. 1983; STARMER et al. 1986; MORAIS et al. 1994; MACHADO et al. 2017).

Drosophila mercatorum (PATTERSON; WHEELER, 1942) é uma espécie não cactófila do grupo *repleta*. Ela está dividida em duas subespécies, *D. mercatorum mercatorum* (PATTERSON;

WHEELER, 1942; WHARTON, 1944) e *D. mercatorum pararepleta* (DOBZHANSKY; PAVAN 1943; WHARTON 1944). A primeira está associada aos humanos e é cosmopolita, e a segunda tem distribuição Neotropical (PATTERSON; WHEELER, 1942). Nesta região, *D. mercatorum pararepleta* é frequentemente coletada em ambientes naturais de vegetação aberta, com a presença ou não de cactáceas, ocorrendo a leste da Cordilheira dos Andes em áreas como chaco, pantanal, cerrado, e também em vegetação fechada e, geralmente, não é encontrada associada ao homem (SENE et al., 1981; VILELA, 1983). Segundo Pereira et al. (1983), *D. mercatorum pararepleta* é uma espécie generalista e altamente competitiva por recursos alimentares, sendo também considerada uma das mais abundantes espécies de drosófilídeos neotropicais em áreas de vegetação aberta na América do Sul (VILELA et al., 1983; TIDON, 2006).

Fatores bióticos e abióticos podem influenciar na qualidade das condições ambientais. Entre esses fatores, a temperatura e a nutrição são os principais influenciados (CROSS et al., 2015; ROSENBLATT; SCHMITZ, 2016), podendo o estresse causado por alterações nesses parâmetros ser capaz de induzir mudanças comportamentais e fisiológicas nos indivíduos em que ali habitam (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; COSTA et al., 2019). Segundo SOTO et al. (2010), a variação ambiental, causada pela utilização de diferentes microhabitats, pode apresentar novos desafios para espécies de *Drosophila*, pois é necessário ocorrer um ajuste do organismo e do seu desenvolvimento a cada novo ambiente, que possui características diferentes das quais eles estavam habituados. Dessa maneira, a interação do genótipo do indivíduo com o ambiente pode produzir respostas distintas (ORMEROD et al., 2017). Diferentes dietas podem influenciar diretamente na expressão de fenótipos quantitativos, tais como características da fisiologia, da morfologia, do desenvolvimento e comportamento de animais, resultantes de intrincadas redes de genes. No caso de *Drosophila*, as maiores diferenças comportamentais e fisiológicas resultantes da dieta ocorrem durante os estágios larvais, mas com efeitos que persistem na idade adulta (ORMEROD et al., 2017).

Os ambientes naturais podem ser suscetíveis a variações sazonais na disponibilidade de recursos, sendo que os substratos utilizados por espécies de *Drosophila* podem variar amplamente. Tendo em vista que os drosófilídeos utilizam diferentes substratos para desenvolvimento larval e alimentação (POWELL, 1997; MARKOW; O'GRADY, 2007), a variação na utilização desses substratos sugere que o controle das vias metabólicas nas diferentes espécies provavelmente deva ter sofrido alterações ao longo da história evolutiva. Por exemplo, diferenças nos conteúdos de nitrogênio e fósforo no organismo de espécies ecologicamente diferentes de *Drosophila* indica que elas apresentam adaptações metabólicas de acordo com a composição nutricional de seus hospedeiros (MARKOW et al., 1999; JAENIKE; MARKOW, 2003). Nas últimas décadas, diversas pesquisas

sugerem que o equilíbrio entre os macronutrientes é o determinante dietético mais importante do desempenho e do valor adaptativo em diversos organismos (SIMPSON; RAUBENHEIMER, 2012). O metabolismo de três classes principais de macronutrientes captados nas dietas, proteínas, carboidratos e lipídios, é um processo altamente conservado e tem sido apontado como sendo o principal para a obtenção de energia e biomassa para sobrevivência e reprodução (GILLETTE et al., 2020).

Vários estudos têm sido feitos utilizando a espécie *Drosophila melanogaster*, para investigar os efeitos prejudiciais causados pela ingestão de dietas ricas em gorduras. Esses trabalhos têm demonstrado que a ingestão desse tipo de alimentação pode resultar em aumento dos níveis de triglicerídeos e glicose, diminuição da tolerância ao estresse, encurtamento do tempo de vida, além de problemas como o acúmulo de gordura e disfunção cardíaca (BIRSE et al., 2010; HEINRICHSEN; HADDAD, 2012). Assim, o modelo *D. melanogaster* tem se mostrado eficaz no estudo de doenças humanas causadas por ingestão de dietas hipercalóricas, como a obesidade, problemas coronários e diabetes, já que estas possuem sistemas de órgãos análogos e que se assemelham aos encontrados em seres humanos (CANAVOSO et al., 2001; FONTAINE et al., 2003; VAN GAAL et al., 2006; OGDEN et al., 2007; CHINTAPALLI et al., 2007; WOLF; ROCKMAN, 2008; DIANGELO; BIRNBAUM, 2009; BODEN; SALEHI, 2013).

Naturalmente, os indivíduos de uma determinada espécie podem enfrentar diversos períodos de estresse por restrição nutricional, e, apesar de utilizarem recursos alimentares pouco nutritivos, eles continuam se desenvolvendo, crescendo e reproduzindo. Assim, é provável que a capacidade de lidar com o estresse nutricional esteja moldada pela seleção de caracteres adaptativos pré-existentes, ou podem, até certo ponto, ajustar sua fisiologia e mudar hábitos alimentares por meio da plasticidade fenotípica (HOFFMANN; PARSONS, 1991; DEARING et al. 2005; KOLSS et al., 2009).

Considerando que as moscas são insetos holometábolos, ou seja, animais que durante o seu desenvolvimento apresentam metamorfose completa, o acúmulo de nutrientes é essencial para a sobrevivência em fases de inanição e metamorfose e, consequentemente, para a manutenção da vida dessas espécies (KEELEY, 1985). Dessa maneira, a ingestão de alimentos com diminuição ou excesso de nutrientes pode afetar a viabilidade do organismo (LAGIOU et al., 2007). As moscas são rotineiramente confrontadas com a decisão metabólica de armazenar ou mobilizar reservas de energia em face à disponibilidade nutricional variável, e também armazenam energia na forma de triglicerídeos e glicogênio, que são mobilizados em momentos de necessidade (TELEMAN; RATZENBÖCK; OLDHAM, 2012)

Apesar dos drosófilídeos se mostrarem ótimos modelos biológicos para o estudo dos efeitos das dietas sobre o seu metabolismo (BHARUCHA, 2009), poucos trabalhos têm sido realizados a respeito da capacidade de utilização de diferentes dietas com espécies neotropicais, como por exemplo *Drosophila mercatorum pararepleta*, espécie generalista pertencente ao grupo *repleta*. Tendo em vista que essa espécie pode ser coletada em diversos tipos de ambientes e biomas, desde fragmentos de mata até áreas abertas, com ou sem a presença de cactáceas, ela se torna um modelo adequado para o estudo do impacto da ocorrência em ambientes tão díspares sobre a sua capacidade de utilização de diferentes recursos alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes dietas sobre caracteres de história de vida (bionômicos) e conteúdos de metabólitos energéticos na espécie Neotropical *Drosophila mercatorum pararepleta* (designada daqui para frente apenas como *Drosophila mercatorum*). Assim, investigando as bases ecológicas e genéticas da variabilidade na utilização diferencial de recursos alimentares por essa espécie, relacionando os resultados obtidos com a sua biologia e com o processo adaptativo desta espécie para ocorrer em diferentes tipos de ambientes.

2.2 Objetivos Específicos

- Fazer uma análise comparativa de *D. mercatorum* com três espécies neotropicais de *Drosophila*, *D. willistoni*, *D. maculifrons* e *D. ornatifrons*, com relação ao padrão de variação populacional e interespecífico quanto a caracteres de história de vida (viabilidade, tempo de desenvolvimento e peso seco) e metabólicos (conteúdos de triglicerídeos, glicogênio e proteínas totais) (Capítulo 1);
- Examinar os efeitos de três dietas contendo concentrações diferentes de proteína e carboidratos (HPS: maior proporção proteína:açúcar; EPS: proporção intermediária proteína:açúcar, e; LPS: menor proporção proteína:açúcar) sobre os mesmos caracteres de história de vida e metabólicos em *Drosophila mercatorum* (Capítulo 2);

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo e linhagens

O estudo foi realizado utilizando linhagens já estabelecidas a partir de trabalhos anteriores (Dissertações de Mestrado de Camila H. dos Santos e Maria Carolina Ferreira). Essas linhagens são provenientes de coletas em quatro localidades de ocorrência de populações naturais da espécie *Drosophila mercatorum*. As coletas foram realizadas em fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual pertencentes ao bioma Mata Atlântica. Duas localidades são no estado de São Paulo, uma em Cajuru (CAJ – 21°21'35,45" S, 47°17'32,89" O) e outra em Serrana (SER – 21°15'15,23" S, 47°34'34,95" O), e duas são no estado do Rio Grande do Sul, uma em Porto Alegre (POA – 30°04'9,94" S, 51°07'36,34" O) e outra em Santiago (SAN – 20°23'00,54" S, 54°44'41,58" O). Somente os fragmentos SER e SAN apresentam vegetação xerofítica em seu interior, caracterizada principalmente pela presença do cacto *Cereus hildmannianus*. Todas as linhagens são mantidas em sala climatizada a uma temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no Laboratório de Genética e Evolução – LaGEv, localizado no Campus CEDETEG da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO.

3.2 Desenho experimental

As quatro linhagens, originadas de populações naturais da espécie *Drosophila mercatorum*, foram submetidas a experimentos para averiguação dos efeitos de diferentes dietas sobre caracteres de história de vida e metabólicos. Para isso, foram preparadas quatro diferentes dietas: a dieta padrão de banana-ágar, utilizada para a manutenção de todas as espécies no LaGEv, e outras três dietas com composição variável com relação à proporção proteínas:açúcares, como descrito por Matzkin et al. (2011): HPS – maior proporção proteínas:açúcares; EPS – proporção intermediária proteínas:açúcares; e LPS – menor proporção proteínas:açúcares.

Os caracteres de história de vida analisados foram a viabilidade (larva-pupa e larva-adulto), o tempo de desenvolvimento (larva-pupa e larva-adulto), o peso seco e os conteúdos metabólicos de triglicerídeos, glicogênio e proteínas totais dos adultos recém emergidos.

Os resultados dessas análises foram descritos nos capítulos que a seguir.

4 RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1

Capítulo elaborado nas normas e submetido à revista *Zoological Studies*

<http://zoolstud.sinica.edu.tw>

Life history traits and metabolic pool variation in Neotropical *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae)

Karoline Aparecida Vieira dos Santos¹, Camila Heloise dos Santos¹, Luciana Paes de Barros Machado¹, and Rogério Pincela Mateus^{1,*}

¹UNICENTRO, CEDETEG, Universidade Estadual do Centro-Oeste, LaGEv, Laboratório de Genética e Evolução do Departamento de Ciências Biológicas, Élio Antonio Dalla Vecchia Alley, 838, Vila Carli, Guarapuava-PR 85040-167, Brazil. E-mail: chscamilasantos@yahoo.com, karolineapvieira@gmail.com, lpbmachado@gmail.com, rogeriopmateus@gmail.com

(Submitted 17, 12, 2020)

Karoline Aparecida Vieira dos Santos, Camila Heloise dos Santos, Luciana Paes de Barros Machado, and Rogério Pincela Mateus (2020) The differential exploitation of natural resources by *Drosophila* species has effects on fitness, with changes in life history and metabolic traits. The variation of these characters in different environments is lacking considerable research on Neotropical species of *Drosophila*. The purpose of this study was to evaluate the profile of life history traits, viability (VI), development time (DT) and dry weight (DW), as well as the metabolic pools of triglyceride (TG), glycogen (GL) and protein (PR), in populations from the South and Southeastern regions of Brazil of four Neotropical *Drosophila* species: *D. willistoni*, from subgenus *Sophophora*, and *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, belonging to the subgenus *Drosophila*. For life history traits, with the exception of VI for *D. willistoni*, *D. mercatorum* and *D. maculifrons*, and DT for *D. willistoni*, populational variation was detected for all the other analyzed parameters, and the data from metabolic pools examination did not have significant results only for TG in the *D. willistoni* and *D. maculifrons* populations. In the cases with significant differences between populations, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* presented the same profile of variation for all the analyzed characteristics, of which the Southern sort showed the highest values of DT and DW, and the lowest of GL and PR. The same populational profile for *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* was found in *D. mercatorum*, excluding GL and PR, which had an inverse pattern to the first two species, and equal to *D. willistoni*, with the same highest indexes in Southern populations. The interspecific analysis of the studied traits revealed similarities of VI, DT and TG between *D. willistoni* and *D. mercatorum* (highest levels of VI and lowest of DT and TG) and between *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*; for GL results, similar parameters were observed among *D. willistoni*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* (highest values); and for PR, *D. willistoni* and *D. ornatifrons* stored more than *D.*

mercatorum and *D. maculifrons*. DW was the only parameter analyzed that showed to be significantly different among all species. The populational variation indicates the plasticity of the examined traits, which allows for distinctive response to different environmental conditions. These findings also point out that, although the species belonging to the same subgenus, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, exhibit similar populational patterns to most of the studied traits, the interspecific comparison did not reflect the phylogenetic relationships, specially considering the metabolic pools. Thusly, these results suggest that the higher VI (and lower DT) of *D. willistoni* and *D. mercatorum* directly correlate to the ability of these species to explore a broader variety of environments, whilst the capability of storage in the metabolic pools would be species specific, determined by adaptive history to quality and availability of resources, with *D. mercatorum* and *D. ornatifrons* in the opposite sides regarding the capacity to store metabolites from their diets.

Key words: *Drosophila willistoni*, *Drosophila mercatorum*, *Drosophila maculifrons*, *Drosophila ornatifrons*, Bionomic traits, Energy storage molecules.

Correspondence: Tel: +55 42 3629-8179. Fax: +55 42 3629-8145. Email: rogeriopmateus@gmail.com

4.1.1 BACKGROUND

Life history traits, such as viability, development time and weight, besides the concentration of metabolites in an organism, are all quantitative characteristics resulting from the interaction between the genotype and the environment, being influenced by the countless environmental variables, as well as internal factors, like stress levels, the immunological system activity, the composition of the intestinal microbiome, the quality and caloric content of the diet, among others (Rose 1983; Hoffmann and Parsons 1989; Partridge and Sibly 1991; Rose and Bradley 1998; Matzkin et al. 2009; Jumbo-Lucioni et al. 2010; Matzkin et al. 2011; Jehrke et al. 2018; Flatt 2020). The result of the conjunct action of all these parameters determines the fitness of individuals, thus researches about these relationships are essential to the understanding of the adaptive process and the evolution of life history traits of an organism.

The development time in *Drosophila* is a plastic characteristic subject to selective pressures, for example intra and interspecific competition. Species with a longer development time are more susceptible to competition, while species with shorter development present greater competitive ability, since, in nature, the larvae explore scarce resources that rapidly deplete (Bakker 1969; Zwaan et al. 1995; Nunney 1996; Chippindale et al. 1997; Prasad et al. 2000; Wertheim et al. 2000; Krijger et al. 2001; Ghosh et al. 2019; Shrader et al. 2020). It has already been reported that a longer larval period has deleterious consequences in other life history traits, suchlike the reduction of body size, fecundation rates and mating success (Tantawy and Vetukhiv 1960; Bakker 1962; Tantawy 1961; Bakker 1969; Partridge and Farquhar 1983; Atkinson 1985; Zwaan et al. 1991; Nunney 1996; Joshi et al. 1998).

A heavier corporeal weight results in an increment of fitness, bigger flies show to be more resistant to starvation, since they store more energetic metabolites, besides being able to heighten

their fecundity and longevity in females, and the mating success in males (Zwaan et al. 1991; Hillesheim and Stearns 1992; Pitnick and García-González 2002). Body weight and energetic metabolic reserves can be affected by temperature, because food ingestion and metabolic rates vary equally with temperature (Klepsatet et al. 2016; Klepsatet et al. 2019).

Drosophila melanogaster is a biological model frequently utilized in the study of the evolution of life history traits and physiological mechanisms and pathologies associated with feeding (Merritt et al. 2006; Reed et al. 2010; Matzkin et al. 2011; Na et al. 2013; Jehrke et al. 2018; Flatt 2020). However, there is less available information about the intra and interspecific variation of these characteristics, especially in *Drosophila* species in natural areas of the Neotropical region, where the process of adaptive divergence can be accentuated by the variety of resources and accessible habitats. The resources used for nourishment and breeding sites for the Neotropical *Drosophila* species are varied, ranging from cacti, fruits, flowers, fungi, dung and even carrion (Powell 1997; Gottschalk et al. 2009; Goñi et al. 2012; da Mata et al. 2015; Valadão et al. 2019). The diversity of types of habitats and their associated resources result in different adaptive responses of metabolism and life history traits from the Neotropical species of *Drosophila*.

Matzkin et al. (2009) studied the variation in metabolism of 12 *Drosophila* species ecologically divergent that had their genomes sequenced. Nine of these species belonged to the subgenus *Sophophora*, and three to the subgenus *Drosophila*, two of which being cactophilic. Given this, there is a gap for non-cactophilic Neotropical models of the *Drosophila* subgenus, and to the interpopulational variation of these characteristics in populations from different types of habitats for both subgenera of this region. One of the conclusions from the work of Matzkin et al. (2009) indicates that, albeit the control of the analyzed metabolites can be similar among species, it appears to be evolutionarily plastic, being able to reflect the response to nutritional necessities of populations. With the aim to aid the elucidation of this matter and increase sampling for species in other regions, this study analyzed metabolism variation, as well life history traits in four non-cactophilic *Drosophila* species native to South America, recently collected in different natural areas of the Atlantic Forest in the South and Southeast of Brazil.

One species from the subgenus *Sophophora*, *D. willistoni* (*willistoni* group), and three from the subgenus *Drosophila*, *D. mercatorum* (*repleta* group), *D. maculifrons* (*guaramunu* group) and *D. ornatifrons* (*guarani* group) were analyzed for this project. The *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* species are phylogenetically closest in relation to *D. mercatorum*. These species were usually located in the same group, *guarani*, until more recently Robe et al. (2010), based on cytogenetic and molecular data (Kastritsis 1969; Kastritsis et al. 1970; Yotoko et al. 2003; Robe et al. 2005), proposed the subdivision of the *guarani* group into two species groups, *guarani* (of *D. ornatifrons*) and *guaramunu* (of *D. maculifrons*). Among the species for the subgenus *Drosophila* examined by Matzkin et al. (2009), none is native to South America, whilst for the species in the *Sophophora* subgenus, only *D. willistoni* is native to South America. Thus, *D. willistoni* was also analyzed in this study as an intraspecific comparison parameter with at least one of the species examined by Matzkin et al. (2009).

The four species are distributed in the Neotropical, and in Brazil are found in different biomes and phytobiognomies of the Atlantic Forest. *Drosophila mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* are more closely associated with natural areas of the Neotropical region, the former being found in a broader diversity of environments (open areas and forests, frequently with xerophytic vegetation), and the last two in forests. *Drosophila willistoni* has wide distribution,

much like *D. mercatorum*, and is the only analyzed species that can be collected in high frequency in anthropized environments. The selected species for this study belong to groups of the most generalist Neotropical species and with high ecological versatility for breeding sites (Val et al. 1981; Pereira et al. 1983; Medeiros and Klaczko 2004; Mateus et al. 2006; Gottschalk et al. 2007; Döge et al. 2008; Hochmüller et al. 2010; Cavasini et al. 2014; Coutinho-Silva et al. 2017; Mendes et al. 2017; Mateus et al. 2018; Valadão et al. 2019; TaxoDros 2020). The applied approach allows inference about what are the factors of adaption and historical evolution that determine the scope of resource use and occupation of habitats of a species.

Considering the variety of resources, types of available habitats and climate conditions from the different regions of the Brazilian Atlantic Forest, the main issue this study concerned to evaluating intra and interspecific differences in classical life history traits (viability, development time, dry weight) and metabolic response (triglyceride, glycogen and protein contents) in Neotropical species of *Drosophila*. All of the analyzed characteristics demonstrated different populational adaptive responses in at least one species. The species from *Drosophila* subgenus and associated with natural environments, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, showed similar populational pattern to most of the studied traits, while the interspecific comparison did not reflect the same relationship, *D. willistoni* and *D. mercatorum* are similar regarding life history traits, and *D. willistoni* presented metabolite storage values similar to *D. ornatifrons* and *D. maculifrons*. The possible role of the collection environment in the adaptive response of the examined characteristics and the capability of resource exploration from the species are discussed.

4.1.2 MATERIALS AND METHODS

4.1.2.1 Collection areas

Drosophilids were sampled in five areas of the Atlantic Forest in the South and Southeast regions of Brazil, with distinctive climatic and phytophysiognomies characteristics. The collections occurred in two sites of the Southeast, Serrana and Cajuru, in the state of São Paulo, and in three Southern sites, Guarapuava, in the state of Paraná, and Santiago and Porto Alegre in the state of Rio Grande do Sul. Distance between the closest populations from the Southeastern and Southern regions (Serrana-SP and Guarapuava-PR) is approximately 600 Km, in a straight line, and this areas are divided by the Tropic of Capricorn, which determine, besides different vegetation landscape, also distinct climate conditions: Southeastern populations are in the Tropical zone and South populations in the Subtropical zone:

1) Serrana-SP (SER), fragment of the Seasonal Semideciduous Forest with xerophytic vegetation; average temperature (T°) = 22.7° C (minimum – MIN - = 15.6° C; maximum – MAX - = 30.4° C); average relative humidity (RH) = 67%. Summer is warm and humid and winter is characterized by long periods without precipitation. Altitude 830 m;

2) Fazenda Santa Cecília, Cajuru-SP (CAJ), 32 Km away in a straight line from SER, fragment of the Seasonal Semideciduous with no association to xerophytic vegetation; data for T° , RH, seasonality and altitude traits are the same described for SER;

3) Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR (PMA), fragment of the Mixed Ombrophilous Forest (Araucaria Forest), with no association to xerophytic vegetation; $T^o = 17.6^o C$ (MIN = $13.4^o C$; MAX = $24.1^o C$); RH = 82.2%. Mild temperatures characterize summer and frequent and severe frosts in autumn and winter. Altitude: 1,000 m;

4) Santiago-RS (SAN), fragment of the Seasonal Semideciduous Forest with xerophytic vegetation, inside Pampa biome; $T^o = 18.9^o C$ (MIN = $14.4^o C$; MAX = $24.9^o C$); RH = 74.8%. Humid Subtropical climate, without a defined dry season. Altitude: 135 m;

5) Morro Santana, *Campus* of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS (POA), 380 Km away in a straight line from SAN, fragment of the Seasonal Semideciduous with no association to xerophytic vegetation, inside Pampa Biome; $T^o = 20.1^o C$ (MIN = $16.1^o C$; MAX = $25.8^o C$); UR = 77.1%. Humid subtropical climate, without a defined dry season. Altitude: 115 m.

The data for temperature and relative humidity refers to the average taken in the period between January of 2009 and December 2018 (Instituto Nacional de Meteorologia 2019).

For the development of this study, isofemale lines (referred to populations throughout this paper) of all collection areas were utilized for *D. mercatorum*, except PMA, for *D. willistoni* from CAJ, PMA, and POA were studied, and for *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* CAJ and PMA. The collections were realized between February and April 2018 and the experiments were initiated in the same year, as soon as isofemale lines were established in laboratory conditions, around three generation.

4.1.2.2 Experimental design

Between 50 and 80 female and male sexually mature virgins of each population were put in embryonic chambers containing a Petri dish with agar 0.5% and enriched with *Saccharomyces cerevisiae* and sucrose for inducing the larvae hatching. Daily, dishes with agar were replaced and the removed dishes that contained eggs were stored. After 48h (*D. willistoni* and *D. mercatorum*), and 144h (*D. maculifrons* and *D. ornatifrons*) of mating, 2^o instar F1 larvae were transferred to vials with standard banana diet. Ten replicas for each population of the four species were obtained, each containing 40 (*D. willistoni* and *D. mercatorum*) and 30 (*D. maculifrons* and *D. ornatifrons*) larvae. The experiments and the maintaining of the isofemale lines of *D. willistoni* and *D. mercatorum* occurred at $25^o C \pm 1^o C$, and at $20^o C \pm 1^o C$ for *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, all in natural photoperiod.

Amongst captured drosophilids with fruit baits, the *Drosophila* groups of the analyzed species in this study demonstrate broader amplitude of resource use (Valadão et al. 2019). Therefore, the standard banana diet utilized in the experiments should not be a stressful factor for larval development, and that the differences in the examined traits would reflect the adaption to the collection environment, rather than a response to a resource much different than those found in nature.

4.1.2.3 Analysis of life history traits

From larvae to emerged adults, viability (VI) and development time (DT) were estimated for each of the four populations of the four species. VI was expressed as the proportion of larvae that survived until adult stage, and DT was measured as the average period elapsed (in hours) between the transference of 2° instar larvae to the culture medium and the appearance of adults (males and females). The observations were realized every four hours after the emergence of the first adults. All the emerged adults were separated by sex and stored at negative 20° C for posterior analysis of the metabolic pools.

Dry weight (DW) was determined in 10 groups of incubated flies at 50° C oven for three days for each population and sex of the four species, each one containing five flies for *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, and 15 flies for *D. willistoni*. After dried, samples were weighted in Shimadzu microbalance, AY 220 model.

4.1.2.4 Analysis of metabolic pools

The metabolic pool analyses of the dried groups of flies previously mentioned were realized following Matzkin et al. (2009). Each group of flies was homogenized in 1 mL of phosphate buffer (25 mM KHPO₄, pH 7.4) and centrifuged for 2 minutes at 12,000 rpm in order to remove particles that could interfere with the colorimetric tests. A total of 800 µL of the supernatant from the homogenized was collected and stored at negative 20° C for later analysis of the metabolic pools.

The colorimetric examinations were performed for the quantification of glycogen (GL), triglyceride (TG) and total soluble proteins (PR) contents. GL levels were measure using Glucose Oxidase and Peroxidase enzyme kit (Sigma-Aldrich P7119), adding 0.1 units of Amyloglycosidase (Sigma-Aldrich) per mL of reaction buffer. The samples (40 µL of the homogenized + 200 µL of the reaction buffer) were incubated at 37° C for three hours, and the absorbance measured at 445 nm. TG content was determined using the Triglycerides kit (Gold Analisa REF. 459, MS 80022230062). The samples (40 µL of the homogenized + 200 µL of reagent kit) were incubated at 37° C for 30 minutes, and the absorbance measured at 500 nm. Only the triglyceride analysis was realized, and not the total lipids (which include cuticular lipids), due to the fact that the objective of this study was evaluating the components involved in storing energy. The PR concentration was determined by using the Bicinchoninic Acid assay, following the instructions of the manufacturer (Sigma B9643), and the absorbance for quantifying the proteins was measured at 562 nm. These measurements were made in the Spectramax 190 spectrophotometer from Molecular Devices. Each metabolic grouping was calculated by the average of triplicates and normalized per DW before the statistical analyses.

4.1.2.5 Statistical analyses

The data for VI, DT and the metabolic pools were examined by the multifactorial analysis of variance (ANOVA) method, utilizing population and sex as factors. The comparison between the species was carried out using nested ANOVA of populations within the species. Pairing comparisons between fixed factors were done applying Tukey *post-hoc* analysis. All data were transformed before analysis: VI – root square arc sine; DT e DW – root square; and metabolic pools

(TG, GL e PR) – arc sine. All statistical examinations were performed in the Statistica 7 (StatSoft, Inc.) software, using $\alpha = 0.05$ (Sokal and Rohlf 1995).

4.1.3 RESULTS

4.1.3.1 Viability (VI)

No significant differences were found in VI among the *D. willistoni* ($F = 0.70$, $p = 0.50$), *D. mercatorum* ($F = 2.824$, $p = 0.0523$) and *D. maculifrons* ($F = 0.50$, $p = 0.48$) populations. For *D. ornatifrons*, VI from PMA was significantly smaller than CAJ ($F = 147.00$, $p \leq 0.001$). The interspecific comparison revealed significantly higher viability of *D. willistoni* and *D. mercatorum* when compared to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, and no significant differences in viability were found between *D. willistoni* and *D. mercatorum*, and between *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. There were also significant divergences between nested populations within species (Figure 1, Table 1).

4.1.3.2 Development time (DT)

There was no significant difference in development time between males and females within almost all the populations from the four studied species ($F = 1.8$, $p = 0.23$; $F = 1.584$, $p = 0.21$; $F = 1.44$, $p = 0.23$; $F = 1.52$, $p = 0.22$, for *D. willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, respectively) and the interaction between population and sex ($F = 1.19$, $p = 0.30$; $F = 0.10$, $p = 0.93$; $F = 0.12$, $p = 0.72$; $F = 0.22$, $p = 0.64$, for *D. willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, respectively). The only exception was the lack of significance in DT between the sexes for the PMA population of *D. willistoni*, in which the females presented faster DT than the males ($Q = 5.454$, $p = 0.002$).

Only *D. willistoni* populations did not present significant differences in DT ($F = 1.33$, $p = 0.26$). For *D. mercatorum*, there was significant variance between all four analyzed populations ($F = 1,641$, $p = 0$), POA with the longest DT, followed by SAN, and SER with the shortest DT ($p < 0.001$ for all pairing comparisons). In *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, PMA showed to have significantly higher DT than CAJ ($F = 292.15$, $p \leq 0.001$; $F = 451.53$, $p \leq 0.001$, respectively) (Figure 2).

The comparative analysis revealed that DT is different among all species, as well as the populations nested within species, and between the sexes, and the interaction between sex and nested populations. The pairing comparison revealed that *D. willistoni* has significantly faster development time, followed by *D. mercatorum*, and similarities of DT only between *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* (Figure 2, Table 2).

4.1.3.3 Dry weight (DW) of adults

Dry weight (DW), in this research, represents the size comparison between species, meaning the flies with the heaviest weight corresponding to the largest ones. For all species, in at least one population, the females were largest than males: in three analyzed populations of *D. willistoni* ($F = 62.76$, $p = 0$), SER (Tukey $p < 0.001$) and CAJ (Tukey $p = 0.03$) of *D. mercatorum*, and CAJ population, for both *D. maculifrons* (Tukey $p = 0.02$) and *D. ornatifrons* (Tukey $p = 0.01$), and only for *D. mercatorum* there was a significant difference in the interaction population/sex ($F = 6.36$, $p < 0.001$). All species showed a significant difference in DW among populations ($F = 14.58$, $p < 0.001$; $F = 13.64$, $p = 0$; $F = 10.164$, $p = 0.003$; $F = 30.256$, $p < 0.001$, for *D. willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons*, and *D. ornatifrons*, respectively). No significant difference in DW was detected only between CAJ and POA (Tukey $p = 0.08$) for the *D. willistoni* species, and between SER and CAJ (Tukey $p = 0.5$) and SAN and POA (Tukey $p = 0.99$) for *D. mercatorum* (Figure 3).

Every species had significant differences in dry weight, including in sex comparison, and among populations within species, in the pairing comparison between species, and in the interaction of populations nested in the species with sex (Table 3), *D. mercatorum* being the largest species, followed by *D. ornatifrons*, and *D. willistoni* being the smallest (Figure 3).

4.1.3.4 Metabolic pools

- Triglyceride (TG):

Only the males in POA population of *D. mercatorum* presented significantly higher TG contents than females (Tukey $p = 0.04$), and for other populations and species there was no significant TG differences between sexes and in the interaction population/sex. Only *D. mercatorum* ($F = 166.741$, $p = 0$) and *D. ornatifrons* ($F = 17.6531$, $p < 0.001$) species showed significant differences in TG measurements among populations, however there was no significant difference for this metabolite between SER and CAJ populations, along with SAN and POA of *D. mercatorum*. For *D. mercatorum*, the populations in the South of Brazil (SAN and POA) had higher TG results than the populations in the Southeast region (CAJ and SER), the same occurring with *D. ornatifrons*, the southeastern population (CAJ) presenting lower TG when compared to the southern population (PMA) (Figure 4.A).

There was a significant difference of TG content among species, populations nested in the species, and in the interaction of populations nested in the species with sex. The pairing comparison revealed the highest TG measurement in *D. maculifrons*, followed by *D. ornatifrons*, and similarities only between *D. willistoni* and *D. mercatorum* (Figure 4.A, Table 4).

- Glycogen (GL):

Solely in PMA population of *D. maculifrons* females presented significantly higher concentrations of GL than males, in all other populations and species there was no significant difference in this metabolite contents between sexes and in the interaction population/sex. There

was significant difference in GL among the populations of the four species ($F = 35.636$, $p = 0$; $F = 27.6538$, $p = 0$; $F = 18.9932$, $p < 0.001$; $F = 6.3057$, $p = 0.02$, for *D. willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons*, and *D. ornatifrons*, respectively). *Drosophila willistoni* and *D. mercatorum* presented the same populational pattern, with the populations from the South region (POA higher, followed by PMA for *D. willistoni*, and SAN and POA, with no difference between them, for *D. mercatorum*) with GL contents superior to the populations from the Southeast region (CAJ for *D. willistoni*, and CAJ and SER, with no difference between them, for *D. mercatorum*). *Drosophila maculifrons* and *D. ornatifrons* revealed opposite patterns to the other two species, the Southeastern population (CAJ) having higher GL measurements than the Southern population (PMA) (Figure 4.B).

There were significant differences in GL content among species; the pairing comparison revealing that *D. mercatorum* has a significantly inferior concentration of this metabolite in relation to the other species. There was also significance in the comparison of populations nested in the species, between sexes, and in the interactions of populations nested in the species with sex (Figure 4.B, Table 4).

- Total proteins (PR):

Only females of PMA population of *D. ornatifrons* presented PR concentrations superior to males (Tukey $p = 0.03$), while there was no significant differences between the sexes and in the interaction of population/sex in the others populations and species. The species followed the same populational pattern of GL for PR. Higher PR concentration in the Southern populations when compared to the Southeast in *D. willistoni* ($F = 55.0274$, $p = 0$) and *D. mercatorum* ($F = 8.3545$, $p < 0.001$), and higher PR content in the Southeaster population (CAJ) in relation to the South (PMA) for *D. maculifrons* ($F = 11.0034$, $p = 0.002$) and *D. ornatifrons* ($F = 58.7521$, $p = 0$). For *D. willistoni* the decreasing order of PR contents for the analyzed populations was PMA, POA, South region, and CAJ, Southeast region. For *D. mercatorum* this metabolic content was not different between Southern populations, SAN and POA, and between Southeastern populations, CAJ and SER, although the southern populations have PR concentrations significantly higher than the Southeastern ones.

There was a significant difference in PR contents among the species, the pairing comparison revealed *D. ornatifrons* having higher concentrations of this metabolite, followed by *D. willistoni*, whilst *D. mercatorum* and *D. maculifrons* showed similar PT contents. There was also significance in the comparison of populations nested in the species and between sexes (Figure 4.C, Table 4).

4.1.4 DISCUSSION

The *D. willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* species belong to the *willistoni*, *repleta* and *guarani* (currently *guaramunu* – *D. maculifrons* - and *guarani* – *D. ornatifrons*, Robe et al. 2010) groups of *Drosophila* that occurred in at least 30% of fruitful resources sampled for drosophilids species captured by fruit bait (Valadão et al. 2019). The generalist nature of these species, reflected in their ability to explore resources, it is even more pronounced when considering that the majority of them were also found in substrates of different

vegetable tissues, like fungi (*D. willistoni* and *D. maculifrons*, Gottschalk et al. 2009) and even dung and carrion (*D. ornatifrons*, Goñi et al. 2012).

The collections sites of the populations from the Southeast and South region present distinctive Atlantic Forest phytophysiognomies and climate conditions, since Southeast population are in Tropical zone and South population in Subtropical zone. PMA, South region, sympatric area for *D. willistoni*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, in Guarapuava-PR presents Atlantic Forest with a predominance of Araucaria pine (Mixed Ombrophilous Forest), it is an area known for high altitude, rigorous winters, with frequent frost, and high rainfall and relative humidity rates. CAJ, Southeast region, sympatric area for all species, in Cajuru-SP, shows Seasonal Semideciduous Forest phytophysiognomy of Atlantic Forest, and is characterized by higher temperatures most of the year and two annual distinctive seasons: wet and dry. The other sympatric site between *D. willistoni* and *D. mercatorum* species in the Southern region, POA, is an area of Seasonal Semideciduous Forest of the Atlantic Forest within the Pampa Biome, which has intermediate climate conditions to PMA and CAJ (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1992; Backes 1999; Oliveira-Filho et al. 2015; Instituto Nacional de Meteorologia 2019).

The ample geographic distribution of the analyzed species in this paper in different types of habitats in natural areas of the Neotropical can be related to the versatility of food exploitation and breeding resources (Val et al. 1981; Gottschalk et al. 2007, Gottschalk et al. 2008; TaxoDros 2020). However, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* distribution is more restricted than the others two. While *D. willistoni* and *D. mercatorum* are found in abundance in different Brazilian biomes, and *D. willistoni* can also be caught abundantly in anthropized environments, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* occur predominantly in forests, and present abundance influenced by more mild temperatures and high humidity, like the Southern Atlantic Forest and some areas of the Southeast region of Brazil. Thus, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* can be rare or absent in some phytophysiognomies of this forest, such as Semideciduous, Dense Ombrophylous of the coast, in addition to gallery forests of the cerrado and caatinga, mangroves and dunes, in the Pampa biome, in the Amazon and Northeastern Brazil (Dobzhansky and Pavan 1950; Salzano 1955; Martins 1987; Saavedra et al. 1995; Medeiros and Klaczko 2004; Mateus et al. 2006; Tidon 2006; Gottschalk et al. 2007; Schmitz et al. 2007; Chaves and Tidon 2008; Döge et al. 2008; Acurio and Rafael 2009; Bizzo et al. 2010; dos Santos et al. 2010; Hochmüller et al. 2010; Poppe et al. 2012; Cavasini et al. 2014; Gustani et al. 2015; Coutinho-Silva et al. 2017).

Even though the analyzed species share the generalism, characteristics of the habitat, like abiotic factors and food and breeding sources, associated to vegetation type, also influence the success of the amplitude of geographic distribution. Dry weight was the only characteristic with a significant difference between all species, while the broader variation of environmental exploration of *D. willistoni* and *D. mercatorum* in relation to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* was reflected in the significant differences of *D. willistoni* and *D. mercatorum* when compared to the others species considering half of the analyzed traits, viability, development time, and triglyceride. Nonetheless, others parameters were significantly different between *D. willistoni* and *D. mercatorum*, glycogen and protein contents, besides dry weight mentioned above. The only exception to the similarity between *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* occurred for triglyceride and protein contents.

The populational pattern of the analyzed traits was also practically the same between *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, with the exception of viability and triglyceride, which did not present any significant differences between *D. maculifrons* populations. *D. mercatorum* also

presented populational variation similar to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, the exceptions were related to glycogen and protein measurements, higher in the populations of the South region for *D. mercatorum*, and *D. willistoni*, and lower in PMA (South) for *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*.

The populational differences in all the characteristics in *D. mercatorum* and almost all for *D. maculifrons* (except triglyceride) did not cause differential viability within these species, but did for *D. ornatifrons*. In relation to this trait, viability, *D. mercatorum* had similar values to *D. willistoni*, suggesting more stable adaptive pathways for *D. willistoni* and *D. mercatorum* when compared to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. The lower viability for *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* can be a result of more rare and/or non usual preferential/ideal dietary necessity in nature, with nutritional contents specificity distinct of *D. willistoni* and *D. mercatorum*. This fact is particularly more evident for *D. ornatifrons*, which was the only analyzed species with populational variation in viability (lower in the South region, PMA), and, as mentioned before, was also the only analyzed species that have been captured in dung and carrion (Goñi et al. 2012).

According to the highlighted points above, *D. willistoni* showed populational variation only in dry weight (as the others three species), glycogen and protein contents. For dry weight data, the populational pattern of *D. willistoni* was opposed to the species of *Drosophila* subgenus that presented larger flies in the South region, while no geographical pattern was observed in *D. willistoni* (largest flies were observed in CAJ, Southeast, and POA, South, and smallest in PMA, South). The glycogen and protein contents in *D. willistoni*, however, followed the populational pattern of *D. mercatorum* (higher values in the South), and opposite to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* (higher values in the Southeast population).

The different populational responses in areas where the species are sympatric, like pointed above for the variation between *D. willistoni* populations, but also between *D. mercatorum* when compared to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* for glycogen and protein contents, can be explained by the preference in resources to be utilized by them in these sites. Matzkin et al. (2009) argued that the difference in metabolic pools between species of the *Sophophora* and *Drosophila* subgenera would be a result of a tendency of the *Sophophora* subgenus species in consuming decomposing fruits, while species of the *Drosophila* subgenus feed from yeast that developed not only in fruits, but also in other parts of the decomposing plants. However, Neotropical *D. willistoni* was also found in fungi, therefore, the species and the amount of yeast biomass that occurred in these substrates are probably different, and may be related to the variety to the hosts to be exploited, besides to the different populational response of life history traits and metabolic pools discussed ahead (Gottschalk et al. 2009; Anagnostou et al. 2010; Valadão et al. 2019; Koerte et al. 2020).

The development time is a plastic characteristic sensitive to selective pressures like biotic factors, intra and interspecific competition, density and desiccation, and also abiotic, such as temperature and humidity, even being able to present transgenerational effect (Bakker 1962; Bakker 1969; Zwaan et al. 1995; Nunney 1996; Chippindale et al. 1997; Prasad et al. 2000; Valtonen et al. 2012; Ghosh et al. 2019; Shrader et al. 2020). *Drosophila willistoni* and *D. mercatorum* showed faster development time than *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. This shorter larvae development allows for greater ability in response to desiccation and starvation, since the larvae explore relatively small fragments of resources that rapidly deploy, specially when densities are high, a decrease in time for emergency of images would bring advantages to individuals that passed faster through this unfavorable condition (Joshi and Mueller 1988; Joshi and Mueller 1996; Chippindale et al. 1998; Hoffmann and Harshman 1999; Krieger et al. 2001; Wertheim et al. 2000). A greater

competitive ability, due to the reduction in development time, would also favors the amplitude of habitats occupied by *D. willistoni* and *D. mercatorum*, although it may have reduced body size in PMA population of *D. willistoni*.

Nevertheless, besides shorter development time favors species in competition, adaptation to cold should lead the opposite trait. Longer development time in low temperatures could be advantageous because allows more time for increasing body size and for accumulation of energy reserve molecules, which enables individuals to survive to starvation periods and, for some *Drosophila* species, to pass through diapause during winter. In addition, the increase of body size propitiated to longer development time, frequently results in higher fecundity and longevity in females, and more successful mating for males (Tantawy and Vetukhiv 1960; Tantawy 1961; Zwaan et al. 1991; Hillesheim and Stearns 1992; Ohtsu et al. 1992; Partridge and Fowler 1993; Chippindale et al. 1996; Betran et al. 1998; Ohtsu et al. 1998; Harshman et al. 1999; Prasad et al. 2000; Michaud and Denlinger 2007; Angilletta 2009; Nelson e Cox 2014; Zonato et al. 2017; Kauranen et al. 2019; Flatt 2020). In this way, lower temperatures, such as from the Southern region, must be the reason for the longer development time in POA and SAN for *D. mercatorum*, and in PMA for *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, with significant consequences in increase body size in these three species, and more contents of all metabolic for *D. mercatorum* and of triglyceride for *D. ornatifrons* in these populations. However, *D. ornatifrons* adaptation to cold produced a trade-off with viability in PMA.

Glycogen is the primary energetic source of carbohydrates in animal cells, and excess of this metabolite could rapid be converted into triglyceride. In insects, this metabolite has an important role in metamorphosis and in desiccation, since it not only represents an energy source of quick availability, as it is a reserve of metabolic water, stored in its bonds (Graves et al. 1992; Djawdan et al. 1998; Roach et al. 2012; Gáliková et al. 2015; Fernández-Elías et al. 2015; Matsuda et al. 2015; Yamada et al. 2018, Yamada et al. 2019). *Drosophila maculifrons* and *D. ornatifrons* showed higher concentration not only of glycogen, as also protein, in CAJ, which could provide resistance to desiccation in this hostile dryer environment for species whose abundance is positively related to high relative humidity (dos Santos et al. 2010; Cavasini et al. 2014; Gustani et al. 2015).

In the *D. melanogaster* species, larger accumulation of energetic molecules occurs in favorable temperature conditions, rather disadvantageous as described above, to the adaptive history of this species, increasing its storage in mild temperatures and lowering fat and glycogen reserves when exposed to temperatures lower than 15° C or higher than 27° C (Klepsat et al. 2019). For *D. willistoni* and *D. mercatorum*, Southeast populations presented the lowest concentrations of glycogen and protein, and also of triglyceride in the case of *D. mercatorum*. Considering temperature and humidity are some of the most important environmental factors for adaptive evolution of insects (Nevo et al. 1998), the case of these species suggests similarities to what was described for *D. melanogaster*: highest concentration of energetic molecules in populations with more satisfactory conditions for the species survival, as Southern populations, where annual temperatures are lower and relative humidity are higher than those of Southeast populations (Instituto Nacional de Meteorologia 2019).

Matzkin et al. (2009) suggested that the triglyceride contents would distinguish species of the *Sophophora* and *Drosophila* subgenera, and that the metabolite levels would be similar among species belonging to the same subgenus rather than a different one. The results of this study do not confirm these relations, since none of the metabolites showed significant differences between *D.*

willistoni and the other species, with triglyceride values no significant different to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, and protein contents no different of *D. ornatifrons*. Moreover, triglyceride measurements for recently emerged adults in this study were similar to the zero day adults of *Sophophora* subgenus species, and glycogen and protein values were superior of species of the both subgenera analyzed by Matzkin et al. (2009).

The differences in the results found here and by Matzkin et al. (2009) can have different causes, not excluding: 1) the found responses for the lineages used by Matzkin et al. (2009) could be a consequence of adaption after many generations in laboratory conditions (Tucson *Drosophila* Species Stock), while the achievements in this study may reflect natural conditions more appropriately, since they were done with recently collected lineages (about only three generations in laboratory); 2) differences in the nutritional components in the culture mediums used by Matzkin et al. (2009) (banana/*Opuntia*) and this research (banana) could influence in some level the metabolic response, as considered by Ormerod et al. (2017); 3) the results in this paper demonstrate that the capacity of storage energetic molecules is determined by adaption to the environment, before phylogenetic relationships, and that the Neotropical populations and species can present distinctive responses of species belonging to other regions, probably due to its higher diversity in habitats. This aspect highlights the importance of this study in filling the knowledge gaps of the *Drosophila* species native to the Neotropical, which could aid in better understanding the adaptive divergence in this region, and so, become a model for others species of insects, and others animals.

4.1.5 CONCLUSIONS

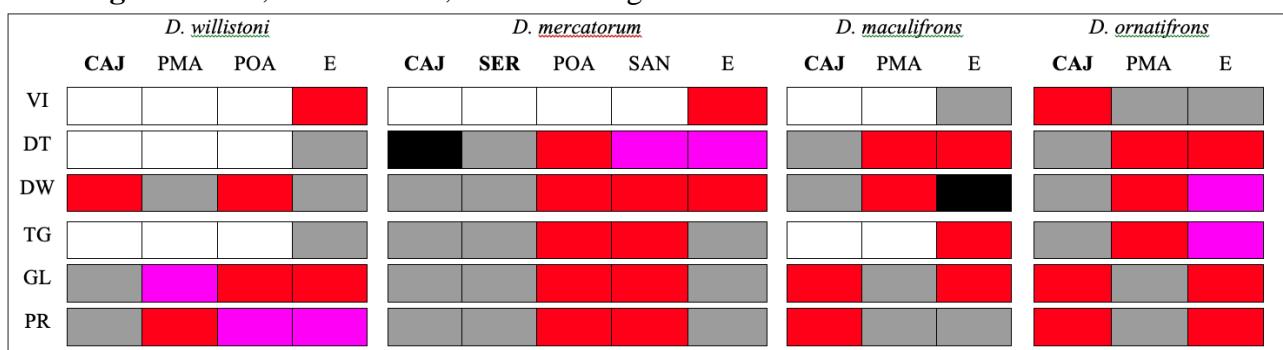
As observed in the illustration bellow, there was populational variation for most of the analyzed parameters, indicating the plasticity in the studied characteristics, essential for adaption to different environments. *Drosophila willistoni* (subgenus *Sophophora*) showed distinctive populational patterns than the other three species (subgenus *Drosophila*) for most of the analyzed traits. *Drosophila mercatorum* populations of the Southeast region presented significantly lower values than the South region for all analyzed parameters, with the exception of viability that had no difference among the populations of this species. *Drosophila maculifrons* and *D. ornatifrons* essentially followed the same basic populational profile of *D. mercatorum* for the life history traits and for the triglyceride contents, however the population responses from *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* were opposite to *D. mercatorum* for the glycogen and protein metabolites, with the highest indexes in the Southeast region.

The interspecific comparison (E, in the illustration bellow) of the characteristics suggests the adaptive history plays a major role than phylogenetic relationships: dry weight was significantly different between the four species; *D. willistoni* and *D. mercatorum* presented highest values of viability, and the lowest of development time and triglyceride in relation to *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. Higher viability in *D. willistoni* and *D. mercatorum* can be a result of the greater ability of these species for resources and habitats exploitation when compared to the other two, frequently occupying anthropized environments, such is the case of *D. willistoni*. The metabolic values of glycogen revealed to be significantly higher in *D. willistoni*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*, and the protein sort in *D. ornatifrons* and *D. willistoni*. That is, *D. mercatorum* indicated a significantly

lower capacity of storing energetic molecules when compared to the other three species. The adaptive history of this species that allowed for the exploitation of a variety of environments could lead to a trade-off of lower energy storage capacity. The same did not occur for *D. willistoni*, which broader geographic distribution must be the consequence or the cause of its ability to store energetic molecules, specially glycogen and protein.

Populational differences in dry weight and storage of some metabolic factors did not influence viability of *D. willistoni*, *D. mercatorum* and *D. maculifrons*, revealing an adaptive history distinct for *D. ornatifrons*. This aspect deserves better clarification, and a study is under development by us that analyzes the same characters under different conditions of energy resources, with the aim of verifying the amplitude of the adaptive capacity of these species.

Summary illustration of the conclusions, comparing viability (VI), development time (DT) and dry weight (DW) traits, and triglyceride (TG), glycogen (GL) and protein (PR) contents among populations (names of population **in bold** - CAJ, SER - are from the Southeast region of Brazil; the others - PMA, POA and SAN - are from the South region of Brazil) and species (E) for *Drosophila willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*: **highest value**, **second highest value**, **third highest value**, **lowest value**; white = no significant difference.



List of abbreviations

CAJ, Cajuru-SP.

SER, Serrana-SP.

PMA, Parque Municipal das Araucárias.

SAN, Santiago-RS.

POA, Porto Alegre-RS.

VI, Viability.

DT, Development time.

DW, Dry weight.

TG, Triglyceride.

GL, Glycogen.

PR, Protein.

RH, Relative humidity.

T°, Mean temperature.

MAX, Mean maximum temperature.

MIN, Mean minimum temperature.

Acknowledgments: We are grateful for Fundação Araucária (Protocolo 5773/17, Convênio 17/2017) and UNICENTRO, essential for financing the collections and providing structure and material for the experiments. CHS and KAVS were benefactors of financial aid of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – Brasil (master degree scholarship). We also thank Dr. Vera Lucia Valente (UFRS) and Dr. Maura Helena Manfrin (USP) for allowing the use of laboratories for the initial survey of the collections in the Rio Grande do Sul and São Paulo states, Dr. Lilian Madi-Ravazzi (UNESP) for her help in some of collections, Najeh Maissar Khalil, Wellington Luciano Braguini, Rosilene Rebeca for the permission to use spectrophotometer and microbalance to carry on metabolic pools analyzes, and Larissa Mateus for helping in English revision.

Authors' contribution: CHS and RPM collected the specimens; RPM and LPBM designed the research; CHS, KAVS, LPBM and RPM generated, analyzed and interpreted the results, and wrote the article. All authors contributed, read and approved the final version of this article.

Competing interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and materials: The data sets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication: Not applicable.

Ethics approval consent to participate: Not applicable.

4.1.6 REFERENCES

- Acurio AE, Rafael VL. 2009. Inventario taxonómico de Drosophilidae (Diptera) en el Parque Nacional Yasuni, Amazonia Ecuatoriana. *Acta Amazonica* **39**:713–718.
- Angilletta MJ. 2009. Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press, Oxford.
- Anagnostou C, Dorsch M, Rohlfs M. 2010. Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits. *Entomol Exp Appl* **136**:1-11.
- Atkinson WD. 1985. Coexistence of australian rainforest Diptera breeding in fallen fruit. *J Anim Ecol* **54**:507-518.
- Backes A. 1999. Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Brasil-II. *Pesquisas (Botânica)* **49**:31-52.
- Bakker K. 1962. An analysis of factors which determine the success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster*. *Arch Neerl Zool* **14**:200-281.
- Bakker K. 1969. Selection for rate of growth and its influenceon competitive ability of larvae of *Drosophila melanogaster*. *Neth J Zool* **19**:541-595.
- Betran E, Santos M, Ruiz A. 1998. Antagonistic pleiotropic effect of second-chromosome inversions on body size and early life-history traits in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* **52**:144–154.

- Bizzo L, Gottschalk MS, De Toni D, Hofmann PRP. 2010. Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potential as bioindicator in open environments. *Iheringia Ser Zool* **100**:185–191.
- Cavasini R, Buschini MLT, Machado LPB, Mateus RP. 2014. Comparison of Drosophilidae (Diptera) assemblages from two highland Araucaria Forest fragments, with and without environmental conservation policies. *Braz J Biol* **74**:761-768.
- Chaves NB, Tidon R. 2008. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. *Rev Bras Entomol* **52**:340-348.
- Chippindale AK, Alipaz JA, Chen H-W, Rose MR. 1997. Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. 1. Developmental speed and larval survival. *Evolvution* **51**:1536–1551.
- Chippindale AK, Chu TJ, Rose MR. 1996. Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **50**:753–766.
- Chippindale AK, Gibbs AG, Sheik M, Yee KJ, Djawdan M, Bradley TJ, Rose M R. 1998. Resource acquisition and the evolution of stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **52**:1342–1352.
- Coutinho-Silva RD, Montes MA, Oliveira GF, de Carvalho-Neto FG, Rohde C, Garcia ACL 2017. Effects of seasonality on drosophilids (Insecta, Diptera) in northern part of the Atlantic Forest, Brazil. *Bull Entomol Res* **107**:634-644.
- da Mata RA, Valadão H, Tidon R. 2015. Spatial and temporal dynamics of drosophilid larval assemblages associated to fruits. *Rev Bras Entomol* **59**: 50-57.
- Djawdan M, Chippindale AK, Rose MR, Bradley TJ. 1998. Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Zool* **71**:584–594.
- Dobzhansky TH, Pavan C. 1950. Local and seasonal variation in frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *J Anim Ecol* **19**:1-14.
- Döge JS, Valente VLS, Hofmann PRP. 2008. Drosophilids (Diptera) from an Atlantic Forest Area in Santa Catarina, Southern Brazil. *Rev Bras Entomol* **52**:615–624.
- dos Santos K, Machado LPB, Mateus RP. 2010. Sampling two species of the *Drosophila guarani* group in a fragment of Araucaria Forest: testing different types of baits, fermentation time, and period of the day. *Dros Inf Serv* **93**:185-188.
- Fernández-Elías VE, Ortega JF, Nelson RK, Mora-Rodriguez R. 2015. Relationship between muscle water and glycogen recovery after prolonged exercise in the heat in humans. *Eur J Appl Physiol* **115**:1919-1926.
- Flatt T. 2020. Life-history evolution and the genetics of fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **214**: 3-48.
- Gáliková M, Diesner M, Klepsatel P, Hehlert P, Xu Y, Bickmeyer I, Predel R, Kühnlein RP. 2015. Energy homeostasis control in *Drosophila* adipokinetic hormone mutants. *Genetics* **201**:665-683.
- Ghosh SM, Satish KM, Jayaram M, Joshi A. 2019. Does long-term selection for development time result in canalization: a test using *Drosophila melanogaster*. *Front Ecol Evol* **7**:1-16.
- Goñi B, Remedios M, González-Vainer P, Martínez M, Vilela CR. 2012. Species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) attracted to dung and carrion baited pitfall traps in the Uruguayan Eastern Serranías. *Zoología* **29**:308-317.

- Gottschalk MS, Bizzo L, Döge JS, Profes MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2009. Drosophilidae (Diptera) associated to fungi: differential use of resources in anthropic and Atlantica Rain Forest areas. *Iheringea Sér Zool* **99**:442-448.
- Gottschalk MS, De Toni DC, Valente VLS, Hofmann P. 2007. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. *Neotrop Ent* **36**:848-862.
- Gottschalk MS, Hofmann PRP, Valente VLS. 2008. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. *Check List* **4**:485-518.
- Graves JL, Toolson EC, Jeong C, Vu LN, Rose MR. 1992. Desiccation, flight, glycogen, and postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Zool* **65**:268-286.
- Gustani EC, Oliveira APF, Santos MH, Machado LPB, Mateus RP. 2015. Demographic Structure and Evolutionary History of *Drosophila ornatifrons* Diptera, Drosophilidae) from Atlantic Forest of Southern Brazil. *Zool Sci* **32**:141-150.
- Harshman LG, Hoffmann AA, Clark AG. 1999. Selection for starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses. *J Evol Biol* **12**:370-379.
- Hillesheim E, Stearns SC. 1992. Correlated responses in life history traits to artificial selection for body weight in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **46**:745-752.
- Hochmüller CJ, Lopes-da-Silva M, Valente VLS, Schmitz HJ. 2010. The drosophilid fauna (Diptera, Drosophilidae) of the transition between the Pampa and Atlantic Forest Biomes in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil: first records. *Pap Avulso Zool* **50**:285-295.
- Hoffmann AA, Harshman LG. 1999. Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels. *Heredity* **83**:637-43.
- Hoffmann AA, Parsons PA. 1989. An integrated approach to environmental stress tolerance and life-history variation: desiccation tolerance in *Drosophila*. *Biol J Linn Soc Lond* **37**:117-136.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1992) Manual técnico da vegetação brasileira. IBGE Manuais técnicos em geociências, Rio de Janeiro.
- Instituto Nacional de Meteorologia. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. <http://www.inmet.gov.br/portal/portal/>. Accessed 30 Apr. 2019.
- Jehrke L, Stewart FA, Droste A, Beller M. 2018. The impact of genome variation and diet on the metabolic phenotype and microbiome composition of *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep* **8**: 1-15.
- Joshi A, Mueller LD. 1988. Evolution of higher feeding rate in *Drosophila* due to density-dependent natural selection. *Evolution* **42**:1090-1093.
- Joshi A, Mueller LD. 1996. Density-dependent natural selection in *Drosophila*: trade-offs between larval food acquisition and utilization. *Evol Ecol* **10**:4634-74.
- Joshi A, Wu WP, Mueller LD. 1998. Density-dependent natural selection in *Drosophila*: adaptation to adult crowding. *Evol Ecol* **12**:363-376.
- Jumbo-Lucioni P, Ayroles JF, Chambers MM, Jordan KW, Leips J, Mackay TF, De Luca M. 2010. Systems genetics analysis of body weight and energy metabolism traits in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* **11**:297-309.
- Kastritsis CD. 1969. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. *J. Hered.* **60**:50–57.
- Kastritsis CD, Pasteur G, Quick J. 1970. Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediostriata* and *Drosophila griseolineata*. *Canad. J. Genet. Cytol.* **12**:952–959.

- Kauranen H, Kinnunen J, Hopkins D, Hoikkala A. 2019. Direct and correlated responses to bi-directional selection on pre-adult development time in *Drosophila montana*. *J Insect Physiol* **116**:77-89.
- Klepsat P, Gáliková M, Xu Y, Kühlein RP. 2016. Termal stress depletes energy reserves in *Drosophila*. *Sci Rep* **6**:1-12.
- Klepsat P, Wildridge D, Gáliková, M. 2019. Temperature induces changes in *Drosophila* energy stores. *Sci Rep* **9**:1-10.
- Koert S, Keesey IW, Easson MLE, Gershenson J, Hansson BS, Knaden M. 2020. Variable dependency on associated yeast communities influences host range in *Drosophila* species. *Oikos*. doi: 10.1111/oik.07180.
- Krijger CL, Peters YC, Sevenster JG. 2001. Competitive ability of neotropical *Drosophila* predicted from larval development times. *Oikos* **92**: 325-332.
- Martins M. 1987. Variação espacial e temporal de algumas espécies e grupos de *Drosophila* (Diptera) em duas reservas de matas isoladas, nas vizinhanças de Manaus (Amazonas, Brasil). *Bol Mus Par Emilio Goeldi, sér Zool* **3**:195–218.
- Mateus RP, Buschini MLT, Sene FM. 2006. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay river basin. *Braz J Biol* **66**:719-729.
- Mateus RP, Machado LPB, Simão-Silva DP. 2018. *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) survey in an ‘island’of xerophytic vegetation within the Atlantic Forest biome, with emphasis on the *repleta* species group. *Stud Neotrop Fauna Environ* **53**:152-161.
- Matsuda H, Yamada T, Yoshida M, Nishimura T. 2015. Flies without trehalose. *J Biol Chem* **290**:1244-1255.
- Matzkin LM, Mutsaka K, Johnson S, Markow TA. 2009. Metabolic pools differ among ecologically diverse *Drosophila* species. *J Insect Physiol* **55**:1145–1150.
- Matzkin LM, Johnson S, Paight C, Bozinovic G, Markow TA. 2011. Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse *Drosophila*. *J Nutr* **141**:1127-1133.
- Medeiros HF, Klaczko LB. 2004. How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forests of São Paulo, Brazil? Species lists of three forest remnants. *Biota neotrop* **4**:1–12.
- Mendes MF, Valer FB, Vieira JGA, Blauth ML, Gottschalk MS. 2017. Diversity of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the Restinga forest of southern Brazil. *Rev Bras Entomol* **61**:248-256.
- Merritt TJS, Sezgin E, Zhu CT, Eanes WF. 2006. Triglyceride pools, flight and activity variation at the Gpdh locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **172**: 293-304.
- Michaud MR, Denlinger DL. 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and aminoacid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J Comp Physiol B* **177**:753–763.
- Na J, Musselman LP, Pendse J, Baranski TJ, Bodmer R, Ocorr K, Cagan RA. 2013. *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1003175.
- Nelson DL, Cox MM. 2014. Princípios de bioquímica de Lehninger. Artmed, Porto Alegre.
- Nevo E, Rashkovetsky E, Pavlicek T, Korol A. 1998. A complex adaptive syndrome in *Drosophila* caused by microclimatic contrasts. *Heredity* **80**:9–16.

- Nunney L. 1996. The response of selection for fast larval development in *Drosophila melanogaster* and its effects on adult weight: an example of a fitness trade-off. *Evolution* **50**:1193–1204.
- Ohtsu T, Kimura MT, Hori SH. 1992. Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. *J Comp Physiol B* **162**:203–208.
- Ohtsu T, Kimura MT, Katagiri C. 1998. How *Drosophila* species acquire cold tolerance: qualitative changes of phospholipids. *Eur J Biochem* **252**:608–611.
- Oliveira-Filho AT, Budke JC, Jarenkow JA, Eisenlohr PV, Neves DRM. 2015. Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests. *J Plant Ecol* **8**:242–260.
- Ormerod KG, LePine OK, Abbineni PS, Bridgeman JM, Coorsen JR, Mercier A J, Tattersall GJ. 2017. *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. *Fly* **11**:153–170.
- Partridge L, Farquhar M. 1983. Lifetime mating success of male fruitflies (*Drosophila melanogaster*) is related to their size. *Anim Behav* **31**:871–877.
- Partridge L, Fowler K. 1993. Responses and correlated responses to artificial selection on thorax length in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **47**:213–226.
- Partridge L, Sibly R. 1991. Constraints in the evolution of life-histories. *Phil Trans R Soc London B* **332**:3–13.
- Pereira MAQR, Vilela CR, Sene FM. 1983. Notes on breeding and feeding sites of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Cienc Cult* **35**:1313–1319.
- Pitnick S, García-González F. 2002. Harm to females increases with male body size in *Drosophila melanogaster*. *Proc Royal Soc B* **269**: 1821–1828.
- Poppe JL, Valente VLS, Schmitz HJ. 2012. Structure of Drosophilidae assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa Biome (São Luiz Gonzaga, RS). *Pap Avulsos Zool* **52**:185–195.
- Prasad NG, Shakarad M, Gohil VM, Sheeba V, Rajamani M, Joshi A. 2000. Evolution of reduced pre-adult viability and larval growth rate in laboratory populations of *Drosophila melanogaster* selected for shorter development time. *Genet Res* **76**:249–259.
- Powell JR. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model. Univ Press, Oxford.
- Reed LK, Williams S, Springston M, Brown J, Freeman K, DesRoches CE, Sokolowski MB, Gibson G. 2010. Genotype-by-diet interactions drive metabolic phenotype variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **185**:1009–1019.
- Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. 2012. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* **441**:763–787.
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M, Loreto ELS. 2005. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene. *Mol. Phylogenetic Evol.* **36**:623–640.
- Robe LJ, Valente VLS, Loreto ELS. 2010. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* **138**:725–735.
- Rose MR. 1983. Theories of life history evolution. *Am Zool* **23**:15–23.
- Rose MR, Bradley TJ. 1998. Evolutionary physiology of the cost of reproduction. *Oikos* **83**:443–451.
- Saavedra CCR, Callegari-Jacques SM, Napp M, Valente VLS. 1995. A descriptive and analytical study of four Neotropical Drosophilid communities. *J Zool Syst Evol Res* **33**:62–74.

- Salzano FM. 1955. Chromosomal polymorphism in two species of the *guarani* group of *Drosophila*. *Chromosoma* **7**:39-50.
- Schmitz HJ, Valente VLS, Hofmann PRP. 2007. Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from Mangrove Forests of Santa Catarina Island, Southern Brazil. *Neotrop Entomol* **36**:53–64.
- Shrader ME, Burrack HJ, Pfeiffer DG. 2020. Effects of interspecific larval competition on developmental parameters in nutrient sources between *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and *Zaprionus indianus*. *J Econ Entomol* **113**:230-238.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry*, 3a ed. Freeman, New York.
- Tantawy AO. 1961. Effects of temperature on productivity and genetic variance of body size in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **46**:227-238.
- Tantawy AO, Vetukhiv MO. 1960. Effects of size on fecundity, longevity and viability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Am Nat* **94**:395-403.
- TaxoDros. 2020. The database on taxonomy of Drosophilidae, Zürich. <http://www.taxodros.uzh.ch>. Accessed 16 Feb. 2020.
- Tidon R. 2006. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biol J Linn Soc Lond* **87**:233–247.
- Val FC, Vilela MD, Marques CR. 1981. Drosophilidae of the Neotropical Region. In Ashburner M, Carson HL, Thompson N (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*, 3rd edn. Academic Press, New York.
- Valadão H, Proença CE, Kuhlmann MP, Harris SA, Tidon R. 2019. Fruit-breeding drosophilids (Diptera) in the Neotropics: playing the field and specialising in generalism? *Ecol Entomol* **44**:721-737.
- Valtonen TM, Kangassalo K, Pölkki M, Rantala MJ. 2012. Transgenerational effects of parental larval diet on offspring development time, adult body size and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0031611.
- Wertheim B, Sevenster JG, Eijs IEM, Van Alphen JJM. 2000. Species diversity in a mycophagous insect community: the case of spatial aggregation vs. resource partitioning. *J Anim Ecol* **69**:335-351.
- Yamada T, Habara O, Kubo H, Nishimura T. 2018. Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. *Development* **145**:1-12.
- Yamada T, Habara O, Yoshii Y, Matsushita R, Kubo H, Nojima Y, Nishimura, T. 2019. The role of glycogen in development and adult fitness in *Drosophila*. *Development* **146**:1-14.
- Yotoko KSC, Medeiros HF, Solferini VN, Klaczko LB. 2003. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. *Mol. Phylogenetic Evol.* **28**:614– 619.
- Zonato V, Collins L, Pegoraro M, Tauber E, Kyriacou CP. 2017. Is diapause an ancient adaptation in *Drosophila*? *J Insect Physiol* **98**:267-274.
- Zwaan B, Bijlsma R, Hoekstra RF. 1995. Artificial selection for development time in *Drosophila melanogaster* in relation to the evolution of aging: direct and correlated responses. *Evolution* **49**:635–648.
- Zwaan BJ, Bijlsma R, Hoekstra RF. 1991. On the developmental theory of aging. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to preadult breeding conditions. *Heredity* **66**:29-39.

Table 1 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of viability for *Drosophila willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

1	SS	MS	DF	F
Species	1.8209	0.6070	3	10.298***
Population (Species)	1.1503	0.1643	7	2.788**
Error	5.8349	0.0589	99	
2	<i>D. willistoni</i>	<i>D. mercatorum</i>	<i>D. maculifrons</i>	
<i>D. mercatorum</i>	0.6733			
<i>D. maculifrons</i>	4.653**	5.499***		
<i>D. ornatifrons</i>	4.866**	5.723***	0.1943	

Table 2 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of development time for *Drosophila willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

1	SS	MS	DF	F
Species	4963.1	1654.4	3	2061.6***
Population (Species)	3433.1	490.4	7	611.2***
Sex	14.4	14.4	1	18.0***
Population (Species) x Sex	15.3	1.5	10	1.9*
Error	2290.2	0.8	2854	
2	<i>D. willistoni</i>	<i>D. mercatorum</i>	<i>D. maculifrons</i>	
<i>D. mercatorum</i>	34.5***			
<i>D. maculifrons</i>	54.14***	31.84***		
<i>D. ornatifrons</i>	51.63***	29.39***	1.719	

Table 3 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of dry weight for *Drosophila willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. *p ≤ 0.05; ***p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

1	SS	MS	DF	F
Species	3.50758	1.16919	3	646.15***
Population (Species)	0.18371	0.02624	7	14.50***
Sex	0.15639	0.15639	1	86.43***
Population (Species) x Sex	0.06070	0.00607	10	3.35***
Error	0.35828	0.00181	198	
2	<i>D. willistoni</i>	<i>D. mercatorum</i>	<i>D. maculifrons</i>	
<i>D. mercatorum</i>	43.68***			
<i>D. maculifrons</i>	12.67***	25.17***		
<i>D. ornatifrons</i>	19.53***	17.94***	6.267***	

Table 4 Nested ANOVA (1) e post-hoc Tukey test (2) of Triglycerides, Glycogen e Total Protein contents per mg of dry weight for *Drosophila willistoni*, *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*. SS = sum of squares; MS = mean squares; DF = degrees of freedom. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

1		SS	MS	DF	F
Triglyceride	Species	1.854886	0.618295	3	99.9980** *
	Population (Species)	0.383478	0.054783	7	8.8601***
	Sex	0.018527	0.018527	1	2.9964
	Population (Species) x Sex	0.128304	0.012830	10	2.0751*
	Error	1.193334	0.006183	193	
Glycogen	Species	0.007034	0.002345	3	52.199***
	Population (Species)	0.007149	0.001021	7	22.737***
	Sex	0.000481	0.000481	1	10.699**
	Population (Species) x Sex	0.001025	0.000103	10	2.283*
	Error	0.008714	0.000045	194	
Total Protein	Species	0.442345	0.147448	3	23.254***
	Population (Species)	0.788636	0.112662	7	17.768***
	Sex	0.028351	0.028351	1	4.471*
	Population (Species) x Sex	0.059537	0.005954	10	0.939
	Error	1.230123	0.006341	194	
2		<i>D. willistoni</i>	<i>D. mercatorum</i>	<i>D. maculifrons</i>	
Triglyceride	<i>D. mercatorum</i>	1.319			
	<i>D. maculifrons</i>	17.84***	20.01***		
	<i>D. ornatifrons</i>	6.295***	7.779***	10.29***	
Glycogen	<i>D. mercatorum</i>	11.42***			
	<i>D. maculifrons</i>	0.0285	10.04***		
	<i>D. ornatifrons</i>	1.87	7.753***	1.691	
Total Protein	<i>D. mercatorum</i>	5.504***			
	<i>D. maculifrons</i>	4.215***	0.4611		
	<i>D. ornatifrons</i>	3.162*	8.17***	6.734***	

Figure 1 Viability of second instar larva to adult for populations of *Drosophila willistoni* (CAJ, PMA and POA), *D. mercatorum* (SER, CAJ, SAN and POA), *D. maculifrons* (CAJ and PMA) and *D. ornatifrons* (CAJ and PMA). Viability was calculated as the ratio emerged adults/total larvae.

Figure 2 Development time from second instar larva to emerged adults for populations of *Drosophila willistoni* (CAJ, PMA and POA), *D. mercatorum* (SER, CAJ, SAN and POA), *D. maculifrons* (CAJ and PMA) and *D. ornatifrons* (CAJ and PMA). The development times were measured in hours.

Figure 3 dry weights in milligrams of adult female and male from populations of *Drosophila willistoni* (CAJ, PMA and POA), *D. mercatorum* (SER, CAJ, SAN and POA), *D. maculifrons* (CAJ and PMA) and *D. ornatifrons* (CAJ and PMA). Individual dry weights were calculated from samples of 15 recently emerged flies of *D. willistoni*, and 5 recently emerged flies of *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*.

Figure 4 Triglycerides (A), Glycogen (B), and Total Protein (C) concentrations per mg of dry weight of adult female and male from populations of *Drosophila willistoni* (CAJ, PMA and POA), *D. mercatorum* (SER, CAJ, SAN and POA), *D. maculifrons* (CAJ and PMA) and *D. ornatifrons* (CAJ and PMA). Values are means and SE for homogenates of 15 flies for *D. willistoni* and 5 flies for *D. mercatorum*, *D. maculifrons* and *D. ornatifrons*.

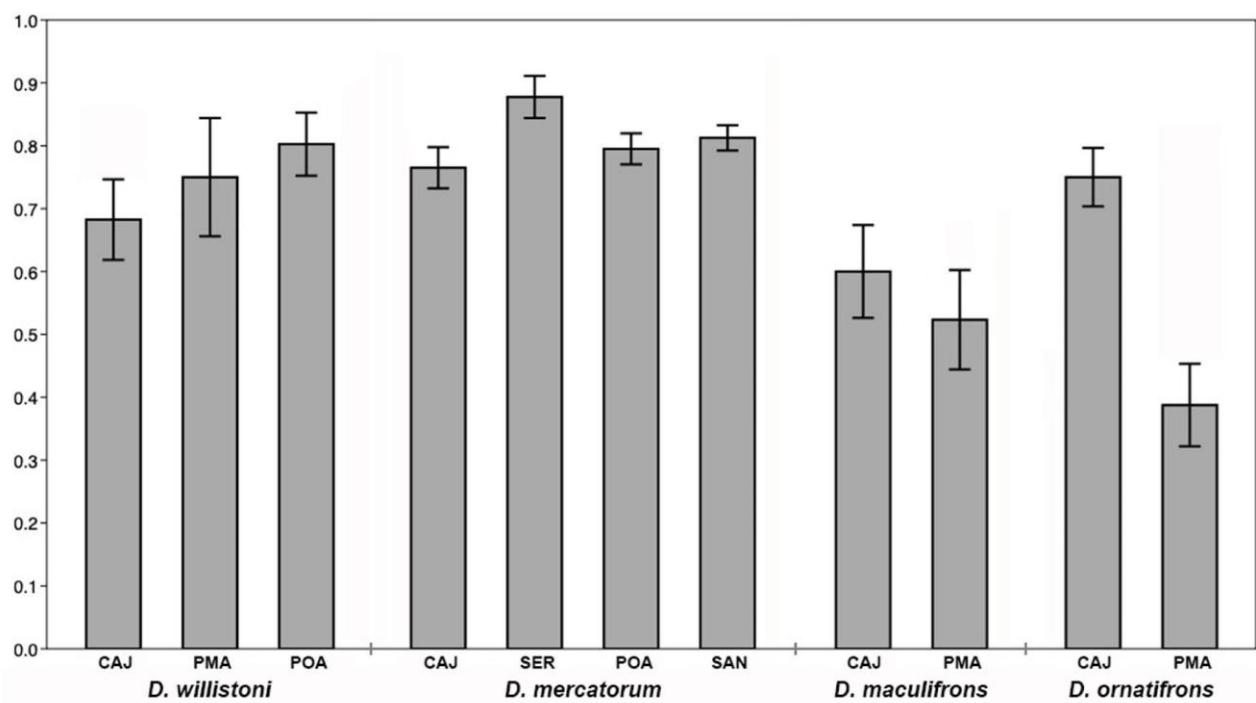
Figure 1

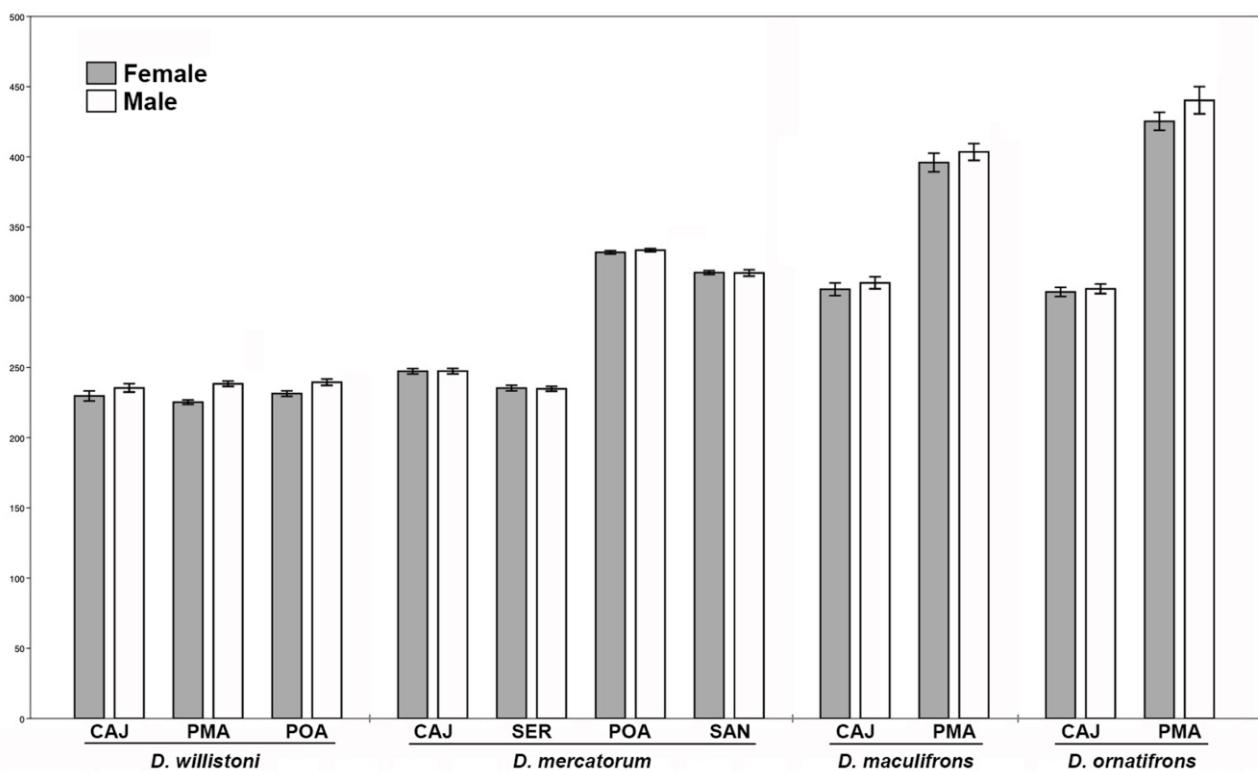
Figure 2

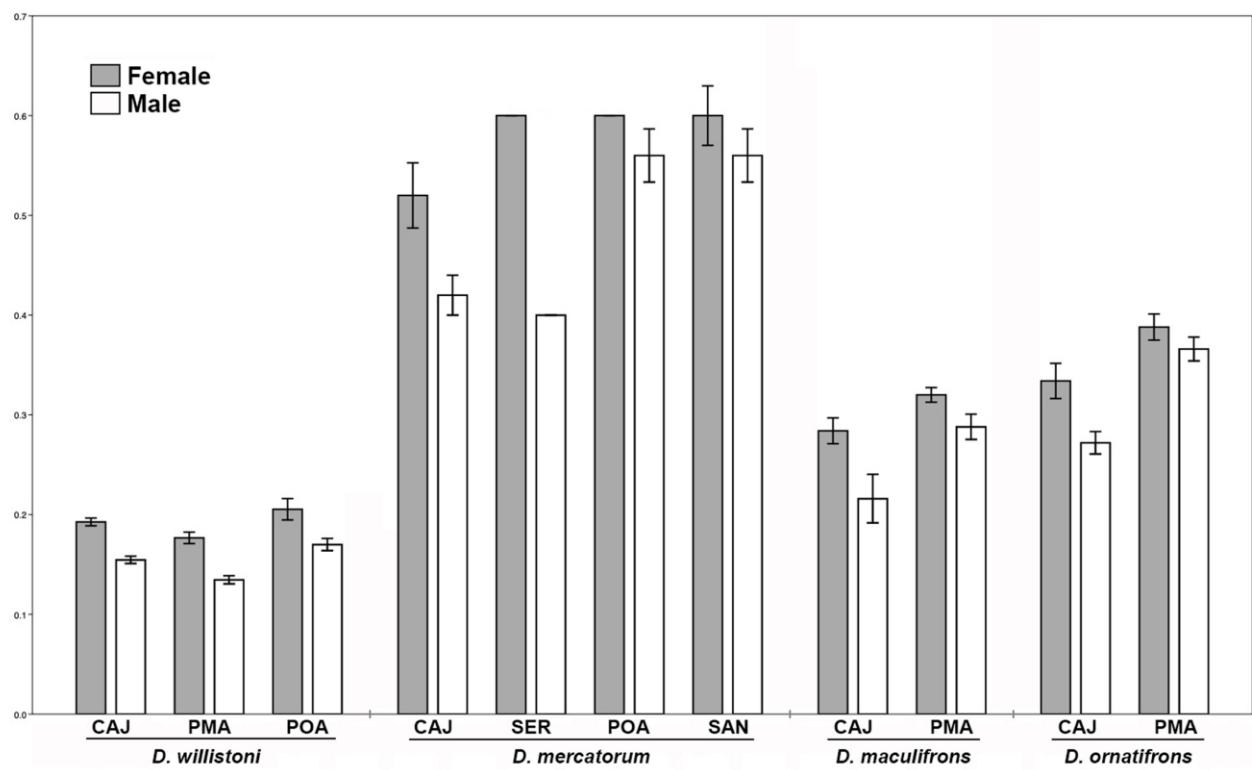
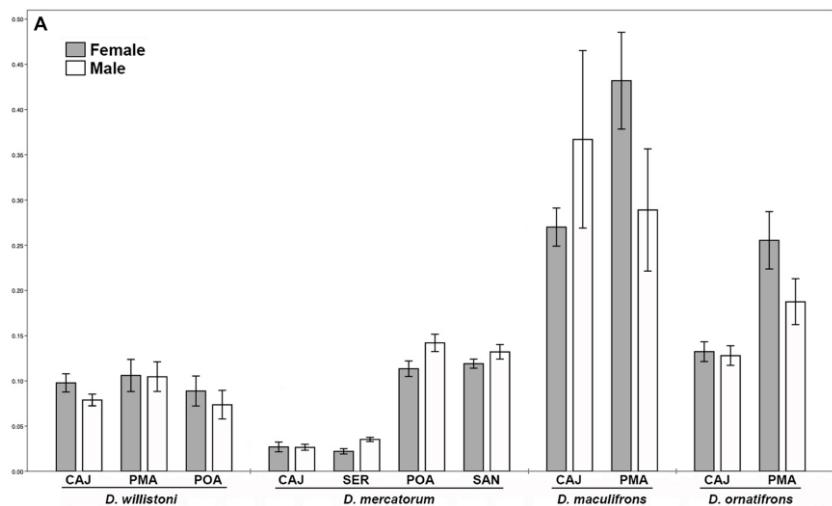
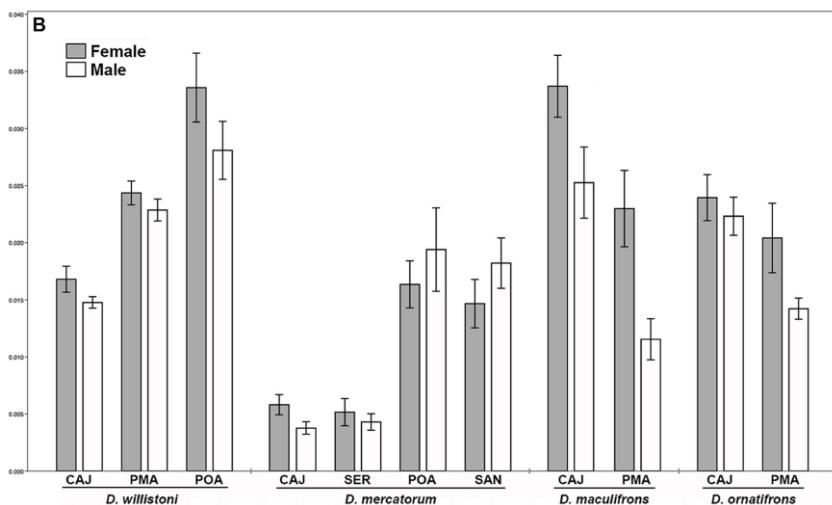
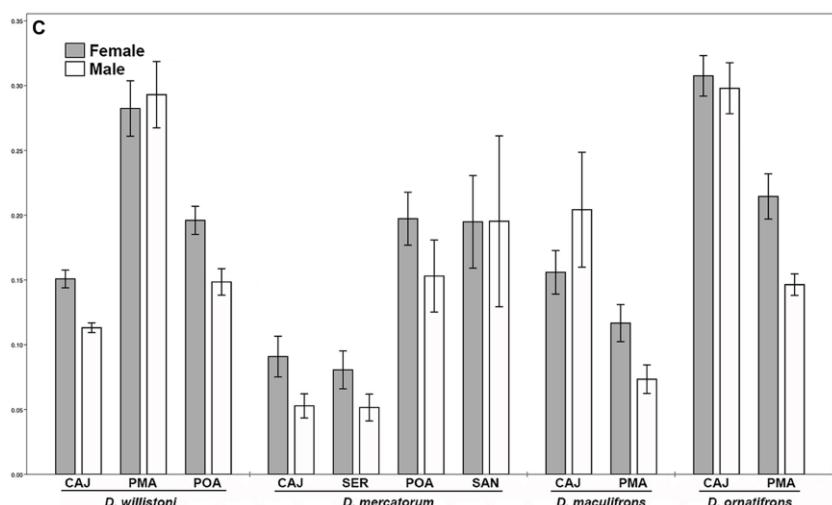
Figure 3

Figure 4**A****B****C****1.**

4.2 CAPÍTULO 2

A plasticidade fenotípica afeta a história de vida de *Drosophila mercatorum* em resposta à sazonalidade ambiental.

4.2.1 RESUMO:

A variação ambiental exerce papel fundamental na resposta fenotípica. Consequentemente, a sazonalidade ambiental pode ser considerada como uma força evolutiva potente, capaz de manter o polimorfismo e a capacidade do organismo em apresentar diferentes características em função das condições ambientais. *Drosophila mercatorum*, é uma espécie não cactófila do grupo *repleta*, tem distribuição Neotropical e é frequentemente encontrada em ambientes naturais de vegetação aberta ou fechada, com e sem associação com vegetação xerofítica. Nós avaliamos os efeitos de diferentes tipos de dieta que diferem em quantidade de proteína:carboidrato sobre as características de história de vida (viabilidade, tempo de desenvolvimento e peso seco) e metabólicas (conteúdos de triglicerídeos, glicogênio e proteína) nessa espécie, em quatro populações coletadas em dois ambientes com ou sem a associação a vegetação xerofítica em duas regiões geográficas, para avaliar se as possíveis diferenças são modificações decorrentes da plasticidade fenotípica em resposta ao estresse nutricional, ou se essas diferenças são provenientes da diversificação regional entre as populações. Nossos resultados sugerem estar ocorrendo, além do efeito dietético, um efeito populacional entre os indivíduos das regiões Sul e Sudeste, tanto nos caracteres bionômicos, quanto nos conteúdos metabólicos em ambos os tipos de vegetação, e podem ser reflexo dos ambientes aos quais as populações estão adaptadas, em conjunto dos fatores estressantes das dietas testadas sobre cada população. Dentre esses fatores a variação climática é o que melhor explica o fator estressante que resultou na diferença entre as populações.

Palavras-chave: Viabilidade, Tempo de Desenvolvimento, Floresta Estacional Semidecidual, Conteúdos metabólicos, Efeito populacional.

4.2.2 ABSTRACT

Environmental variation plays a fundamental role in the phenotypic response. Consequently, environmental seasonality can be considered as a powerful evolutionary force, capable of maintaining polymorphism and the organism's capacity to present different characteristics depending on environmental conditions. *Drosophila mercatorum* is a non-cactophile species of the *repleta* group, has a Neotropical distribution and is frequently found in natural environments with open or closed vegetation, with and without association with xerophytic vegetation. We evaluated the effects of different types of diets that differ in protein:carbohydrate amounts on life history (viability, development time and dry weight) and metabolic (triglyceride, glycogen and protein contents) characteristics in this species, in four populations collected in two environments with or without association with xerophytic vegetation in two geographic regions, to assess whether the possible differences are changes due to phenotypic plasticity in response to nutritional stress, or whether these differences are due to regional diversification between populations. Our results suggest that, in addition to the dietary effect, a population effect is occurring among individuals from the South and Southeast regions, both in bionomic characters and in metabolic contents in both types of vegetation, and may be a reflection of the environments in which the populations are adapted, together with the stressors of the diets tested on each population. Among these factors, climate variation is the one that best explains the stressful factor that resulted in the difference between populations.

Keywords: Viability, Development Time, Seasonal Semideciduous Forest, Metabolic Content, Population Effect.

4.2.3 INTRODUÇÃO

A variação ambiental consiste em um conjunto de mudanças em diversos fatores, tais como temperatura, umidade, fotoperíodo, e disponibilidade de alimento (REGAN, 2020). Segundo Hutchinson (1957, *apud* SILVA-SOARES et al., 2017), os recursos nutricionais e substratos alimentares utilizados por diferentes organismos são importantes para definir o seu nicho ecológico, distribuição geográfica e abundância em diferentes ambientes. Alterações nos contextos ambientais, consequentemente, repercutem em mudanças em características de história de vida, morfológicas e adaptativas em populações naturais (FANARA; WERENKRAUT 2016).

A exploração de novos substratos alimentares proporciona às espécies a oportunidade de expandir sua distribuição geográfica, podendo contribuir para a diversificação de espécies (SILVA-SOARES et al., 2017) ou influenciar diretamente na expressão de fenótipos quantitativos resultantes de redes de interação entre genes (ORMEROD et al., 2017).

Segundo Aggarwal e colaboradores (2021) a sazonalidade ambiental é uma força evolutiva potente, capaz de manter o polimorfismo e a capacidade do organismo em apresentar diferentes características em função das condições ambientais. Portanto, é provável que a capacidade das espécies em responderem ao estresse nutricional seja um resultado da seleção sob caracteres adaptativos preexistentes, ou seja, resultado de plasticidade fenotípica (HOFFMANN; PARSONS, 1991; DEARING et al. 2005; KOLSS et al., 2009).

Atualmente, o gênero *Drosophila* é composto por mais de 2.000 espécies descritas (BÄCHLI, 2021), sendo que a região Neotropical abriga em torno de 442 espécies (BRAKE; BÄCHLI, 2008). Este gênero apresenta grande diversidade ecológica, com extensa interação com várias famílias de plantas (BOUZAS et al., 2021) e ampla variabilidade de exploração de recursos nutricionais (CARSON, 1971; PEREIRA; VILELA; SENE, 1983). Além disso, algumas espécies são generalistas e outras são mais restritas, sendo consideradas especialistas (VALADÃO et al., 2019).

As espécies deste gênero são caracterizadas como fitosaprófagas (THROCKMORTON, 1975), pois utilizam tecidos vegetais em processo de decomposição como local para oviposição e desenvolvimento larval (MARKOW; O'GRADY, 2008; SOTO et al., 2010). Dentro os principais recursos alimentares utilizados pelas moscas deste gênero estão frutos (ATKINSON; SHORROCKS, 1997), flores (BRNCIC, 1983), cladódios (HEED, 1978), além de outros tecidos vegetais (CARSON, 1971), assim como fungos carnosos (JAENIKE et al., 1983) e guano de morcego (TOSI et al., 1990) também podem ser utilizados.

Durante o processo de decomposição dos tecidos vegetais ocorre a liberação de substâncias voláteis, que atraem os drosofilídeos para o substrato, onde os indivíduos se alimentam dos microrganismos associados ao processo de decomposição (VACEK et al. 1985; JAENIKE, 1983; BARKER et al. 1994; CARSON, 1971; SEVENSTER; VAN ALPHEN, 1996; VILELA, 2001; MARKOW; O'GRADY, 2008; SOTO et al., 2010). Dentre os microrganismos presentes neste processo estão as leveduras, que facilitam a decomposição do substrato vegetal e servem como a principal fonte de proteína para as larvas e adultos de *Drosophila* (BEGON, 1982; BECHER et al., 2012). O processo realizado pelas leveduras nos tecidos vegetais causa mudanças na composição nutricional dos substratos e também em outras propriedades, e os organismos que os utilizam, em diferentes estágios de decomposição, podem apresentar adaptações comportamentais e nutricionais específicas (SILVA-SOARES et al., 2017).

A glicose é a molécula principal utilizada para o crescimento das larvas. No estágio larval ocorre a acumulação de biomassa, produção de ATP e síntese de biomoléculas (proteínas e lipídios de armazenamento). No estágio de pupa ocorre a reorganização dos tecidos larvais que leva a formação dos órgãos adultos, há também um declínio da biomassa, e os lipídios armazenados são metabolizados suprindo as necessidades energéticas da divisão celular, diferenciação, e posterior eclosão (JACOBS et al., 2020).

Muitos estudos sobre os efeitos da dieta em características de história de vida e metabólicas têm sido feitos utilizando as espécies do gênero *Drosophila*. Elas são altamente sensíveis a pequenas modificações ambientais, as quais podem refletir no tamanho das populações naturais (TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006). Os estudos realizados sobre a estrutura populacional e ecológica das espécies de *Drosophila* têm fornecido informações importantes sobre o seu processo evolutivo (BIZZO; SENE, 1982; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006).

O grupo *repleta* (subgênero *Drosophila*) é um dos maiores grupos neotropicais. Atualmente é constituído por aproximadamente 119 espécies descritas e divididas em cinco subgrupos: *repleta*, *mercatorum*, *hydei*, *mulleri* e *fasciola* (BÄCHLI, 2021). Esse grupo apresenta um diferencial com relação aos demais grupos de drosofilídeos, já que metade das espécies é cactófila, isto é, as larvas especialistas utilizam cladódios de cactos em decomposição durante o seu desenvolvimento. Porém os adultos destas espécies são generalistas. Já a outra metade tem tanto larvas como adultos generalistas (STARMER; GILBERT 1982; PEREIRA et al. 1983; STARMER et al. 1986; MORAIS et al. 1994; MACHADO et al. 2017).

A especialização ao hospedeiro é uma característica dinâmica no grupo *repleta* e um fator importante sobre a diversificação em sua história evolutiva (BOUZAS et al., 2021). A mudança de hospedeiro por espécies do grupo *repleta* envolveu rearranjos cromossômico em todo o grupo, e é possível realizar a separação das diferentes espécies por meio de inversões cromossômicas (WASSEMAN, 1992; MARKOW, 2019)

Drosophila mercatorum (PATTERSON; WHEELER, 1942) é uma espécie não cactófila do grupo *repleta* que pode ser encontrada na região Neotropical. Na América do Sul, ela é frequentemente coletada em ambientes naturais de vegetação aberta, com e sem associação com vegetação xerofítica, geralmente não associada com o homem, desde o leste da Cordilheira dos Andes, e em áreas como chaco, pantanal, cerrado, e também em vegetação fechada (SENE et al., 1981; VILELA et al., 1983). É uma espécie generalista e altamente competitiva para recursos alimentares (PEREIRA et al., 1983), também é considerada uma das mais abundantes espécies de drosofilídeos em áreas de vegetação aberta na América do Sul (VILELA et al., 1983; TIDON, 2006).

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos dos diferentes tipos de dieta sobre as características de história de vida e metabólicas na espécie *Drosophila mercatorum*, a partir de populações coletadas em dois ambientes com ou sem a associação a vegetação xerofítica em duas regiões geográficas, Sul e Sudeste do Brasil, para avaliar se as possíveis diferenças obtidas são modificações decorrentes da plasticidade fenotípica em resposta ao estresse nutricional, ou se essas diferenças são provenientes da diversificação regional entre as populações.

4.2.4 METODOLOGIA

4.2.4.1 Linhagens, dietas e desenho experimental

As linhagens de *Drosophila mercatorum* foram coletadas em fragmentos de floresta estacional semidecidual pertencente ao bioma Mata Atlântica de quatro localidades:

- 1) Serrana-SP (SER- 21°15'15,23" S, 47°34'34,95" O): fragmento de Floresta Estacional Semidecidual com presença de vegetação xerofítica; temperatura média (T°) = 22,7° C (mínima – MIN - = 15,6° C; máxima – MÁX - = 30,4° C); umidade relativa média (UR) = 67%. Nesta área o

verão é quente e úmido e o inverno caracterizado por longos períodos com pouca ou nenhuma precipitação;

2) Fazenda Santa Cecília, Cajuru-SP (CAJ- 21°21'35,45" S, 47°17'32,89" O): distante 32 Km em linha reta de SER, fragmento de Floresta Estacional Semidecidual sem associação à vegetação xerofítica; os dados de T°, UR e características sazonais são os mesmos descritos para SER;

3) Santiago-RS (SAN- 20°23'00,54" S, 54°44'41,58" O): fragmento de Floresta Estacional Semidecidual associado à vegetação xerofítica, dentro do bioma Pampa; T° = 18,9° C (MIN = 14,4° C; MÁX = 24,9° C); UR = 74,8%. Clima subtropical úmido, sem estação seca definida;

4) Morro Santana, *Campus* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS (POA- 30°04'9,94" S, 51°07'36,34" O): distante 380 Km em linha reta de SAN, fragmento de Floresta Estacional Semidecidual sem associação à vegetação xerofítica, dentro do bioma Pampa; T° = 20,1° C (MIN = 16,1° C; MÁX = 25,8° C); UR = 77,1%. Clima subtropical úmido, sem estação seca definida.

Após a coleta os indivíduos foram transferidos para o laboratório, onde as fêmeas foram identificadas com o auxílio da chave de identificação de FREIRE-MAIA; PAVAN (1949) e colocadas individualmente em frascos de vidro contendo meio de cultura padrão de banana-ágar para a obtenção de linhagens isofêmeas (isolinhagens). Todas as linhagens foram mantidas a 25°C ± 1°C, em um fotoperíodo de 12h:12h (claro: escuro).

Os experimentos foram realizados com a preparação de três diferentes dietas de acordo com o descrito por Matzkin et al. (2011): 1) maior concentração de proteína em relação à açúcar (HPS – *high protein:sugar ratio*); 2) concentrações intermediárias de proteína e açúcar (EPS – *equal protein:sugar ratio*), e; 3) menor concentração de proteína em relação à açúcar (LPS – *low protein:sugar ratio*). Ainda segundo Matzkin et al. (2011), as dietas preparadas são isocalóricas, contendo as seguintes quantidades calóricas (por 100 g): 452 kJ para HPS; 456 kJ para EPS; e 469 kJ para LPS. HPS apresenta a maior quantidade de proteína das três dietas (7,1%) e a menor quantidade de carboidratos (17,9%), EPS apresenta 4,3% de proteínas e 21,2% de carboidratos, e LPS é composta por apenas 2,5% de proteínas e 24,6% de carboidratos. Todas as três dietas contêm 73% de umidade e menos de 1% de lipídios. O conteúdo de vitaminas e minerais não foi avaliado nas três dietas e sua influência potencial nos resultados experimentais, se existir diferenças entre elas, é desconhecida. Depois de preparadas, as alíquotas de 10 mL das dietas foram pipetadas para tubos, deixando esfriar até ficarem sólidas.

A obtenção das larvas a se desenvolverem nos três tipos de dietas foi realizada separadamente para cada população (SER, CAJ, POA e SAN). Inicialmente, foram executados cruzamentos utilizando 50 casais adultos virgens, que foram colocados, por um período de 24 horas, em câmaras embrionárias contendo placa de petri com ágar a 0,5% enriquecido com sacarose e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) para indução da oviposição. Posteriormente a esse período, e a cada 24 horas, as placas de petri contendo ovos foram substituídas por novas placas. As placas retiradas foram devidamente identificadas por população e data, e armazenadas por mais 24 horas nas mesmas condições das câmaras embrionárias. Após o período de 42 horas da retirada das placas das câmaras embrionárias, as larvas no segundo estádio de desenvolvimento (2º instar) foram retiradas com o auxílio de pinças histológicas e transferidas para tubos contendo uma das três dietas, num total de 40 larvas por tubo. O processo de retirada das larvas foi repetido por alguns dias, até todos os 10 tubos (réplicas) de cada dieta das quatro populações terem sido completados.

4.2.4.2 Análises de caracteres bionômicos

A viabilidade foi medida das seguintes maneiras: 1) Viabilidade larva-pupa (VLP) – medida pela proporção de larvas transferidas que atingiram o estágio de pupa; e, 2) Viabilidade larva-adulto (VLA) – medida como a proporção de larvas transferidas que atingiram o estágio adulto. Estas medidas foram realizadas para cada tubo, e o valor para cada população, em cada dieta, foi obtido a partir da média entre as réplicas.

O tempo de desenvolvimento foi medido das seguintes formas: 1) Tempo de desenvolvimento larva-pupa (TLP), calculado pelo tempo médio decorrido (em horas) entre a transferência das larvas de 2º instar para os tubos e o aparecimento de cada pupa; e 2) – Tempo de desenvolvimento larva-adulto (TLA), calculado pelo tempo médio decorrido (em horas) entre a transferência das larvas de 2º instar para os tubos e a emergência de cada mosca adulta. As observações foram realizadas três vezes ao dia, a cada 4/5 horas, após a emergência das primeiras pupas e dos primeiros adultos, respectivamente.

Todas as moscas adultas que emergiram foram identificadas com relação ao sexo, horário de retirada, réplica, dieta e população, e foram congeladas a -20°C para a realização das posteriores análises metabólicas.

4.2.4.3 Análises metabólicas

As análises metabólicas foram realizadas de acordo com o descrito por Matzkin et al. (2011). Dez grupos de cinco moscas com zero dia após a emergência, foram colocados em uma estufa a 50 °C durante 72 horas para secagem. Os grupos foram formados para cada combinação entre sexo, réplica, população e dieta. Após o período de secagem, o peso seco foi determinado utilizando um micro balança Shimadzu, modelo AY 220, e esses dados também foram analisados como um caráter de história de vida (peso seco - PS), obtendo o valor do peso de cada mosca como sendo a média do valor do peso obtido pelo grupo de moscas para o número de moscas em cada grupo (neste caso, 5 moscas). Após a pesagem, cada grupo de moscas secas foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato (25 mM KHPO₄, pH 7,4), macerado e centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm. Um total de 800 µL do sobrenadante do homogeneizado foi coletado e congelado para posterior análise colorimétrica dos conteúdos metabólicos.

As análises colorimétricas foram realizadas para a quantificação dos conteúdos de triglicerídeos (TG), glicogênio (GL) e proteínas solúveis totais (PT), da seguinte maneira:

1) TG: O conteúdo de triglicerídeos em cada amostra foi determinado utilizando o kit Triglicérides (Gold Analisa REF. 459, MS 80022230062). As amostras (40 µL do homogeneizado + 200 µL do reagente do kit) foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. A absorbância foi medida a 500 nm.

2) GL: O conteúdo de glicogênio foi medido utilizando o kit de enzimas Glicose Oxidase e Peroxidase (Sigma-Aldrich P7119), adicionando 0,1 unidade de Amiloglicosidase (Sigma-Aldrich) por mL de tampão de reação. As amostras (40 µL do homogeneizado + 200 µL de tampão de reação) foram incubadas a 37°C durante 3 horas. A absorbância foi medida a 445 nm.

3) PT: A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada utilizando o ensaio do Ácido Bicinconílico (Sigma B9643), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância para quantificação de proteínas foi medida a 562 nm.

Todas as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro Spectramax 190 da Molecular Devices. Cada conjunto metabólico de cada amostra foi mensurado em duplicata e as médias foram normalizadas utilizando o peso seco.

4.2.4.4 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas no ambiente R (CORE TEAM, 2021). Os efeitos sobre os caracteres de história de vida e metabólicos foram inferidas através de modelos lineares mistos univariado e multivariado, com sexo, população e dieta considerados como efeitos fixo, e também foi testada a interação entre população e dieta. A MANOVA foi aplicada para inferir os múltiplos efeitos sob os caracteres, o Traço de Pillai foi o escolhido para validação em duas rodadas de comparação entre populações xerofíticas e não xerofíticas de diferentes regiões. A visualização do teste da MANOVA foi realizada utilizando o pacote *ggboxplot* e os *heatmaps* foram construídos com o auxílio do pacote *pheatmap* (KOLDE, 2013).

4.2.5 RESULTADOS

4.2.5.1 Populações não associadas a vegetação xerofítica

A análise exploratória, utilizando o *heatmap*, da variação dos caracteres bionômicos e dos conteúdos metabólicos após desenvolvimento das larvas em três dietas com diferentes composições, HPS, EPS e LPS, resultou na separação em dois agrupamentos para as populações coletadas em matas sem a presença de vegetação xerofítica, um contendo as amostras do Sul (POA), outro para as do Sudeste (CAJ) do Brasil (Figura 1). Posteriormente, os modelos apresentaram um aumento na viabilidade em POA ($p = 0,0173$; $R_2 = 0,106$; $F = 3,212$; $GL = 106$; Tabela 3 - Material Complementar), sem diferença para outros preditores. O tempo de desenvolvimento aumentou com a menor concentração de proteínas na dieta ($p = 0,000292$; $R_2 = 0,7163$; $F = 48,12$; $GL = 106$; Tabela 4 - Material Complementar), tanto para a população de POA, quanto considerando a interação entre estes dois fatores (LPS e POA, $p = 0,037723$). Com relação aos conjuntos metabólicos, POA apresentou aumento significativo do conteúdo de triglicerídeos ($p = 2,47^{-09}$; $R_2 = 0,7348$; $F = 52,71$; $GL = 106$; Tabela 5 - Material Complementar), com interação positiva entre HPS e POA, e entre LPS e POA (proporcionalmente maior) indicando um aumento deste metabólito. Para o conteúdo de glicogênio, LPS produziu uma redução em comparação a EPS ($p = 0,00583$; $R_2 = 0,1822$; $F = 5,158$; $GL = 106$; Tabela 6 - Material Complementar), enquanto que HPS diminuiu significativamente o conteúdo deste metabólito na interação entre HPS e POA ($p = 0,00538$). Conteúdo de proteínas foi aumentado na presença da dieta LPS ($p = 3,12^{-12}$; $R_2 = 0,4233$; $F = 14,7$; $GL = 106$; Tabela 7 - Material

Complementar) e em POA ($p = 0,00104$), tendo EPS como referência, e por outro lado, um decréscimo na interação entre LPS e POA. Assim, estes resultados evidenciaram os efeitos tanto das dietas quanto das populações sobre os caracteres analisados, mas principalmente das populações, o que foi também observado na análise multivariada (Pillay trace_{5,102} = 0,83, $p = < 2,2^{-16}$; veja Tabela 1, Figura 2).

Figura 1 Heatmaps da variação dos caracteres bionômicos e dos conteúdos metabólicos das populações coletadas em matas sem a presença de vegetação xerofítica do Sul (POA) e do Sudeste (CAJ) do Brasil, submetidas a três dietas HPS, EPS e LPS.

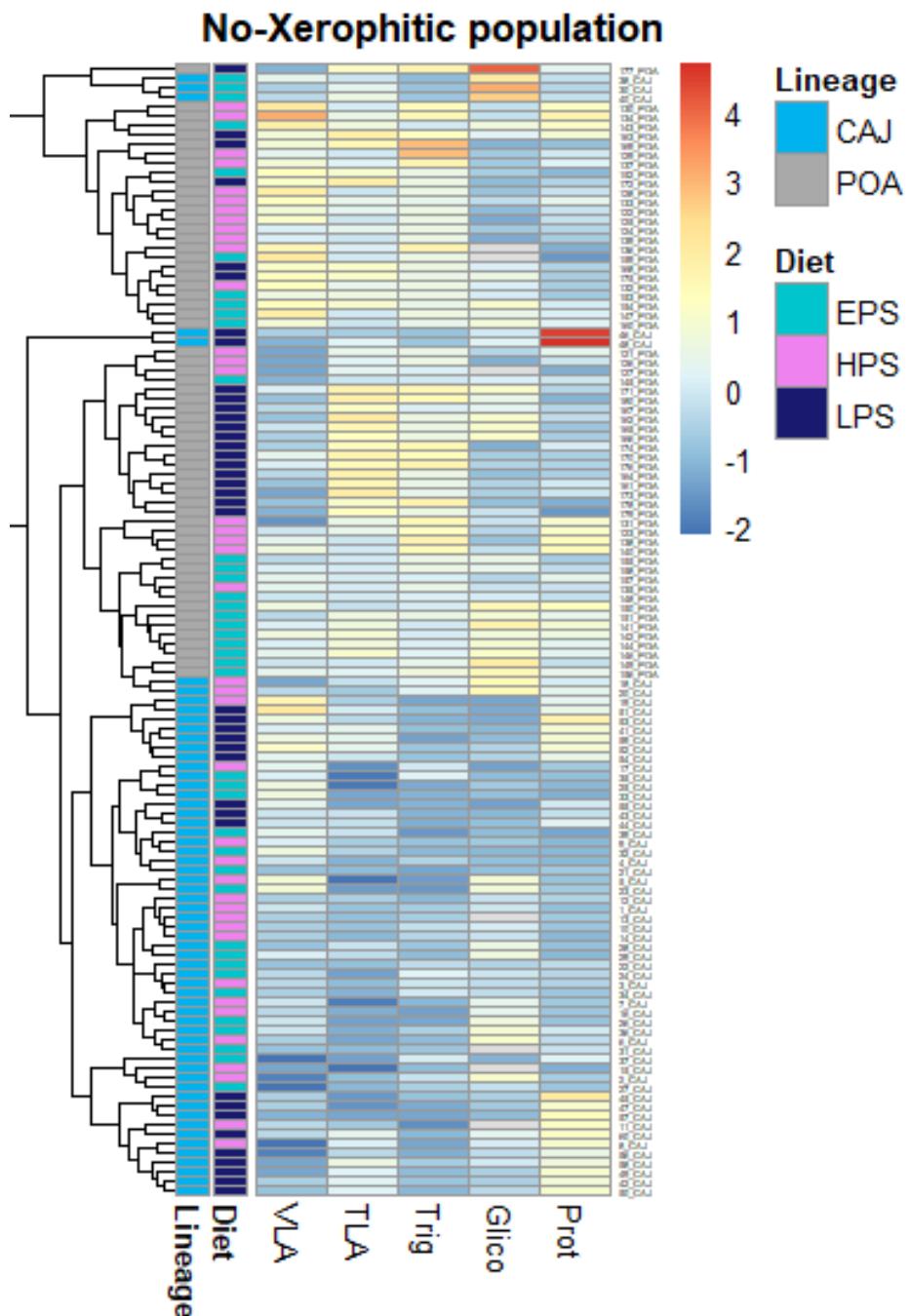
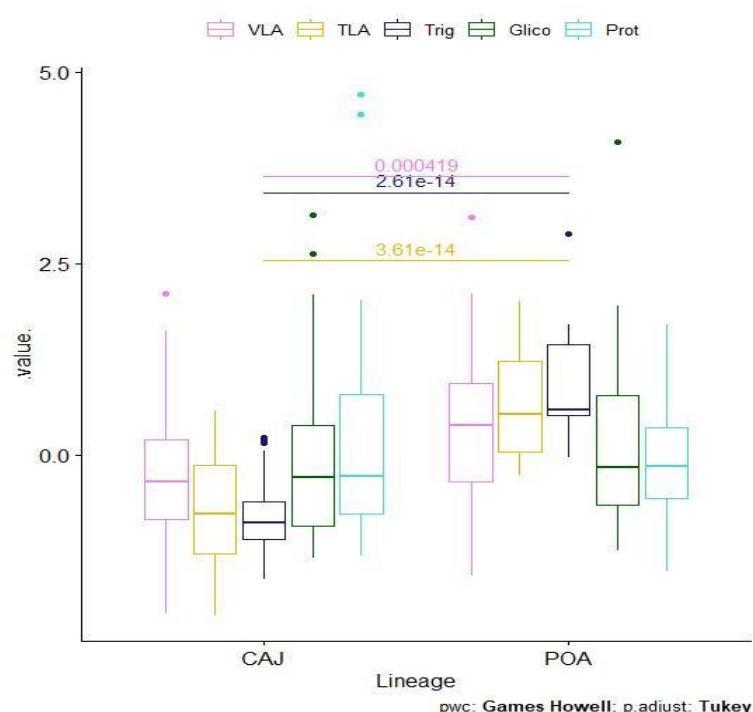


Tabela 1 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de *D. mercatorum* não associadas a vegetação xerofítica, CAJ e POA. POP = população; GL = graus de liberdade; F = estatística de teste; Num GL = graus de liberdade para o numerador; Dem GL = graus de liberdade para o denominador comum; Pr (>F) = valor de p. *** = p<0,001.

	GL	PILLAI	F APROX	Num GL	Den GL	Pr (>F)
SEXO	1	0,07222	1.588	5	106	0,1701
DIETA	2	0,73706	12.022	10	206	$2,780^{-16}$ ***
POP	1	0,83545	103.574	5	102	$<2,2^{-16}$ ***
DIETA:POP	2	0,67730	10.548	10	206	$2,342^{-14}$ ***

Figura 2 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de *D. mercatorum* não associadas a vegetação xerofítica, CAJ e POA. VLA= Viabilidade larva-adulto; TLA = Tempo de desenvolvimento larva adulto; Trig = Triglicerídeos; Glico= Glicogênio; Prot= Proteína.



4.2.5.2 Populações associadas a vegetação xerofítica

A comparação entre as populações SAN (sul) e SER (sudeste), utilizando *heatmap*, realizada com base na variação dos caracteres bionômicos e metabólicos, mostrou a presença de dois agrupamentos (Figura 3). Para os caracteres de histórico de vida, foi observado um decréscimo na viabilidade (VLA; Tabela 8 - Material Complementar) para os machos, sem diferenças com relação aos efeitos das dietas e populações. Já o tempo de desenvolvimento (TLA) mostrou diferenças significativas entre as dietas e entre as populações. LPS aumentou o tempo de desenvolvimento em relação a EPS ($p = 7,71^{-15}$; $R_2 = 0,7858$; $F = 71,93$; $GL = 110$; Tabela 9 - Material Complementar), enquanto que a população SER apresentou uma diminuição neste tempo ($p = 4,92^{-13}$). Inclusive, a interação entre LPS e SER mostrou um decréscimo em comparação com SAN ($p = 0,0004$). Com relação aos conteúdos metabólicos, um padrão similar ao das populações sem vegetação xerofítica foi observado, com o conteúdo de triglicerídeos sendo aumentado com a dieta LPS ($p = 0,00355$; $R_2 = 0,7522$; $F = 59,69$; $GL = 110$; Tabela 10 - Material Complementar), e tanto a população SER ($p = 1,51^{-15}$) quanto a interação entre LPS e SER ($p = 0,0186$) apresentaram decréscimo significativo para este metabólito. Para glicogênio, tanto HPS ($p = 0,0003$; $R_2 = 0,4843$; $F = 19,15$; $GL = 110$; Tabela 11 - Material Complementar) quanto LPS ($p = 2,6^{-07}$) produziram aumento no conteúdo deste metabólito, tendo sido proporcionalmente maior o aumento para a segunda dieta. Quando consideradas as populações como efeitos, foi identificada uma diminuição para SER ($p = 0,003$) e também na interação entre HPS e SER ($p = 0,002$). Por outro lado, para o conteúdo de proteínas, as dietas tiveram um efeito significativo, sendo que a dieta com maior proporção de proteína (HPS) produziu uma diminuição no seu conteúdo, e a de menor proporção (LPS) aumentou o conteúdo deste metabólito. A população de SER apresentou um conteúdo maior comparado ao de SAN, em ambos os testes, HPS e LPS mostraram interação com SER, aumentando e diminuindo os conteúdos, respectivamente (Tabela 12 - Material Complementar). Assim, novamente estes resultados indicam que as dietas e as populações apresentam efeitos sobre os caracteres avaliados, com as populações sendo o principal fator das diferenças observadas, corroborado pela análise multivariada (Pillai trace_{5,106} = 0,88, $p = 2,2^{-16}$; veja Tabela 2, Figura 4).

Figura 3 Heatmaps da variação dos caracteres bionômicos e dos conteúdos metabólicos das populações coletadas em matas com a presença de vegetação xerofítica do Sul (SAN) e do Sudeste (SER) do Brasil, submetidas a três dietas HPS, EPS e LPS.

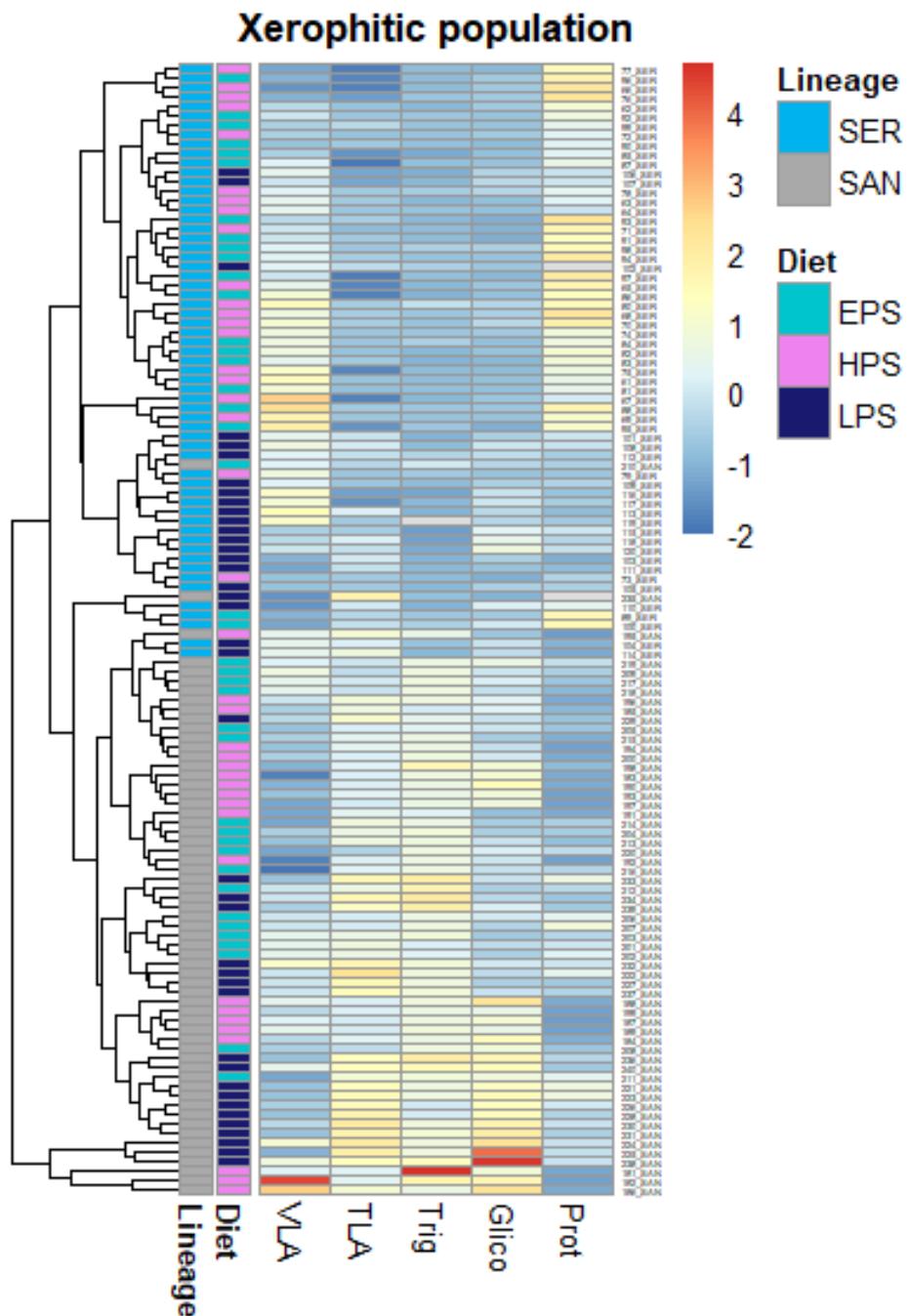
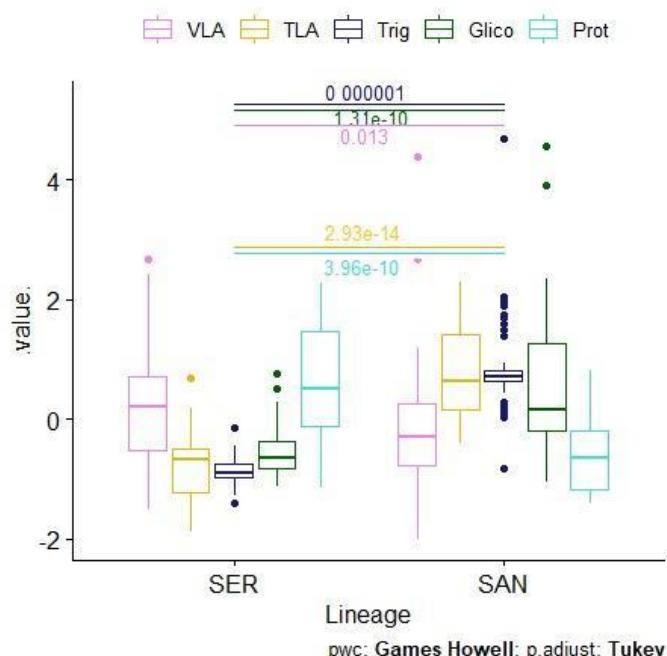


Tabela 2 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de *D. mercatorum* associadas a vegetação xerofítica, SER e SAN. POP = população; GL = graus de liberdade; F = estatística de teste; Num GL = graus de liberdade para o numerador; Dem GL = graus de liberdade para o denominador comum; Pr (>F) = valor de p. ***p<0,001.

	GL	PILLAI	F APROX	NUM GL	DEM GL	Pr (>F)
SEXO	1	0,09187	2,145	5	106	0,06571
DIETA	2	0,76969	13,388	10	214	<2,2 ⁻¹⁶ ***
POP	1	0,88573	164,322	5	106	<2,2 ⁻¹⁶ ***
DIETA:POP	2	0,61690	9,545	10	214	4,284 ⁻¹³ ***

Figura 4 Análise multivariada (MANOVA) Traço de Pillai. Comparação entre as duas populações de *D. mercatorum* associadas a vegetação xerofítica, SAN e SER. VLA= Viabilidade larva-adulto; TLA = Tempo de desenvolvimento larva adulto; Trig = Triglicerideos; Glico= Glicogênio; Prot= Proteína.



4.2.6 DISCUSSÃO

Drosophila mercatorum é encontrada tanto em ambientes naturais com vegetações abertas quanto fechadas, com ou sem associação a vegetação xerofítica (SENE et al., 1981; VILELA et al., 1983), Ruiz e colaboradores (2000), ao realizarem um estudo com a espécie *Drosophila serido*, utilizaram diferentes meios para coleta, entre eles os caules em decomposição de algumas espécies de cactos, e observaram a presença de 35 indivíduos da espécie *Drosophila mercatorum*, dos quais 34 foram coletados na espécie *Opuntia monocantha*, e 1 na espécie *Cereus hildmannianus* na localidade de Guaritas-RS. Outros autores registraram a presença de *D. mercatorum* em abundância em regiões de vegetação xerofítica (MATEUS et al., 2006; 2018; De TONI et al., 2007).

A avaliação dos caracteres bionômicos e dos conteúdos metabólicos dos indivíduos de *D. mercatorum* mostrou existir, além do efeito dietético, um efeito populacional entre os indivíduos provenientes de áreas sem a presença de vegetação xerofítica das regiões Sul e Sudeste. Essas diferenças podem ser reflexo dos ambientes aos quais as populações estão adaptadas, em conjunto com os fatores estressantes das dietas testadas sobre cada população. A temperatura pode ser um fator estressante para os organismos, e muitos estudos têm demonstrado que a temperatura pode apresentar um efeito direto sobre as características morfológicas dos organismos, alterando a maneira com que os indivíduos respondem aos recursos alimentares naturais (LEE; ROH 2010; LEE et al., 2015; LEMOINE; SHANTZ 2016; MALZAHN et al., 2016; BOERSMA et al., 2016; KUTZ et al., 2019; KIM et al., 2020; CHAKRABORTY et al., 2020).

Kutz e colaboradores (2019) realizaram um estudo sobre como a temperatura afeta a maneira da espécie *D. melanogaster* responder a dietas. Eles utilizaram uma matriz de 36 dietas, que variaram nas concentrações de proteínas e carboidratos, em duas temperaturas diferentes: 25°C (temperatura média da população) e 28°C (temperatura mais alta projetada sob as mudanças climáticas na região). Foram avaliados o tempo de desenvolvimento, a viabilidade e duas estimativas do tamanho do corpo - tamanho da asa e do fêmur. Eles observaram que o aumento da temperatura acelerou o desenvolvimento em dietas de com baixa proteína e carboidrato, e que a temperatura modificou a resposta à nutrição para todas as características examinadas. Em nossos resultados observamos um aumento na viabilidade de POA em relação a CAJ, em todos os preditores testados, o que pode indicar ser o efeito da temperatura sobre a viabilidade, visto que a região Sul apresenta temperatura média mais baixa. Também, foi notado que o tempo de desenvolvimento aumentou em relação à dieta de LPS em POA. A dieta de LPS possui uma maior concentração de carboidratos, indicando que o aumento de carboidratos pode ser um fator estressante para o desenvolvimento larval em POA. Logo,

podemos dizer que nossos resultados se assemelham aos encontrados por Kutz e colaboradores (2019), uma vez que a temperatura e a dieta podem estar diferenciando os caracteres de história de vida das duas populações, o que poderia explicar a diminuição na viabilidade de CAJ e o aumento do tempo de desenvolvimento em POA em LPS. Resultado semelhante de aumento do tempo de desenvolvimento foi encontrado para a espécie *D. melanogaster* em outros estudos (MATZKIN et al., 2011; NAZARIO-YEPIZ; LACLETTE; MARKOW, 2017).

Para os conteúdos metabólicos, observamos, em comparação com a população de CAJ, um aumento significativo de triglicerídeos em POA nas dietas de HPS e LPS, apresentando maiores valores em LPS. Segundo Matzkin et al., (2011), dietas com maiores quantidades de proteína e menores quantidade de açúcares estão associadas a redução dos níveis de triglycerídeos. Entretanto, nossos resultados mostram que a população de POA também apresentou aumento de triglycerídeos em dietas com relação proteína:açúcar maior (HPS). Assim, podemos também fazer referência a quantidade desse metabólito com a temperatura no qual a população está adaptada, visto que os triglycerídeos estão envolvidos no armazenamento de energia a longo prazo, dessa maneira, o aumento desse metabólito capacita as espécies de *Drosophila* a suportarem o jejum, temperaturas baixas e o processo de diapausa (OHTSU et al. 1992; CHIPPINDALE et al. 1996; OHTSU et al. 1998; HARSHMAN et al. 1999; MICHAUD; DENLINGER 2007; NELSON; COX 2014).

A quantidade de Glicogênio diminui na dieta de LPS quando comparada a dieta de EPS em ambas as populações. Já em HPS, o nível foi menor em POA ao compararmos as populações. Segundo Tomalsky et al., (2001) o glicogênio serve como reserva de glicose, a qual é utilizada em diferentes pontos do ciclo de vida de insetos holometábolos. Desse modo, o glicogênio apresenta papel importante na metamorfose em *Drosophila*, assim como na resistência à dessecção, pois também é reserva de água em suas ligações (GRAVES et al., 1992; DJAWDAN et al., 1998; ROACH et al., 2012; GÁLIKOVÁ et al., 2015; FERNÁNDEZ-ELÍAS et al., 2015; MATSUDA et al., 2015; YAMADA et al., 2018, 2019). Quando em excesso, esse metabólito pode ser convertido em triglycerídeo, o que poderia explicar o baixo valor encontrado na dieta de LPS nas duas populações, e em HPS na população de POA. Aqui, podemos inferir que o aumento de glicogênio em CAJ pode estar ligado com as condições ambientais características dessa população.

Diетas ricas em proteínas podem elevar ao máximo a fecundidade em insetos (LIHOREAU et al., 2016; MALOD et al., 2017) e apressar o desenvolvimento (DUSSUTOUR; SIMPSON 2012; REIS et al. 2016). Segundo Yurkevych et al., (2020) as dietas com altas proporções de proteínas encurtam a vida da espécie *Drosophila melanogaster*, e esses indivíduos apresentam adaptação

fisiológica a dieta com maior concentração de proteínas, com a diminuição no consumo de alimentos, e uma conversão dos aminoácidos para compensar a falta de carboidratos e o acúmulo de metabólitos. Em relação às proteínas solúveis totais em nossos resultados, foi possível verificar um aumento da quantidade do metabólito na dieta de LPS, ao compararmos as dietas. Entretanto, verificamos que a população de POA apresentou diminuição, e por sua vez, ocorreu um aumento em CAJ, indicando que a população do Sudeste pode estar mais adaptada a recursos alimentares naturais mais proteicos.

Com relação às populações associadas a vegetação xerofítica, os machos de ambas (SER e SAN) apresentaram menor viabilidade, para todas as dietas analisadas. Matzkin et al. (2011), observaram que a espécie *D. melanogaster* apresentou maior viabilidade de fêmeas, com uma taxa de sobrevivência entre 80 a 96%, sem relação com as dietas testadas. Aqui, também observamos que a diminuição na viabilidade dos machos não parece ser um efeito dietético ou populacional (Figura 5 - Material Complementar).

Segundo Reis (2016), em dietas ricas em proteína e ricas em carboidratos, o tempo de desenvolvimento mais rápido indica que a dieta possui grande quantidade de recursos disponíveis para o crescimento dos indivíduos. Por outro lado, desenvolvimento mais lento seria um reflexo da escassez desses recursos. Para *D. mercatorum*, o tempo de desenvolvimento dos indivíduos apresentou aumento na dieta de EPS em relação às outras dietas. A dieta de EPS apresenta quantidades intermediárias de proteínas e carboidratos em sua composição entre as três dietas analisadas. Matzkin et al., (2011) relataram que a espécie *Drosophila mojavensis*, espécie cactólila do grupo *repleta*, foi extremamente afetada por dietas que apresentaram maior quantidade de açúcar, como a dieta de LPS e EPS, resultando em nenhuma emergência de adultos em LPS, e pouquíssima em EPS, o que indicou que altas quantidades de açúcar são tóxicas para essa espécie. Parece haver uma relação entre os resultados para a dieta de EPS, entretanto observamos que em SER a interação com a dieta de LPS diminuiu o tempo de desenvolvimento, o que não corrobora com o que foi visto por Matzkin et al., 2011.

A quantidade de triglicerídeos aumentou na dieta de LPS, porém apresentando diminuição deste metabólito em SER. Esse aumento na quantidade em LPS na população da região Sul, e diminuição para a da região Sudeste, também foi verificado para as populações que não apresentam associação à vegetação xerofítica. Assim, novamente podemos inferir a ligação desse metabólito com a temperatura a qual a espécie estava naturalmente adaptada.

Para o conteúdo de glicogênio observamos que as dietas de HPS e LPS apresentaram aumento desse metabólito, o qual foi maior em LPS. Esse resultado foi o contrário do que analisamos para as populações não associadas a vegetação xerofítica. Entretanto, a população de SER apresentou menor valor de glicogênio para a dieta de HPS, indicando um efeito dietético, pois a dieta de HPS apresenta menor concentração de carboidrato, resultando na diminuição detectada.

Ao compararmos as dietas, observamos que a dieta de LPS resultou em um aumento das proteínas solúveis totais em comparação com EPS e HPS, tendo esta última sido a menor entre as três dietas. A maior quantidade de proteína resultante da dieta de LPS pode ter relação com o glicogênio ser a principal fonte de energia utilizada pelas moscas, e em excesso ser transformado em triglicerídeos, como citado anteriormente, já que observamos que os valores de triglicerídeos também apresentaram aumento na dieta de LPS. A população de SER apresentou maior quantidade de proteína em comparação com a população de SAN e maior quantidade do metabólito foi registrado para a dieta mais proteica (HPS), sugerindo que a população de SER esteja mais adaptada a recursos naturais mais proteicos, diferenciando as duas populações e corroborando com os resultados de CAJ, também da região sudeste.

Em um estudo feito anteriormente utilizando a dieta banana:ágar (Capítulo 1 desta dissertação - artigo submetido e em revisão por pares) foi observado que as populações do sudeste de *D. mercatorum* apresentaram valores significativamente menores que as populações da região sul, para todos os parâmetros analisados, com exceção da viabilidade. Resultados preliminares (Figura 5, 6, 7 e 8 - Material Complementar) indicaram uma possível ocorrência de variação populacional entre as regiões Sul e Sudeste, que pode ser confirmada ao realizarmos as análises estatísticas no presente capítulo.

A plasticidade fenotípica pode solucionar desafios causados pela heterogeneidade ambiental em diferentes cenários (DEBAT; DAVID, 2001; FUCSO; MINELLI, 2010). Fanara e Werenkraut (2016), ao analisarem o efeito das condições de densidade, tipo de competição e hospedeiro em duas espécies cactófilas, *D. buzzatii* e *D. koepferae*, sobre características do tamanho do corpo dos indivíduos, observaram que todas as características apresentaram variação significativa, para cada um dos fatores em ambas as espécies. Observaram que cada característica foi diferente dentro e entre as espécies, dependendo do fator ambiental analisado, indicando que as características do corpo respondem a heterogeneidade ambiental, sendo uma resposta à plasticidade.

A diferença encontrada por nós parece ser resultado da ação da plasticidade fenotípica moldada pela variação ambiental e climática vivenciada pelas populações em ambiente natural, uma vez que aquelas mais próximas geograficamente apresentaram pouca variação entre si. A variação ambiental é resultado de mudanças na temperatura, umidade, fotoperíodo, e disponibilidade de alimento (REGAN; 2020). A temperatura, unida à variação ambiental, tornaram-se o fator estressante que contribuiu para a diferença encontrada entre essas populações, por meio da plasticidade fenotípica.

4.2.7 CONCLUSÃO:

Nossos resultados indicam diferença entre os caracteres avaliados entre as populações da espécie Neotropical *Drosophila mercatorum*, que compartilham o mesmo tipo de vegetação, provenientes de regiões geográficas distintas, podem ser reflexo dos ambientes aos quais as populações estão adaptadas, em conjunto com os fatores estressantes das dietas testadas sobre cada população, além da diversidade genética intrapopulacional. Nossos resultados estão em consonância com outros trabalhos que sugerem que a influência da variação da latitude na diversificação populacional como fator estressante e ressaltamos a importância de compreender o efeito das pressões climáticas em caracteres metabólicos e morfológicos em populações naturais.

4.2.8 REFERÊNCIAS:

- AGGARWAL, D.D., RYBNIKOV, S., SAPIELKIN, S. *et al.* Seasonal changes in recombination characteristics in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Heredity** 2021
- ATKINSON, W.; SHORROCKS, B., Breeding site specificity in the domestic species of *Drosophila*, **Oecologia**, v. 29, n. 3, p. 223–232, 1977.
- BÄCHLI, G., 2021. Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch>. Acessado em: 06/08/2021
- BARKER, J, S, F; STARMER, W, T; FOGLEMAN, J, C. Genotype-specific habitat selection for oviposition sites in the cactophilic species *Drosophila buzzatii*, **Heredity**, v. 72, n. 4, p. 384–395, 1994.
- BECHER, P. G et al. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. **Behavioural ecology**, v. 26, n. 4, p. 822-828, 2012.
- BEGON, M. Yeasts and *Drosophila*. In: ASHBURNER, M., CARSON, H.L., THOMPSON JR. **The Genetics and Biology of Drosophila**, Academic Press, Nova York v. 3B, p. 345-384, 1982.

- BIZZO, N. M. V. & SENE, F. M. Studies on the natural populations of *Drosophila* from Peruibe (SP), Brazil (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, n. 3, p. 539-544, 1982.
- BOERSMA, M.; MATHEW, K. A.; NIEHOFF, B.; SCHOO, K. L.; FRANCO-SANTOS, R. M.; MEUNIER, C. L.. Temperature driven changes in the diet preference of omnivorous copepods: no more meat when it's hot?. **Ecology Letters**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 45-53, 16 nov. 2015.
- BOUZAS, S. *et al.* Specialization and performance trade-offs across hosts in cactophilic *Drosophila* species. **Ecological Entomology**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 877-888, 20 fev. 2021.
- BRAKE, I., BÄCHLI, G. (2008). **Drosophilidae (Diptera). World catalogue of insects.** v. 9. Apollo Books, Stenstrup, 412 pp
- BRNCIC, D. 1983. Ecology of flower breeding *Drosophila*. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L. The ecology of *Drosophila* Breeding sites. Harold L. Lyon Arboretum Lecture 2. University of Hawaii, 1971.
- CHAKRABORTY, A.; SGRÒ, C. M.; MIRTH, C. K.. Does local adaptation along a latitudinal cline shape plastic responses to combined thermal and nutritional stress? **Evolution**, [S.L.], v. 74, n. 9, p. 2073-2087.
- CHIPPINDALE, A. K.; CHU, T. J. F.; ROSE, M. R.. Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 753-766, abr. 1996.
- CORE TEAM, R. (2021). R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing.
- DEARING, M.D., FOLEY, W.J., MCLEAN, S. The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 36, p. 169–189, 2005.
- DEBAT, V; DAVID, P. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. **Trends In Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 555-561, out. 2001.
- DJAWDAN, M.; CHIPPINDALE, A. K.; ROSE, M. R.; BRADLEY, T. J. Metabolic Reserves and Evolved Stress Resistance in *Drosophila melanogaster*. **Physiological Zoology**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 584-594, set. 1998. University of Chicago Press.
- DUSSUTOUR, A.; SIMPSON, S. J. Ant workers die young and colonies collapse when fed a high-protein diet. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 279, n. 1737, p. 2402-2408, 22 fev. 2012.
- FANARA, J. J; WERENKRAUT, V. Phenotypic plasticity in *Drosophila* cactophilic species: the effect of competition, density, and breeding sites. **Insect Science**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 675-683, 31 maio 2016.
- FERNÁNDEZ-ELÍAS, V. E.; ORTEGA, J. F.; NELSON, Rachael K.; MORA-RODRIGUEZ, Ricardo. Relationship between muscle water and glycogen recovery after prolonged exercise in the heat in humans. **European Journal Of Applied Physiology**, [S.L.], v. 115, n. 9, p. 1919-1926, 25 abr. 2015.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN C. Introdução ao estudo da Drosófila. **Cultus**, v. 1, p. 3- 66, 1949

FUSCO, G.; MINELLI, A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 365, n. 1540, p. 547-556, 27 fev. 2010.

GÁLIKOVÁ, M; DIESNER, M; KLEPSATEL, P; HEHLERT, P; XU, Y; BICKMEYER, Iris; PREDEL, R; KÜHNLEIN, R. P. Energy Homeostasis Control in *Drosophila* Adipokinetic Hormone Mutants. **Genetics**, [S.L.], v. 201, n. 2, p. 665-683, 14 ago. 2015.

GILBERT, D. G. Dispersal of yeasts and bactéria by *Drosophila* in a temperature forest. **Oecologia**, v. 46, p. 135-137, 1980.

GRAVES, J. L., et al. Desiccation, Flight, Glycogen, and Postponed Senescence in *Drosophila melanogaster*. **Physiological Zoology**, vol. 65, no. 2, 1992, p. 268–286. *JSTOR*, www.jstor.org/stable/30158253.

HARSHMAN, L. G.; HOFFMANN, A. A.; CLARK, A. G. Selection for starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: Physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses. In: **Journal of Evolutionary Biology.**; Vol. 12, No. 2. p. 370-379, 1999.

HEED, W. B., Ecology and Genetics of Sonoran Desert *Drosophila*, **Proceedings in Life Sciences**, p. 109–126, 1978.

HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. **Oxford: University Press**, 284 p. 1991

HUTCHINSON, G. E. Concluding Remarks. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [S.L.], v. 22, p. 415-427, 1 jan. 1957.

JACOBS, H. T; GEORGE, J; KEMPPAINEN, Esko. Regulation of growth in *Drosophila melanogaster*: the roles of mitochondrial metabolism. **The Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 167, n. 3, p. 267-277, 11 jan. 2020.

JAENIKE, J.; GRIMALDI, D. A.; SLUDER, A. E.; et al. Alpha-Amanitin Tolerance in Mycophagous *Drosophila*. **Science**, v. 221, n. 4606, p. 165–167, 1983.

KIM, K. E.; JANG, T; LEE, K. P.; Combined effects of temperature and macronutrient balance on life-history traits in *Drosophila melanogaster*: implications for life-history trade-offs and fundamental niche. **Oecologia**, [S.L.], v. 193, n. 2, p. 299-309, 16 maio 2020.

KOLDE, R. (2013). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 0.7.7. <http://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

KOLSS, M. et al; Life-history consequences of adaptation to larval nutritional stress in *Drosophila*. **Evolution**, v. 63, n. 9, p. 2389-401, 2009.

KUTZ, T. C.; SGRÒ, C. M.; MIRTH, C. K. Interacting with change: diet mediates how larvae respond to their thermal environment. **Functional Ecology**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 1940-1951, 5 ago. 2019.

LEE, K. P; JANG, T; RAVZANAADII, N; RHO, Myung Suk. Macronutrient Balance Modulates the Temperature-Size Rule in an Ectotherm. **The American Naturalist**, [S.L.], v. 186, n. 2, p. 212-222, ago. 2015. University of Chicago Press.

LEE, K. P.; ROH, C. Temperature-by-nutrient interactions affecting growth rate in an insect ectotherm. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, [S.L.], v. 136, n. 2, p. 151-163, 5 jul. 2010.

LEMOINE, N. P.; SHANTZ, A. A. Increased temperature causes protein limitation by reducing the efficiency of nitrogen digestion in the ectothermic herbivore *Spodoptera exigua*. **Physiological Entomology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 143-151, 9 abr. 2016.

LIHOREAU, M. et al. *Drosophila* females trade off good nutrition with high-quality oviposition sites when choosing foods. **The Journal of experimental biology**, v. 219, n. 16, p. 2514-24, 2016.

MACHADO, L. P. B. *et al*, Esterase Profile in *Drosophila mercatorum pararepleta* (Diptera; Drosophilidae), a Non-cactophilic Species of the *repleta* Group: Development Patterns and Aspects of Genetic Variability, **Zoological studies**, v. 56, p. e21, 2017.

MALOD, K. et al. Effects of macronutrient intake on the lifespan and fecundity of the marula fruit fly, *Ceratitis cosyra* (Tephritidae): Extreme lifespan in a host specialist. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 22, p. 9808-9817, 22 Oct. 2017

MALZAHN, A M.; DOERFLER, Dijana; BOERSMA, Maarten. Junk food gets healthier when it's warm. **Limnology And Oceanography**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 1677-1685, 24 jun. 2016.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Review: Reproductive Ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 22, p. 747-759, 2008.

MARKOW, T. A.. Ecological and Evolutionary Genomics: the cactophilic *Drosophila* model system. **Journal Of Heredity**, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 1-3, 23 nov. 2018.

MATEUS, R. P.; BUSCHINI, M. L. T.; SENE, F. M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetation of the upper Parana-Paraguay river basin. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 719-729, maio 2006.

MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; SIMÃO-SILVA, D. P. *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) survey in an "island" of xerophytic vegetation within the atlantic forest biome, with emphasis on the *repleta* species group. **Studies On Neotropical Fauna And Environment**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 152-161, 20 fev. 2018.

MATSUDA, H; YAMADA, T; YOSHIDA, M; NISHIMURA, T. Flies without Trehalose. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 290, n. 2, p. 1244-1255, jan. 2015.

MATZKIN, L. M. *et al*, Dietary Protein and Sugar Differentially Affect Development and Metabolic Pools in Ecologically Diverse *Drosophila*, **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1127–1133, 2011.

MICHAUD, M. R; DENLINGER, D. L. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. **Journal Of Comparative Physiology B**, [S.L.], v. 177, n. 7, p. 753-763, 19 jun. 2007

MORAIS, P. B. *et al*, Yeast communities of the cactos *Pilosocereus arrabidae* as resources for larval and adult stages of *Drosophila serido*, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, n. 4, p. 313–317, 1994.

NAZARIO-YEPIZ, N.O, LOUSTALOT-LACLETTE, M.R; CARPINTEYRO-PONC, J; ABREU-GOODGER, C; MARKOW, T.A. Transcriptional responses of ecologically diverse *Drosophila* species to larval diets differing in relative sugar and protein ratios. **PLoS ONE** 12(8): e0183007, ago. 2017

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. xxx, 1298 p. ISBN 9788582710722.

OHTSU, T; KIMURA, M. T.; HORI, S. H. Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. **Journal Of Comparative Physiology B**, [S.L.], v. 162, n. 3, p. 203-208, abr. 1992.

OHTSU, T; KIMURA, M. T.; KATAGIRI, C. How *Drosophila* species acquire cold tolerance. Qualitative changes of phospholipids. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 252, n. 3, p. 608-611, 15 mar. 1998.

ORMEROD, K.G. *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. **Fly**, v. 11, n. 3, p. 153-170, 2017

PATTERSON, J. T. & M. R. WHEELER. Description of new species of the subgenera *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. **University of Texas Publications**, n 4213, p. 67–109, 1942.

PEREIRA, M. A. Q. R; R, VILELA C; M, SENE F, Notes on breeding and feeding sites of some species of the Repleta group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), **Ciência e cultura**, v. 35, n. 9, p. 1313–1319, 1983.

REGAN, J.C. *et al*, Dietary restriction and insulin-like signalling pathways as adaptive plasticity: A synthesis and re-evaluation, **Functional Ecology**, v. 34, n. 1, p. 107–128, 2019.

REIS, T. Effects of Synthetic Diets Enriched in Specific Nutrients on *Drosophila* Development, Body Fat, and Lifespan. **PloS one** v. 11, n. 1, e0146758, 2016.

ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; HURLEY, T. D.; TAGLIABRACCI, V. S.. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 441, n. 3, p. 763-787, 16 jan. 2012.

RUIZ, A.; CANSIAN, A. M.; KUHN, G. C. S.; ALVES, M. A. R.; SENE, F. M. The *Drosophila serido* Speciation Puzzle: Putting New Pieces Together. **Genetica**, [S.L.], v. 108, n. 3, p. 217-227, 2000.

SENE F. M, PEREIRA M.A.Q.R, VILELA C.R, BIZZO N.M.V. Influence of different ways to set baits for collection of *Drosophila* flies in three natural environments. ***Drosophila Information Service***.v.56, p. 118–121, 1981.

SEVENSTER, J. G. E VAN ALPHEN. Aggregation and coexistence: experiments with fungal breeding *Drosophila*. ***Journal of Animal Ecology***, London, v. 65, p. 308-324,1996.

SILVA-SOARES, N. F.; NOGUEIRA-ALVES, A.; BELDADE, P.; MIRTH, Christen Kerry. Adaptation to new nutritional environments: larval performance, foraging decisions, and adult oviposition choices in *Drosophila suzukii*. ***Bmc Ecology***, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-13, 7 jun. 2017.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; CORIO, C.; *et al.* Host use and developmental instability in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *D. antonietae*. ***Entomologia Experimentalis et Applicata***, v. 137, n. 2, p. 165–175, 2010.

STARMER W T, GILBERT D G. A quick and reliable method for sterilizing eggs. ***Drosophila Information Service***, v. 58, p. 170–171, 1982.

STARMER, W. T., *et al.* Adaptations of *Drosophila* and yeasts: their interactions with the volatile 2-propanol in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system. ***Australian Journal of Biological Sciences***, v. 39, p. 69–77, 1986.

STERMER. W. T. FOGLEMAN, J. C. Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. ***Journal of Chemical Ecology***, v. 12, p. 1037-1055, 1986.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology, and geofragy of *Drosophil*. In:King, R. C. (Ed.) ***Handbook of Genetics, volume 3***. Plenum, New York, NY, p. 421-469,1975

TIDON, R, Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations, ***Biological Journal of the Linnean Society***, v. 87, n. 2, p. 233–247, 2006.

TOLMASKY, D.S., RABOSSI, A., QUESADA-ALLUE, L.A. Glycogenin from *Drosophila melanogaster* and *Ceratitis capitata*. ***Drosophila Information Service***. 84: p, 17-20. 2001

TONI, D. C. de; GOTTSCHALK, M. S.; CORDEIRO, J; HOFMANN, P. P. R.; VALENTE, V. L. S.. Study of the Drosophilidae (Diptera) communities on Atlantic Forest islands of Santa Catarina State, Brazil. ***Neotropical Entomology***, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 356-375, jun. 2007.

TORRES, F. R; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp. (Diptera) in two woodlands in the State of São Paulo, Brazil. ***Iheringia. Série Zoologia***, [S.L.], v. 96, n. 4, p. 437-444, 30 dez. 2006.

TOSI, D. *et al.* On a new cave-dwelling species of bat-guano-breeding *Drosophila* closely related to *D. repleta* Wollaston (Diptera, Drosophilidae). ***Revista Brasileira de Genética***, v. 13, p. 19-31, 1990.

VACEK, D. C. *et al*, Feeding and oviposition preferences of *Drosophila buzzatii* for microbial species isolated from its natural environment, **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 24, n. 2, p. 175–187, 1985.

VALADÃO, H. *et al*, Fruit-breeding drosophilids (Diptera) in the Neotropics: playing the field and specialising in generalism? **Ecological Entomology**, v. 44, n. 6, p. 721–737, 2019

VILELA C. R.; PEREIRA M. A. Q. R.; SENE F. M. Preliminary data on geographical distribution of *Drosophila* species within morpho-climatic domains in Brazil. II. The *repleta* group. **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 66–70, 1983.

VILELA, C. R. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). III. Rotting infructescences of *Philodendron bipinnatifidum* (Araceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 45, p. 339–344. 2001.

WASSERMAN M. (1992). Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: Krimbas CB, Powell JR, editors. ***Drosophila* inversion polymorphism**. Boca Raton: CRC Press. p. 455–552.

YAMADA, T; HABARA, O; KUBO, H; NISHIMURA, T. Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila* [published correction appears in Development. 2018Apr 9;145(7):]. **Development.**;145(6):dev158865. 2018

YAMADA, T; HABARA, O; YOSHIKI, Y; *et al*. The role of glycogen in development and adult fitness in *Drosophila*. **Development.**;146(8):dev176149. 2019

YURKEVYCH, I.S.; GRAY, L.J.; GOSPODARYOV, D.V. *et al*. Development of fly tolerance to consuming a high-protein diet requires physiological, metabolic and transcriptional changes. **Biogerontology**, v. 21, p. 619–636, 2020.

MATERIAL COMPLEMENTAR

Populações não xerofíticas

Tabela 3 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Viabilidade Larva-adulto (VLA) nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,106$; $F = 3,212$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.359140	0.227718	-1.577	0.1177	
SexM	0.213344	0.174504	1.223	0.2242	
DietHPS	-0.077497	0.308964	-0.251	0.8024	
DietLPS	0.002161	0.296336	0.007	0.9942	
LineagePOA	0.725654	0.300076	2.418	0.0173	*
DietHPS:LineagePOA	0.185626	0.433735	0.428	0.6695	
DietLPS:LineagePOA	-0.614862	0.419033	-1.467	0.1452	

Tabela 4 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Tempo de desenvolvimento Larva-adulto (TLA) nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,7163$; $F = 48,12$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.90511	0.13123	-6.897	3.99^{-10}	***
SexM	0.06988	0.10057	0.695	0.488627	
DietHPS	-0.08664	0.17805	-0.487	0.627546	
DietLPS	0.63989	0.17078	3.747	0.000292	***
LineagePOA	125.789	0.17293	7.274	6.30^{-11}	***
DietHPS:LineagePOA	-0.09301	0.24996	-0.372	0.710561	
DietLPS:LineagePOA	0.50814	0.24149	2.104	0.037723	*

Tabela 5 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de triglicerídeos nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,7348$; $F = 52,71$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.84414	0.12631	-6.683	1.12^{-09}	***
SexM	0.18784	0.09679	1.941	0.0550	
DietHPS	0.12314	0.17137	0.719	0.4740	
DietLPS	-0.23649	0.16437	-1.439	0.1532	
LineagePOA	108.491	0.16644	6.518	2.47^{-09}	***
DietHPS:LineagePOA	0.61285	0.24058	2.547	0.0123	*
DietLPS:LineagePOA	0.95575	0.23242	4.112	7.76^{-05}	***

Tabela 6 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Glicogênio nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,1822$; $F = 5,158$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	0.25133	0.22265	1.129	0.26153	
SexM	-0.09126	0.17062	-0.535	0.59387	
DietHPS	-0.10212	0.30209	-0.338	0.73601	
DietLPS	-0.81538	0.28975	-2.814	0.00583	**
LineagePOA	0.51929	0.29340	1.770	0.07962	
DietHPS:LineagePOA	-120.526	0.42409	-2.842	0.00538	**
DietLPS:LineagePOA	0.24058	0.40972	0.587	0.55833	

Tabela 7 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Proteína nas populações não associadas a vegetação xerofítica do Sul (POA) e Sudeste (CAJ). $R^2 = 0,4233$; $F = 14,7$; $GL = 106$. *** $p < 0,001$.

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.59081	0.18578	-3.180	0.00193	**
SexM	-0.14739	0.14236	-1.035	0.30288	
DietHPS	0.18236	0.25206	0.723	0.47098	
DietLPS	190.400	0.24176	7.876	3.12^{-12}	***
LineagePOA	0.82578	0.24481	3.373	0.00104	**
DietHPS:LineagePOA	0.01467	0.35385	0.041	0.96700	
DietLPS:LineagePOA	-252.467	0.34185	-7.385	3.63^{-11}	***

Populações associadas a vegetação xerofítica

Tabela 8 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Viabilidade Larva-adulto (VLA) nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0.04733$; $F = 1,96$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.07532	0.23541	-0.320	0.7496
SexM	-0.40703	0.17992	-2.262	0.0256
DietHPS	0.15992	0.30765	0.520	0.6042
DietLPS	0.05403	0.31170	0.173	0.8627
LineageSER	0.44286	0.30765	1.440	0.1528
DietHPS:LineageSER	0.06151	0.43508	0.141	0.8878
DietLPS:LineageSER	-0.15518	0.44392	-0.350	0.7273

Tabela 9 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Tempo de desenvolvimento Larva-adulto (TLA) nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,7858$; $F = 71,93$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	0.26801	0.11161	2.401	0.018013	*
SexM	0.02446	0.08531	0.287	0.774832	
DietHPS	0.07951	0.14586	0.545	0.586778	
DietLPS	132.969	0.14779	8.997	7.71 ⁻¹⁵	***
LineageSER	-119.596	0.14586	-8.199	4.92 ⁻¹³	***
DietHPS:LineageSER	-0.15214	0.20628	-0.738	0.462366	
DietLPS:LineageSER	-0.75852	0.21047	-3.604	0.000472	***

Tabela 10 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de triglicerídeos nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,7522$; $F = 59,69$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	0.59971	0.12099	4.957	2.62e-06	***
SexM	0.14362	0.09247	1.553	0.1233	
DietHPS	0.25699	0.15811	1.625	0.1069	
DietLPS	0.34107	0.16020	2.129	0.0355	*
LineageSER	-147.175	0.15811	-9.308	1.51e-15	***
DietHPS:LineageSER	-0.24385	0.22361	-1.091	0.2779	
DietLPS:LineageSER	-0.54512	0.22815	-2.389	0.0186	*

Tabela 11 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Glicogênio nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,4843$; $F = 19,15$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.03279	0.17474	-0.188	0.851477	
SexM	-0.15496	0.13355	-1.160	0.248453	
DietHPS	0.84033	0.22836	3.680	0.000363	***
DietLPS	127.047	0.23137	5.491	2.6e-07	***
LineageSER	-0.67418	0.22836	-2.952	0.003856	**
DietHPS:LineageSER	-0.75921	0.32295	-2.351	0.020510	*
DietLPS:LineageSER	-0.63586	0.32951	-1.930	0.056217	.

Tabela 12 Parâmetros e valores estimados utilizando o Modelo Linear Misto para os dados de Proteína nas populações associadas a vegetação xerofítica do Sul (SAN) e Sudeste (SER). $R^2 = 0,6896$; $F = 43,95$; $GL = 110$. *** $p < 0,001$

	Estimate Std.	Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.28489	0.13516	-2.108	0.0373	*
SexM	-0.08712	0.10330	-0.843	0.4009	
DietHPS	-0.88738	0.17664	-5.024	1.97e-06	***
DietLPS	0.17042	0.17897	0.952	0.3431	
LineageSER	152.027	0.17664	8.607	5.95e-14	***
DietHPS:LineageSER	0.63729	0.24980	2.551	0.0121	*
DietLPS:LineageSER	-181.761	0.25488	-7.131	1.11e-10	***

Figura 5 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) das viabilidades (%) larva-pupa (VLP) e larva-adulto (VLA) das populações de Porto Alegre/RS (POA), Santiago/RS (SAN), Cajuru/SP (CAJ) e Serrana/SP (SER) de *Drosophila mercatorum*, submetidas as três dietas HPS, EPS e LPS.

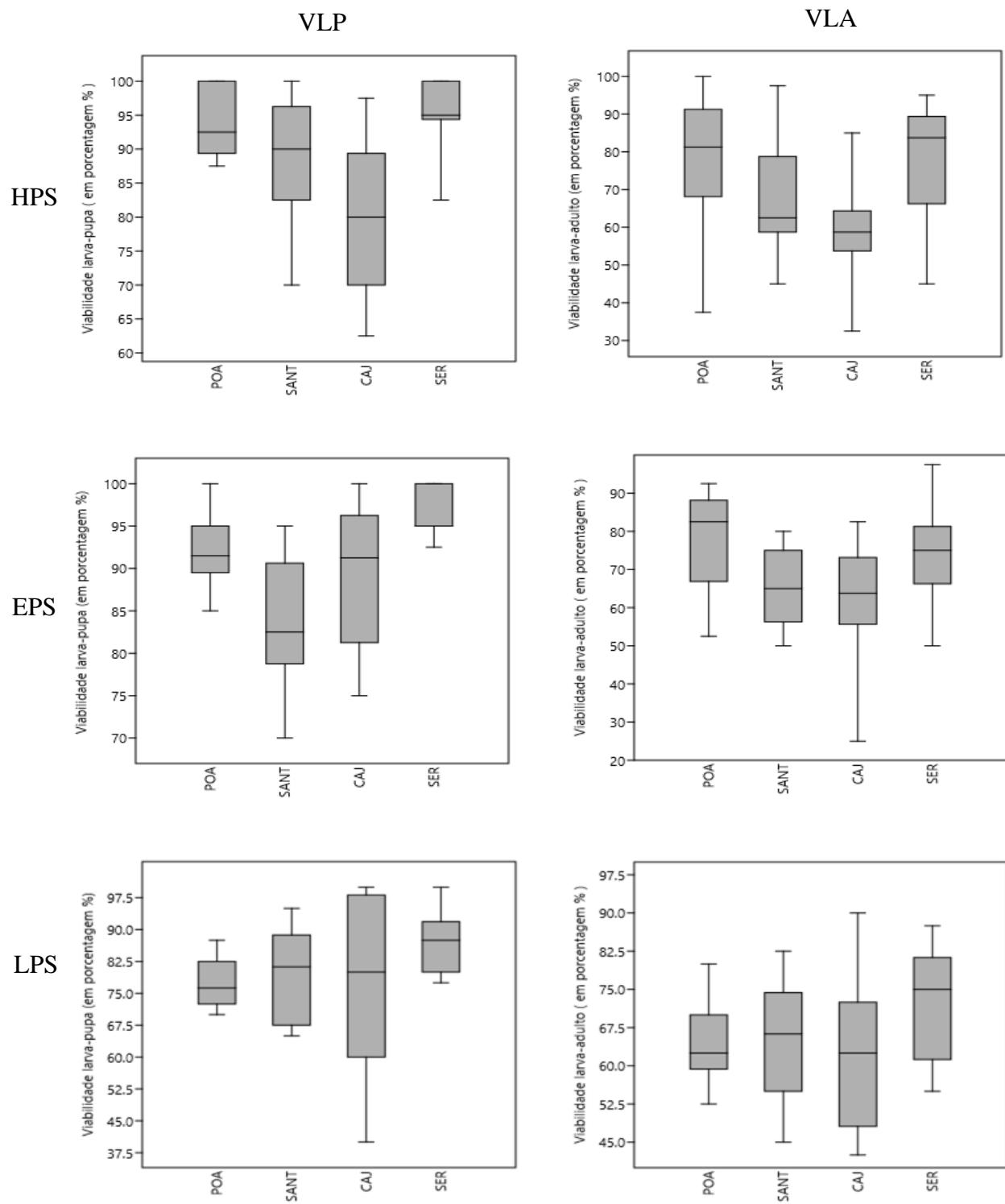


Figura 6 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) dos tempos de desenvolvimento (em horas) larva-pupa (TLP) e larva-adulto (TLA) das populações de Porto Alegre/RS (POA), Santiago/RS (SAN), Cajuru/SP (CAJ) e Serrana/SP (SER) de *Drosophila mercatorum*, submetidas às dietas HPS, EPS e LPS.

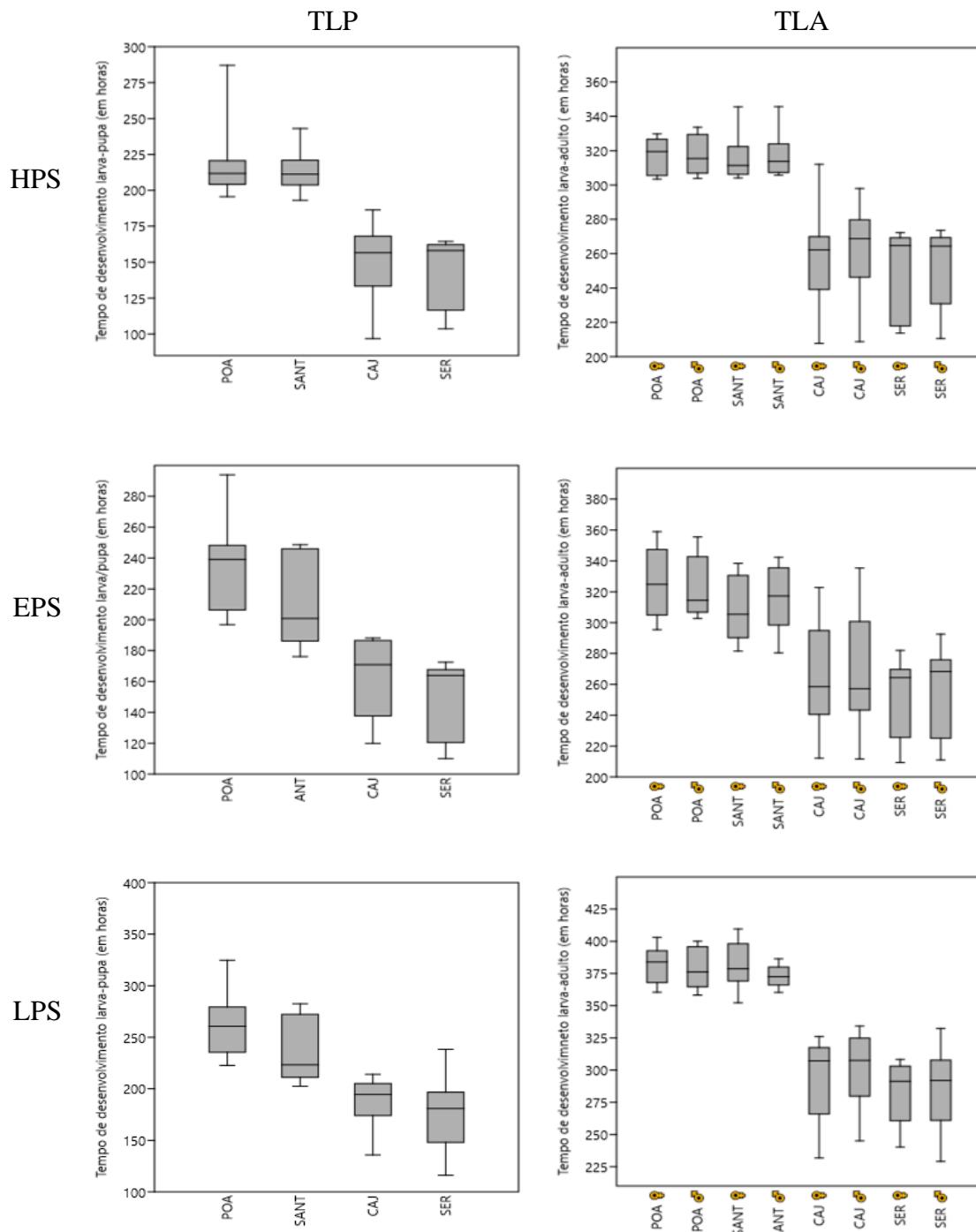


Figura 7 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) do peso seco (μg) de machos e fêmeas das populações Porto Alegre/RS (POA), Santiago/RS (SANT), Cajuru/SP (CAJ) e Serrana/SP (SER) de *Drosophila mercatorum* nas três dietas, HPS, EPS e LPS.

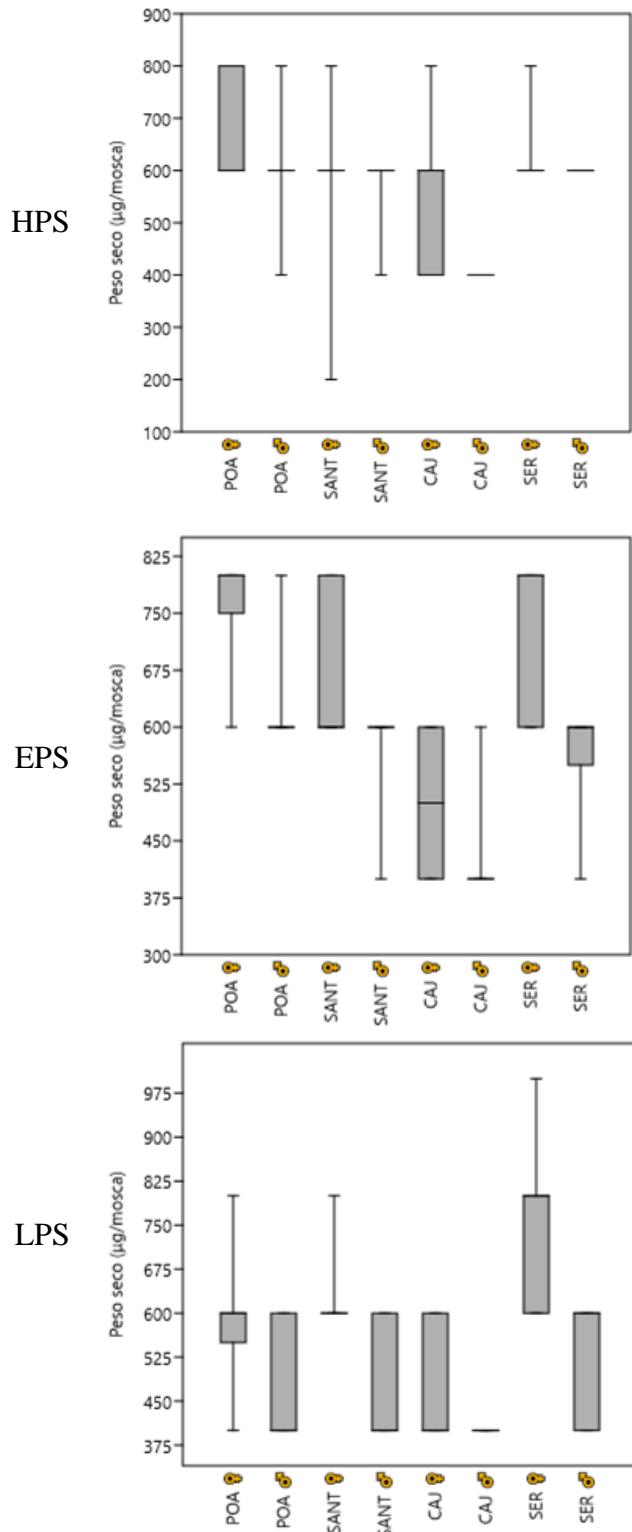
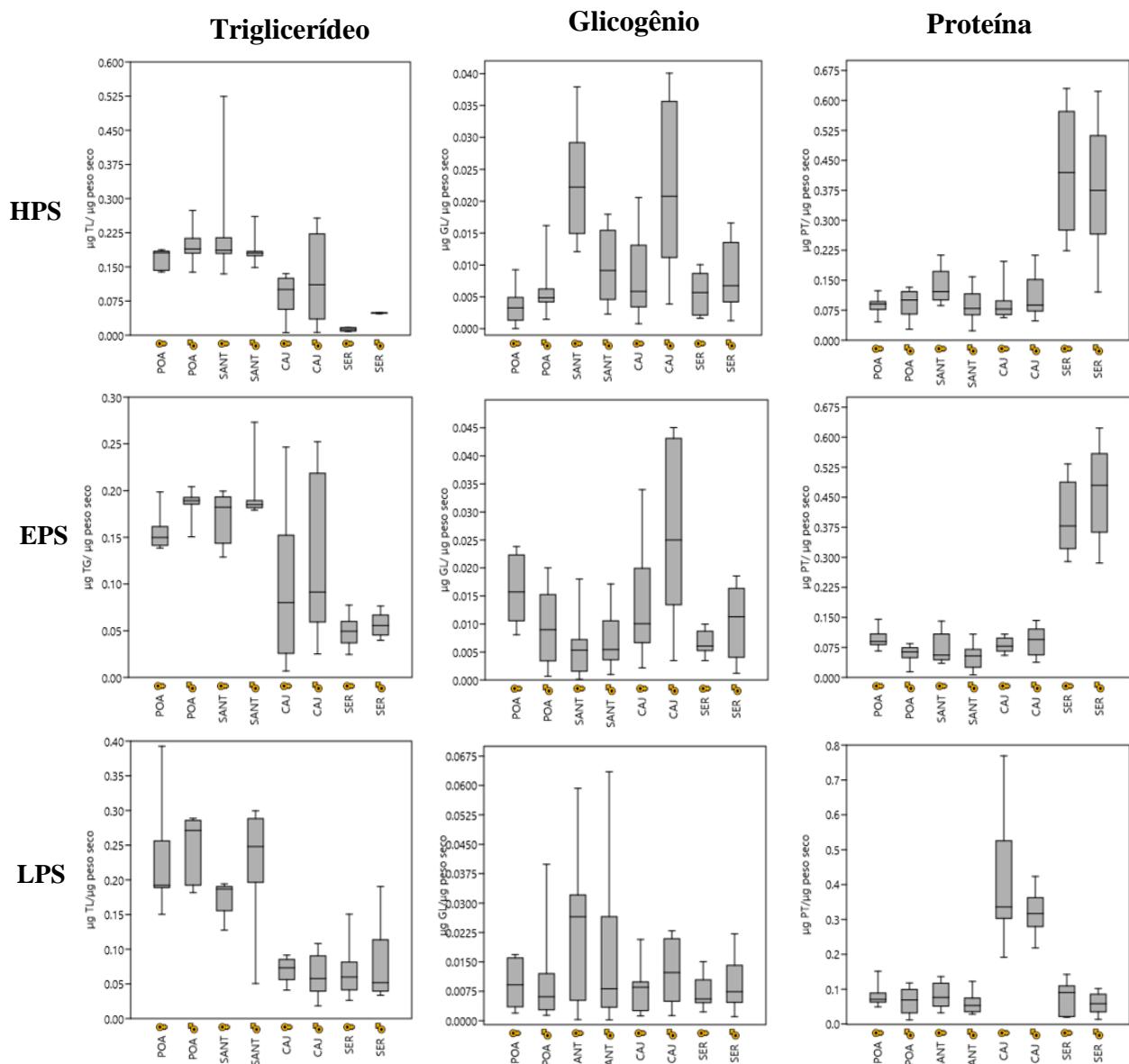


Figura 8 Boxplot (medianas, quartis e valores mínimos e máximos) das concentrações de triglicerídeos, glicogênio e proteínas totais, por peso seco ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), de machos e fêmeas de populações (POA, SAN, CAJ e SER) de *Drosophila mercatorum*.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram avaliados os caracteres de história de vida e metabólicos na espécie *Drosophila mercatorum*, submetida a quatro diferentes tipos de dieta, para investigar as bases ecológicas e genéticas da variabilidade na utilização de diferentes recursos alimentares. Foi observada a ocorrência de uma diversificação entre as linhagens coletadas na região Sul comparadas com as da região Sudeste, tanto na dieta padrão de banana (banana:ágar), quanto nas dietas que diferiram na concentração Proteína:Carboidrato.

Desta forma, pretendeu-se entender e responder quais fatores poderiam ser os responsáveis por essas diferenças, e foi concluído que as diferenças podem estar relacionadas com o ambiente natural que esses indivíduos estão adaptados, por meio da plasticidade fenotípica. As localidades da região Sul tendem a apresentar menor temperatura e menores períodos de seca em relação às da região Sudeste. Para a dieta padrão de banana, observamos que as populações do Sudeste de *Drosophila mercatorum* apresentaram valores significativamente menores que as populações da região Sul para todos os parâmetros analisados, com exceção da viabilidade. O mesmo padrão regional foi observado para dietas de diferentes quantidades de proteína:carboidrato, o que sugere a influência da variação da latitude na diversificação populacional como fator estressante nesta espécie.

Assim, este trabalho foi importante e colaborou com o estudo da biologia das espécies do gênero *Drosophila* na região Neotropical, e ressaltou a importância de compreender o efeito das pressões climáticas em caracteres metabólicos e morfológicos em populações naturais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINSON, W.; SHORROCKS, B., Breeding site specificity in the domestic species of *Drosophila*, **Oecologia**, v. 29, n. 3, p. 223–232, 1977.
- BÄCHLI, G., 2021. Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch>. Acesso em: 06/08/2021.
- BAHDER, B. W., BAHDER, L. D., HAUSER, M., BEERS, E., WALSH, D. B. Relative abundance and phenology of *Drosophila* Fallén, 1815 (Diptera: Drosophilidae) species in south-central Washington State. **The Pan-Pacific Entomologist**. v. 92, n. 2, p. 92-99, 2016.
- BARKER, J S F; STARMER, William T; FOGLEMAN, James C, Genotype-specific habitat selection for oviposition sites in the cactophilic species *Drosophila buzzatii*, **Heredity**, v. 72, n. 4, p. 384–395, 1994.
- BECHER, P. G et al. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. **Behavioural ecology**, v. 26, n. 4, p. 822-828, 2012.
- BEGON, M. Yeasts and *Drosophila*. In: ASHBURNER, M., CARSON, H.L., THOMPSON JR. **The Genetics and Biology of Drosophila**, Academic Press, Nova York v. 3B, p. 345-384, 1982.
- BHARUCHA, Kamal N, The Epicurean Fly: Using *Drosophila Melanogaster* to Study Metabolism, **Pediatric Research**, v. 65, n. 2, p. 132–137, 2009.
- BIRSE, R.T. et al, High-Fat-Diet-Induced Obesity and Heart Dysfunction Are Regulated by the TOR Pathway in *Drosophila*, **Cell Metabolism**, v. 12, n. 5, p. 533–544, 2010.
- BODEN, G; SALEHI, S, Why Does Obesity Increase the Risk for Cardiovascular Disease?, **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 32, p. 5678–5683, 2013.
- BRNCIC, D. 1983. Ecology of flower breeding *Drosophila*. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L. & THOMPSON, J. JR., eds. **The Genetics and Biology of Drosophila**. New York, Academic Press. v. 3d, p.332-382.
- CANAVOSO, L. E et al, Fat Metabolism in Insects, **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 23–46, 2001.
- CARSON, H. L. The ecology of *Drosophila* Breeding sites. Harold L. Lyon Arboretum Lecture 2. University of Hawaii, 1971.
- CARVALHO, T. L- Estrutura populacional de espécies de drosophilídeos antófilas com diferentes graus de especialização. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia (Biodiversidade Animal)) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2019.
- CHINTAPALLI, V. R; WANG, J; DOW, J.A.T, Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease, **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 715–720, 2007.
- COSTA, R; TAMASCIA, M. L.; SANCHES, A.; MOREIRA, R. P.; CUNHA, T. S.; NOGUEIRA, M. D.; MARCONDES, F. K. Tactile stimulation of adult rats modulates hormonal responses,

depression-like behaviors, and memory impairment induced by chronic mild stress: role of angiotensin II. **Behavioural brain research**, p. 112-250, 2019.

CROSS, W. F. *et al*, Interactions between temperature and nutrients across levels of ecological organization, **Global Change Biology**, v. 21, n. 3, p. 1025–1040, 2014.

DEARING, M.D., FOLEY, W.J., MCLEAN, S. The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 36, p. 169–189, 2005.

DIANGELO, Justin R.; BIRNBAUM, Morris J., Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in *Drosophila melanogaster*, **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 24, p. 6341–6352, 2009.

DOBZHANSKY T, PAVAN C.. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**, v. 4, p. 7-72, 1943

FONTAINE, S; MARIOTTI, A; ABBADIE, L, The priming effect of organic matter: a question of microbial competition?, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 837–843, 2003.

GILBERT, D. G. Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. **Oecologia**, v. 46, p. 135-137, 1980.

GILLETTE, C. M. *et al*, Gene–Diet Interactions: Dietary Rescue of Metabolic Defects in spen-Depleted *Drosophila melanogaster*, **Genetics**, v. 214, n. 4, p. 961–975, 2020.

HEED, W. B., Ecology and Genetics of Sonoran Desert *Drosophila*, **Proceedings in Life Sciences**, p. 109–126, 1978.

HEINRICHSEN, E. T.; HADDAD, G.G., Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*, **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42587, 2012.

HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. **Evolutionary Genetics and Environmental Stress**. Oxford: University Press, 284 p. 1991.

JAENIKE, J., MARKOW, T. A. Comparative elemental stoichiometry of ecologically diverse *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 17, p. 115-20, 2003.

JAENIKE, J.; GRIMALDI, D. A.; SLUDER, A. E.; *et al*. Alpha-Amanitin Tolerance in Mycophagous *Drosophila*. **Science**, v. 221, n. 4606, p. 165–167, 1983.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 46–51, 2003.

KEELEY, L.L. **Physiology and biochemistry of the fat body. In Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology** (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, eds), Pergamon Press, Oxford. v. 3, p. 211–248, 1985

KOLASA, J.: LI, B. L. Removing the confounding effect of habitat specialization reveals the stabilizing contribution of diversity to species variability. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.270, p. 198-201, 2003.

KOLSS, M. et al; Life-history consequences of adaptation to larval nutritional stress in *Drosophila*. **Evolution**, v. 63, n. 9, p. 2389-401, 2009.

LAGIOU, P. *et al*, Low carbohydrate?high protein diet and mortality in a cohort of Swedish women, **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 4, p. 366–374, 2007.

MACHADO, L. P. B. *et al*, Esterase Profile in *Drosophila mercatorum pararepleta* (Diptera; Drosophilidae), a Non-cactophilic Species of the *repleta* Group: Development Patterns and Aspects of Genetic Variability, **Zoological studies**, v. 56, p. e21, 2017.

MARKOW, T. A., et al. Elemental stoichiometry of *Drosophila* and their hosts. **Functional Ecology**, v. 13, p. 78-84, 1999

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. *Drosophila* biology in the genomic age. **Genetics**. v. 177, p. 1269–1276, 2007.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Review: Reproductive Ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**, v. 22, p. 747-759, 2008.

MORAIS, P. B. *et al*, Yeast communities of the cactus *Pilosocereus arrabidae* as resources for larval and adult stages of *Drosophila serido*, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, n. 4, p. 313–317, 1994.

NOSSIL, P. Transition rates between specialization and generalization in phytophagous insects. **Evolution**, v.8, p. 1701-1706, 2002.

O'GRADY, Patrick M.; DESALLE, Rob, Phylogeny of the Genus *Drosophila*, **Genetics**, v. 209, n. 1, p. 1–25, 2018.

OGDEN, Cynthia L. et al, The Epidemiology of Obesity, **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2087–2102, 2007.

ORMEROD, K.G. *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. **Fly**, v. 11, n. 3, p. 153-170, 2017

PAPE, T.; BICKEL, D.; RUDOLF, M. (ed). **Diptera Diversity: Status, Challenges and Tools**. 1 ed, Leiden, Boston: Brill Academic Publishers, p. 459, 2009.

PATTERSON, J. T. & M. R. WHEELER. Description of new species of the subgenera *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. **University of Texas Publications**, n 4213, p. 67–109, 1942.

PEREIRA, M. A. Q. R; R, VILELA C; M, SENE F, Notes on breeding and feeding sites of some species of the Repleta group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), **Ciência e cultura**, v. 35, n. 9, p. 1313–1319, 1983.

POWELL, J. R. *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model*. New York: Oxford University Press, 1997.

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

RAMPASSO, A. S. **Substratos de desenvolvimento larval de Drosophilidae (Diptera) na reserva florestal do Instituto de Biociências da USP.** 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia (Genética)) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ROSENBLATT, A. E.; SCHMITZ, O. J., Climate Change, Nutrition, and Bottom-Up and Top-Down Food Web Processes, **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 12, p. 965–975, 2016.

RUSSO, C.A., TAKEZAKI, N., NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Molecular Biology and Evolution**. v. 12, n. 3, p. 391-404, 1995.

SENE F. M, PEREIRA M.A.Q.R, VILELA C .R, BIZZO N.M.V. Influence of different ways to set baits for collection of *Drosophila* flies in three natural environments. **Drosophila Information Service**.v.56, p. 118–121, 1981.

SEVENSTER, J. G. E VAN ALPHEN. Aggregation and coexistence: experiments with fungal breeding *Drosophila*. **Journal of Animal Ecology**, London, v. 65, p. 308-324,1996.

SIMPSON, S. J; RAUBENHEIMER, D **The Nature of Nutrition: A Unifying Framework from Animal Adaptation to Human Obesity**. Princeton University Press, 2012.

SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; CORIO, C.; *et al.* Host use and developmental instability in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *D. antonietae*.**Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, n. 2, p. 165–175, 2010.

STARMER W T, GILBERT D G. A quick and reliable method for sterilizing eggs. **Drosophila Information Service**, v. 58, p. 170–171, 1982.

STARMER, W. T., *et al.* Adaptations of *Drosophila* and yeasts: their interactions with the volatile 2-propanol in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 39, p. 69–77, 1986.

STERMER. W. T. FOGLEMAN, J. C. Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, p. 1037-1055, 1986.

TAMURA K, SUBRAMANIAN S, KUMAR S.Temporal Patterns of Fruit Fly (*Drosophila*) Evolution Revealed by Mutation Clocks. **Molecular Biology and Evolution** v. 21, n. 1, p. 36–44, 2004.

TELEMAN, A. A.; RATZENBÖCK, I.; OLDHAM, S. *Drosophila*: A Model for Understanding Obesity and Diabetic Complications. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 120, n. 04, p. 184-185, 2012.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In:King, R. C. (Ed.) **Handbook of Genetics**, volume 3. Plenum, New York, NY, p. 421-469,1975

TIDON, R, Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations, **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, n. 2, p. 233–247, 2006.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. *Drosophila*. In: BRANDÃO, C.R.F.; CANCELLO, E.M. **Invertebrados terrestres. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX**, FAPESP, São Paulo, 1999. p. 247-261.

TOSI, D. et al. On a new cave-dwelling species of bat-guano-breeding *Drosophila* closely related to *D. repleta* Wollaston (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, p. 19-31, 1990.

VACEK, D. C. et al, Feeding and oviposition preferences of *Drosophila buzzatii* for microbial species isolated from its natural environment, **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 24, n. 2, p. 175–187, 1985.

VAL, F. C.; VILELA, M. D.; MARQUES, C. R. Drosophilidae of the Neotropical Region. In ASHBURNER, M., CARSON, H. L.; THOMPSON, N. **The Genetics and Biology of Drosophila**. 3 ed. New York: Academic Press, p. 123–168, 1981.

VAN GAAL, L.F.; MERTENS, I. L.; DE BLOCK, C. E., Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease, **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875–880, 2006.

VILELA C. R.; PEREIRA M. A. Q. R.; SENE F. M. Preliminary data on geographical distribution of *Drosophila* species within morpho-climatic domains in Brazil. II. The *repleta* group. **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 66–70, 1983.

VILELA, C. R. Breeding sites of Neotropical Drosophilidae (Diptera). III. Rotting infructescences of *Philodendron bipinnatifidum* (Araceae). **Revista Brasileira de Entomologia** v. 45, p. 339-344. 2001.

WHARTON, L. T. Interespecific hybridization in the *repleta* group. **University of Texas Publications**, n. 4445, p. 175-193, 1944.

WOLF, M. J.; ROCKMAN, H. A., *Drosophila melanogaster* as a model system for the genetics of postnatal cardiac function, **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 5, n. 3, p. 117–123, 2008.