

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

BRUNA MEMARI TRAVA

MORFOMETRIA DA ASA E DO EDEAGO DE DUAS ESPÉCIES DE *Drosophila*
ENDÊMICAS DA AMÉRICA DO SUL

Guarapuava

2014

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

BRUNA MEMARI TRAVA

MORFOMETRIA DA ASA E DO EDEAGO DE DUAS ESPÉCIES DE *Drosophila*
ENDÊMICAS DA AMÉRICA DO SUL

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus.

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana de Barros Paes Machado.

Guarapuava

2014

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

T779m Trava, Bruna Memari
Morfometria da asa e do edeago de duas espécies de *Drosophila* endêmicas da América do Sul / Bruna Memari Trava. – – Guarapuava, 2014
xiv, 93 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, área de concentração Biologia Evolutiva, 2014

Orientador: Rogério Pincela Mateus
Co-orientadora: Luciana de Barros Paes Machado
Banca examinadora: Lilian Madi-Ravazzi, João Marcelo Deliberador Miranda

Bibliografia

1. Biologia evolutiva. 2. *Drosophila ornatifrons*. 3. *Drosophila maculifrons*. 4. Mata Atlântica. 5. Fragmentação de habitat. 6. Diferenciação morfológica. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia.

CDD 595.774

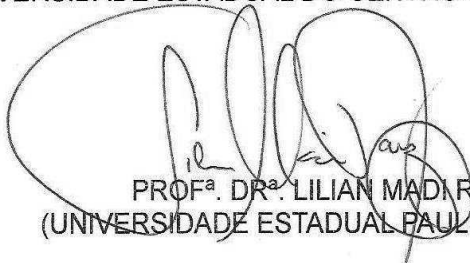
BRUNA MEMARI TRAVA

“Morfometria da asa e do edeago de duas espécies de *Drosophila* endêmicas da América do Sul”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva”, no Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Centro-Oeste, pela comissão formada pelos professores:



PROF DR ROGÉRIO PINCELA-MATEUS (ORIENTADOR)
(UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO)



PROF.ª DR.ª LILIAN MADI RAVAZZI
(UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP)



PROF DR JOÃO MARCELO DELIBERADOR MIRANDA
(UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO)

Guarapuava, 04 de Fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre se mostrar presente em minha vida e nunca me deixar desamparada!

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus, pela oportunidade e confiança, sempre auxiliando e orientando-me. Uma pessoa que me ensinou muito no decorrer desse trabalho, mostrando-me que tudo tem uma solução.

À Prof. Dra. Luciana Paes de Barros Machado, por sempre estar ao meu lado e ter me incentivado na carreira científica durante os anos acadêmicos, e também por ter me acolhido de forma educada, fraterna e profissional. Aos seus filhos: Luca que com todo seu jeito amoroso conquistou o meu coração, e Larissa que demonstrou muito afeto e carinho durante os dias de coleta.

Ao Prof. Dr. Marco Gottschalk (FUPel), por ter me ensinado com muita paciência as técnicas necessárias para parte desse projeto, e aos seus alunos de laboratório pelo apoio e compreensão. À Camila Kokudai que me auxiliou nas análises do programa R, sempre muito atenciosa.

Aos meus amigos que me ajudaram a realizar a coleta, Katiane, Samara, Carine e Lucas, obrigada pelo serviço braçal e as muitas horas de diversão nos intervalos.

Aos meus amigos de laboratório, principalmente Katiane pela ajuda nas análises de parte dessa dissertação e pela companhia, sempre me auxiliando quando necessário; à Emanuelle, pelas longas conversas, pelo incentivo constante e compreensão em todos os momentos.

Às minhas amigas de Pós-graduação, principalmente Diana e Renata, por estarem na mesma situação que a minha, e mesmo assim, conseguirmos ver um lado bom nos momentos difíceis de nossas práticas. À Cláudia e Luana por sempre disponibilizarem as poucas horas vagas para conversarmos e distrairmos. E ao Glauco, por mostrar que em alguns momentos nem sempre o que é um bicho de sete cabeça realmente seja.

Aos meus amigos pela amizade de tantos anos e que estiveram ao meu lado, que me apoiaram em todos os momentos e se demonstraram compreensíveis em momentos que tive que recusar convites ou então “sumir” por um tempo: Diana, Juliana, Lidiane, Emanuelle, Pedro, Henrique, e as amigas de São José dos Campos.

E por último, gostaria de finalizar com um agradecimento especial à minha família, aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, em todas as minhas decisões, sempre me apoiando, incentivando e acreditando em meus sonhos, à minha irmã Camila, por sempre ser rigorosa e firme, ajudando-me sempre que necessário, e a minha irmã Geórgia, que para mim sempre será a minha “irmãzinha”, por sempre arrancar de mim um lindo sorriso e vontade de ir sempre além.

Resumo

Drosophila maculifrons pertence ao grupo *guaramunu* e habita áreas de matas do Brasil, principalmente nos domínios da Mata Atlântica das regiões sul, sudeste e centro-oeste. Já *D. ornatifrons* pertence ao grupo *guarani* e tem sido encontrada em todas as regiões do Brasil, porém em pequeno número amostral. Apesar da grande quantidade de dados citogenéticos e moleculares para estas espécies (principalmente relacionados a análises filogenéticas), não existe nenhum estudo comparativo entre características morfológicas utilizando populações naturais. Assim, para quantificar a diferenciação e identificar alguns padrões populacionais de variação morfológica nestas espécies, este trabalho teve como objetivo analisar a morfologia do edeago e das asas de sete populações de *D. maculifrons* e quatro populações de *D. ornatifrons* por meio da morfometria geométrica de amostras coletadas em áreas de floresta ombrófila mista e floresta estacional semidecidual. Os resultados mostraram que houve diferenciação significativa para o tamanho e a forma das asas entre as populações para as duas espécies. As populações de *D. ornatifrons* apresentaram maior distância de Procrustes entre si do que as de *D. maculifrons*. Esta variação pode estar relacionada com aspectos ecológicos das mesmas, com *D. ornatifrons* possuindo uma maior especificidade ecológica, o que dificulta a sua ocorrência e captura, e *D. maculifrons* sendo mais generalista e sendo, portanto, mais facilmente encontrada quando comparada com *D. ornatifrons*. Para o edeago não houve diferenciação morfológica significativa para a forma em *D. ornatifrons*. Em *D. maculifrons* foram observadas diferenças significativas para a forma do edeago entre as populações amostradas, principalmente entre as localizadas no sul e sudeste do Brasil. Estas diferenças observadas para os dois marcadores morfológicos corroboram que a diferenciação nos caracteres da genitália masculina sofrida pelos indivíduos nem sempre é acompanhada por igual diferenciação na morfologia do restante do corpo. Apesar da asa e do edeago terem apresentados resultados diferentes quanto ao padrão de diferenciação interpopulacional para as duas espécies, a evolução e a divergência morfológica entre as populações de *D. ornatifrons* e de *D. maculifrons* parecem estar ligadas provavelmente a exploração diferencial de nichos por estas espécies e/ou relacionadas a diferença de temperatura entre os locais de coleta.

Palavras-chave: *Drosophila ornatifrons*, *Drosophila maculifrons*, Mata Atlântica, fragmentação de habitat, diferenciação morfológica.

Abstract

Drosophila maculifrons belongs to the *guaramunu* group and inhabits forests in Brazil. It can be found mainly in the Atlantic Forest domains of the south, southeast and central-west regions. On the other hand, *D. ornatifrons* belongs to the *guarani* group and has been collected all over Brazil, but in small number sample. In spite of the great amount of cytogenetics and molecular data for these species (mainly related to phylogenetic analyses), there is no comparative study using morphological characters in natural populations. Thus, in order to quantify and identify some patterns of morphological variation in populations of these species, this work aimed to analyze the aedeagus and wing morphology in seven populations of *D. maculifrons* and four populations of *D. ornatifrons* using geometric morphometry of samples collected in areas of ombrophylous mixed forest and semideciduous seasonal forest. Our results showed that there was statistically significant variation for wing size and shape among the populations for both species. *Drosophila ornatifrons* populations had greater Procrustes distance among each other than the distances among *D. maculifrons* populations. This variation in the wing morphology detected among populations of both species could be related to their ecological features. It is possible that *D. ornatifrons* have a narrower ecological specificity, which hinder its occurrence and capture, and *D. maculifrons* is probably more generalist and, therefore, suffer less environmental pressure when compared to *D. ornatifrons*. Regarding the aedeagus, there was no morphological differentiation for shape in *D. ornatifrons*, while in *D. maculifrons* it was detected statistically significant differences among sampled populations, mainly between those located in the south against those from the southeast regions of Brazil. The differences detected for these two morphological markers in the patterns of variation corroborated that the differentiation in the genital characters is not always followed by similar differentiation in the morphology of the rest of the body. Despite wing and aedeagus of *D. maculifrons* and *D. ornatifrons* have depicted different results in the populational analyses, the evolution and morphological divergence among populations of these species seems to be linked to differential niche exploitation and/or to differences in the temperature in the sampled localities.

Key-words: *Drosophila ornatifrons*, *Drosophila maculifrons*, Atlantic Forest, habitat fragmentation, morphological differentiation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Mapa das localidades de coleta de *D. maculifrons* no sul (estrelas) e sudeste (círculos) do Brasil. 1 - Canguçu-RS; 2 - Chapecó-SC; 3 - Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR; 4 - Salto São Francisco da Esperança, Guarapuava-PR; 5 - Matão-SP; 6 - Sertãozinho-SP; 7 - Cajuru-SP.....**39**
- Figura 2.** Imagem da asa direita da *Drosophila maculifrons* mostrando a posição dos marcos anatômicos do tipo I (2 a 10) e do tipo II (1). IVRC = região intervenal C; IVRD = região intervenal D; de acordo com Birdsall et al. (2000).....**39**
- Figura 3.** Vista lateral de edeago de *Drosophila maculifrons*, evidenciando a área do contorno da porção do órgão considerada nas análises e as denominações das suas respectivas partes.....**39**
- Figura 4.** Distribuição da forma das asas de *D. maculifrons* da região sul, principalmente Floresta Ombrófila Mista (em vermelho), e da região sudeste, Floresta Estacional Semidecidual (em azul), no espaço das Variáveis Canônicas (CV1 e CV2), com base na matriz W de componentes uniformes e escores de deformações parciais.....**40**
- Figura 5.** Distribuição das asas de *D. maculifrons* no espaço das Variáveis Canônicas (CV1 e CV2), com base na matriz W de componentes uniformes e escores de deformações parciais. Entre parênteses estão representadas as porcentagens da variância da forma para cada CV. Os gráficos inseridos abaixo do eixo X e à esquerda do eixo Y representam diferenças da forma ao longo de cada eixo indicado como vetores que mostram o deslocamento dos pontos de referência a partir da forma média.....**40**
- Figura 6.** Contorno de reconstrução da variação na forma do edeago a partir das sete populações de *Drosophila maculifrons* descritos por cada componente principal eficaz (PC). A sobreposição de linhas na primeira coluna são áreas de variação do edeago. As colunas restantes fornecem uma visualização sem sobreposição destes mesmos contornos.....**41**
- Figura 7.** Análise de agrupamento realizado pelo CLUSTER para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *Drosophila maculifrons*.....**42**

Figura 8. Análise de agrupamento realizado pelo MCLUST utilizando dez modelos (símbolos referentes as linhas no gráfico) para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *D. maculifrons*. BIC = Critério de Informação Bayesiana. Number of componentes = número de agrupamentos.....**43**

CAPÍTULO II

Figura 1. Mapa das localidades de coleta de *Drosophila ornatifrons* no sul do Brasil. 1 - Canguçu-RS; 2 - Chapecó-SC; 3 - Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR; 4 - Salto São Francisco, Guarapuava-PR.....**71**

Figura 2. Imagem da asa direita da *Drosophila ornatifrons* mostrando a posição dos marcos anatômicos do tipo I (2 a 10) e do tipo II (1). IVRC = região intervenal C; IVRD = região intervenal D; de acordo com Birdsall et al. (2000).....**71**

Figura 3. Vista lateral de edeago de *Drosophila ornatifrons*, evidenciando a área do contorno da porção do órgão considerada nas análises e as denominações das suas respectivas partes.....**71**

Figura 4. Distribuição das asas de *D. ornatifrons* no espaço das Variáveis Canônicas (CV1 e CV2) com base na matriz W de componentes uniformes e escores de deformações parciais. Entre parênteses estão representadas a porcentagens da variância da forma para cada CV. Os gráficos inseridos abaixo do Eixo X e à esquerda do Eixo Y representam diferenças da forma ao longo de cada eixo representado como vetores que indicam o deslocamento dos pontos de referência a partir da forma média.....**72**

Figura 5. Análise de agrupamento realizado pelo CLUSTER para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) das asas de *Drosophila ornatifrons*.....**73**

Figura 6. Contorno de reconstrução da variação na forma do edeago a partir das quatro populações de *Drosophila ornatifrons* descritos por cada componente principal eficazes (PC). A sobreposição de linhas na primeira coluna são áreas de variação do edeago. As colunas restantes fornecem uma visualização sem sobreposição destes mesmos contornos.....**74**

Figura 7. Análise de agrupamento realizado pelo CLUSTER para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *Drosophila ornatifrons*.....**75**

Figura 8. Análise de agrupamento realizado pelo MCLUST utilizando dez modelos (símbolos referentes as linhas no gráfico) para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *D. ornatifrons*. BIC = Critério de Informação Bayesiana. Number of componentes = número de agrupamentos.....**75**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Quantidade de asas direita e edeagos analisados de *Drosophila maculifrons*, por localidade amostrada.....**44**
- Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) para as diferenças intraespecíficas no (a) tamanho (tamanho do centróide) e (b) na forma da asa para sete populações de *Drosophila maculifrons*. * $P < 0.0001$; d.f. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios.....**44**
- Tabela 3.** Distâncias de Procrustes entre as sete populações de *Drosophila maculifrons*. CAJ= Cajuru/SP; CAN = Canguçu/RS; CHA = Chapecó/SC; MAT = Matão/SP; PMA = Parque Municipal das Araucárias-Guarapuava/PR; SER = Sertãozinho/SP; SSF = Parque Municipal São Francisco da Esperança-Guarapuava/PR. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$**44**
- Tabela 4.** Análise de Variância (ANOVA) para a forma do edeago de sete populações de *Drosophila maculifrons*. d.f. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$**45**
- Tabela 5.** Teste Post Hoc de Tukey para a forma do edeago entre pares das sete populações de *Drosophila maculifrons*. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$. Em negrito estão destacados os quatro primeiros Componentes Principais (PC), que representaram mais de 70% da variação encontrada para os edeagos.....**45**

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Quantidade de asas direita e edeagos analisados de *Drosophila ornatifrons*, por localidade amostrada.....**77**
- Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) para as diferenças intraespecíficas no (a) tamanho (tamanho do centroide) e (b) na forma da asa para quatro populações de *Drosophila ornatifrons*. * $P < 0.0001$; d.f. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios.....**77**
- Tabela 3.** Distâncias de Procrustes entre as quatro populações de *Drosophila ornatifrons*. CAN = Canguçu/RS; CHA = Chapecó/SC; SSF = Parque Municipal São Francisco da Esperança-Guarapuava/PR e PMA = Parque Municipal das Araucárias-

Guarapuava/PR. *P<0,05; **P<0,01.....	77
Tabela 4. Análise de Variância para a forma do edeago de quatro populações de <i>Drosophila ornatifrons</i> . g.l. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios.....	78
Tabela 5. Total (e porcentagens) de reclassificações das amostras dos edeagos de <i>Drosophila ornatifrons</i> dentro dos agrupamentos morfológicos formados por meio de Critérios de Inferência Bayesiana (BIC).....	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	10
2.1 GERAL:	10
2.2 ESPECÍFICOS:	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS	12
4.1. CAPÍTULO I	13
4.1.1. INTRODUÇÃO	13
4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1.3. RESULTADOS	20
4.1.4. DISCUSSÃO	23
4.1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
4.2. CAPÍTULO II	46
4.2.1. INTRODUÇÃO	46
4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.2.3. RESULTADOS	52
4.2.4. DISCUSSÃO	55
4.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. Introdução

Desde o surgimento da biologia evolutiva, a variação morfológica na natureza e a evolução do tamanho e forma de caracteres morfológicos tem sido temas centrais de investigação científica. Uma variedade de agentes não mutualmente exclusivos, tais como barreiras ambientais, fluxo gênico, processos históricos e sistemas de acasalamento, podem alterar a estrutura genética de populações (DONNELLY & TOWNSON, 2000; GERLACH & MUSOLF, 2000; TIEDEMANN et al., 2000). O entendimento de como esses fatores influenciam ao longo do tempo a dinâmica das populações é essencial para a Biologia Evolutiva. Estudos de diferenciação populacional podem ser baseados tanto em marcadores morfológicos quanto moleculares, utilizando estatísticas derivadas da genética de populações e filogeografia (AVISE, 2000).

De acordo com Monteiro e Reis (1999), a morfometria pode ser definida como o estudo estatístico das mudanças e variações no tamanho, ou também como a análise e mensuração de um componente complexo multidimensional chamado forma (MORAES, 2003). Muito usada na biologia evolutiva, pois proporciona a interpretação e comparação dos padrões de variação de caracteres quantitativos (BLACKITH & REYMENT, 1971; CAVALCANTI & LOPES, 1990). O estudo da morfometria tem interessado diferentes áreas do conhecimento por diversos motivos. Os taxinomistas utilizam para mensurar diferenças entre espécies, criando referências para comparações, os ecólogos discutem que a forma e o tamanho de um organismo devem caracterizar aspectos de sua evolução e os geneticistas se preocupam em estimar a herdabilidade de caracteres morfométricos, quantificando e separando as influências genotípicas do ambiente sob o fenótipo de uma população (PERES, et al., 1995).

Estudos com marcadores moleculares necessitam da utilização de equipamentos e reagentes que apresentam custos relativamente altos para a sua realização. Neste sentido, a utilização da técnica da morfometria é vantajosa devido ao baixo custo, necessitando apenas dos instrumentos para a digitalização de imagens, e a velocidade da obtenção de dados e o material pode ser facilmente obtido tanto de exemplares frescos quanto secos (LYRA et al., 2010). Assim, a morfometria geométrica se apresenta como uma técnica que permite, com menor custo e tempo, diferenciar espécies com um alto grau de confiança, atuando como

mais uma ferramenta de análise muito eficiente (CALLE et al., 2008).

Os marcadores morfológicos podem ser úteis no fornecimento de ideias alternativas em estudos populacionais, proporcionando uma boa avaliação de como a variação genética está distribuída entre as diferentes entidades, devido às características morfológicas estarem geralmente sob controle poligênico (FALCONER, 1989; GARNIER et al., 2005). Segundo Mackay (2004), num contexto moderno, os estudos da variação morfológica devem envolver a análise simultânea de fatores genéticos e de fatores ambientais que causam variação intraespecífica e divergência interespecífica.

Um marcador morfológico bastante usado em estudos de evolução em insetos é a asa. A asa de *Drosophila* é um excelente modelo pois apresenta elevados níveis de homologia entre espécies, que é aplicável a muitos pontos de referência através de um grande número de espécies (DEBAT et al., 2003). O desenvolvimento da asa tem sido amplamente estudado e é relativamente bem compreendido (DE CELIS, 2003) e apresenta altos níveis de plasticidade fenotípica em relação a diferentes fontes de variação ambiental (WEBER, 1990; DAVID et al., 1994; MONTEIRO & REIS, 1999; MORIN et al., 1999; CARREIRA et al., 2008; SOTO et al., 2008a). Além disso, existe evidência de que os diferentes aspectos da morfologia da asa (tanto o tamanho quanto a forma) são alvos da seleção natural (POWELL, 1997; GILCHRIST et al., 2004). Assim, os insetos são um excelente sistema para se estudar este tipo de variação morfológica, dado que respondem, de maneira geral, rapidamente as perturbações ambientais.

O estudo quantitativo da forma é realizado por meio de técnicas morfométricas. A forma é definida pela configuração de marcos anatômicos e, segundo Richtsmeier e colaboradores (2002), as mensurações extraídas das estruturas em que se busca estudar a forma contém informações combinadas de tamanho e conformação. A conformação representa as propriedades geométricas de uma configuração de pontos que são invariáveis para mudanças de escala, rotação e translação (SLICE et al., 2011), e o tamanho aborda as propriedades em relação às grandezas e dimensões.

A morfometria geométrica tem como objetivo representar e descrever a geometria das formas estudadas, além de localizar claramente as regiões onde ocorrem as modificações e, reconstruir graficamente tais mudanças que ocorrem na forma (FORNEL, 2005). Essas descrições baseiam-se em pontos de referência,

denominados marcos anatômicos (do inglês *landmarks*). Tais marcos caracterizam-se como pontos de correspondência presentes em cada objeto, que coincidem entre e dentro das populações estudadas (DRYDEN & MARDIA, 1998). Dessa forma, são pontos morfológicos considerados homólogos e que se repetem nos objetos de estudo. A homologia neste caso é considerada um mapeamento de pontos, onde o importante é relacionar ponto a ponto, e não parte a parte, sendo um ponto uma estrutura mais facilmente definida que uma parte estrutural (BOOKSTEIN, 1991). As coordenadas das configurações sobrepostas são transformadas em variáveis da forma, denominadas deformações parciais (BOOKSTEIN, 1991; ROHLF, 1996). Esses pontos de referência em estruturas homólogas, sejam de duas ou três dimensões, são as variáveis que capturam as informações sobre a geometria das estruturas estudadas. Segundo Fornel (2005), a vantagem da utilização de coordenadas está na inclusão das informações acerca de suas posições relativas, o que, após a realização das análises uni ou multivariadas, possibilita a reconstrução da forma.

Outro marcador morfológico amplamente utilizado no gênero *Drosophila* é a terminália masculina. Em espécies de *Drosophila*, ela é formada por um conjunto de apêndices diversos que podem servir como elementos de diferenciação específica. O estudo comparativo desses elementos facilita ao sistemata o estabelecimento das relações entre grupos de espécies (BREUER & PAVAN, 1954). A grande diferenciação nos caracteres da genitália masculina sofrida pelas moscas nem sempre é acompanhada por igual diferenciação na morfologia do restante do corpo (VILELA, 1983).

O edeago de insetos, que é o órgão copulador intromitente da genitália masculina (MAGGENTI et al., 2005), é uma das principais características diagnósticas para a identificação de espécies de *Drosophila*, sendo que as fêmeas desse gênero muitas vezes são indistinguíveis morfológicamente (VILELA, 1983). Em abelhas, o edeago também é utilizado para a identificação das abelhas machos, sendo muito difícil diferenciar espécies sem extrair a genitália (RICHARDS, 1968). Durante séculos, características morfológicas externas, comportamentais e a distribuição geográfica dos espécimes eram os únicos dados disponíveis aos taxonomistas, os quais descreviam e delimitavam as espécies de acordo com a observação destas características. Atualmente, este já não é mais o caso (HEY, 2001; COOK et al., 2010). No gênero *Drosophila*, bem como outros insetos, o

edeago é um órgão importante para fins taxonômicos (SILVA & SENE, 1991; KULLIKOV et al., 2004; FRANCO et al., 2006).

O edeago apresenta evolução muito rápida e divergente quando comparada com outras características morfológicas (EBERHARD, 1985; GARNIER et al. 2005, SOTO et al., 2007). Essa evolução rápida dos traços genitais, particularmente aqueles que são específicos do macho, faz com que este tipo de característica seja importante para a identificação de espécies em grupos de animais com fecundação interna (EBERHARD, 1993; ARNQVIST, 1997), tais como coleopteros (besouros e carabídeos), libélulas, aranhas, morcegos, lepidosaurias, entre outros. Essa diferenciação da morfologia genital, além de estabelecer um caráter diagnóstico para várias espécies, pode acabar gerando um isolamento reprodutivo entre populações (PAULSON, 1974; SOTA & KUBOTA, 1998; NAGATA et al., 2007).

No entanto, os mecanismos e processos envolvidos na divergência da genitália do macho não são muito bem compreendidos, sendo uma questão de debate entre os biólogos evolutivos (HOSKEN & STOCKLEY, 2004). Há três hipóteses principais para explicar a rápida evolução da morfologia genital: chave e fechadura, pleiotropia e a hipótese de seleção sexual. A hipótese chave-fechadura (DUFOR, 1844) considera que a genitália masculina evoluiu como uma característica específica da espécie, a fim de encaixar corretamente no órgão genital feminino. Esta teoria prevê, tanto para a variação fenotípica quanto para a variação genotípica, baixos níveis de variação no desenvolvimento da genitália masculina (SHAPIRO & PORTER, 1989; ARNQVIST, 1997), uma vez que os traços genitais deverão estar sob forte seleção de estabilização (POMIANKOWSKI & MÖLLER 1995; ARNQVIST, 1997).

A hipótese da variação pleiotrópica (MAYR, 1963) assume que características morfológicas genitais e não-genitais são geneticamente correlacionadas às mudanças das frequências alélicas em locos pleiotrópicos. Esses fatores que afetam a morfologia geral e morfologia genital podem acarretar em uma evolução rápida e até mesmo eventual de traços genitais (MAYR, 1963; EBERHARD, 1990, 1996).

A hipótese de seleção sexual (EBERHARD, 1993) prediz que há uma correlação entre a variação morfológica e o sucesso reprodutivo, sendo que aqueles indivíduos machos que apresentem um determinado tipo de morfologia terão vantagens reprodutivas durante a competição com outros machos. Segundo Fisher (1930), as fêmeas tendem a escolher machos com características morfológicas que

favorecem assim o sucesso na fertilização (ARNQVIST, 1997).

Não obstante a importância da morfologia genital na taxonomia, estudos abordando as causas e as consequências da variação morfológica intraespecífica são relativamente escassos (ARNQVIST, 1997; HOSKEN & STOCKLEY 2004). Além disso, o estudo da evolução genital pode ser ainda mais complicado, não só por este processo ser influenciado pela seleção natural e sexual, mas também porque sua expressão fenotípica pode ser influenciada por fatores ambientais (SOTO et al., 2007, 2008b), como ocorre com outras características morfológicas (ANDRADE et al., 2005). Portanto, os estudos que abordam a variação intraespecífica, divergência interespecífica e hibridização podem proporcionar uma abordagem útil para entender as bases genéticas subjacentes e os processos evolutivos envolvidos na morfologia genital (ARNQVIST, 1997; HOSKEN & STOCKLEY, 2004; SOTO, et al. 2007).

No caso do edeago, a determinação de um número adequado de marcos anatômicos homólogos e que sejam confiáveis é impossibilitado pela sua estrutura tridimensional. Contudo, pelo fato dele ser um órgão quitinoso e achatado, a sua forma e tamanho pode ser efetivamente descrito em duas dimensões quando colocado sobre uma lâmina e analisado por meio de Descritores Elípticos de Fourier (KUHL & GIARDINA, 1982), resolvendo assim o problema de quantificação da forma (LIU et al., 1996). Neste tipo de análise, as diferenças nas coordenadas x e y do contorno do órgão estudado são plotados separados como funções do comprimento do arco por meio de uma análise de Fourier. Assim, o contorno pode ser decomposto em uma soma enviesada de funções de seno e co-seno, designados de harmônicas (KUHL & GIARDINA, 1982; FERSON et al., 1985; ROHLF, 1990).

Segundo Galindo-Real e Câmara (2005), as florestas pluviais do litoral, as matas sulinas mistas com araucárias, as florestas estacionais decíduas e semidecíduas interioranas e os ecossistemas associados, incluindo manguezais, restingas, campos de altitude, enclaves de campos e cerrados e as matas montanas da região nordeste, conhecidos como brejos e chãs, pertencem a Mata Atlântica.

A Floresta Ombrófila Mista contem os dois únicos gêneros de coníferas nativas do Brasil, Podocarpus e Araucária, e diversos gêneros de lauráceas e representantes de outras famílias. Se distribui-se quase que continuamente sobre o Planalto Meridional, cobrindo o estado do Rio Grande do Sul e o interior de Santa Catarina e Paraná, com diversas interrupções nas áreas mais elevadas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A menor altitude na qual cresce está

em torno de 500m e apenas 2 a 4% da área original dessas florestas ainda estão razoavelmente preservadas (Câmara, 1991). As florestas estacionais decíduas e semidecíduas são compostas por árvores perenifólias e caducifólias e possuem características altamente variáveis. Estão localizadas, a oeste das florestas ombrófilas densas ou mistas, no interior. Originalmente, estendiam-se do Rio Grande do Sul a Minas Gerais, com extensões que alcançavam o interior da Bahia e do Piauí. Seus solos eram extremamente férteis, como as “terras roxas” dos estados sulinos. Essas florestas foram quase que completamente eliminadas, sendo muito pouco estudadas antes de sua destruição em larga escala, sabendo muito pouco sobre sua composição primitiva.

A família Drosophilidae é um grupo importante de insetos que tem sido estudado extensivamente por meio de análises morfométricas (BITNER-MATHÉ et al., 1995; BITNER-MATHÉ & KLACZKO, 1999a,b; SISODIA & SINGH, 2001; FANARA et al., 2004; MORAES et al., 2004; PRADO et al., 2004; FRANCO et al., 2006; MORAES & SENE, 2007; DEBAT et al., 2008; FRANCO et al., 2008; DEBAT et al., 2009; KLINGENBERG, 2009; SOTO et al., 2010; KOKUDAI et al., 2011; RICHMOND et al., 2012; MATEUS et al., 2013; SOTO et al., 2013). Esta família é composta atualmente por cerca de 3800 espécies, distribuídas ao longo de mais de 60 gêneros. Cerca da metade do número total de espécies descritas pertencem ao gênero *Drosophila*, que tem uma distribuição ampla e dispersa (WHEELER, 1982). Algumas espécies são endêmicas de certas regiões, enquanto outras são cosmopolitas, sendo que, muitas desta última categoria, dispersaram-se pelo mundo devido à sua capacidade de associação ao homem (TIDON-SKLORZ & SENE, 1999).

No Brasil, os primeiros registros sobre a fauna drosofiliana foram realizados por Duda 1925 (apud TIDON-SKLORZ & SENE, 1999). Após 1940, muitos trabalhos relacionados à fauna brasileira de *Drosophila* foram publicados (PAVAN & CUNHA, 1947; DOBZHANSKY & PAVAN, 1950; PAVAN, 1950, 1959), incluindo a primeira “Relação de Espécies Brasileiras” (MOURÃO et al., 1965). Posteriormente, outros autores analisaram a fauna drosofiliana em domínios morfoclimáticos do Brasil, visando compreender melhor a distribuição geográfica das espécies mais comuns (SENE et al., 1980; VAL et al., 1981; VILELA et al., 1983). O gênero *Drosophila* contém 15 subgêneros (POWELL, 1997), entre eles podemos distinguir os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* como os mais importantes, cuja sistemática

permanece controversa e incompleta. O maior grupo de Drosophilidae habitando a região Neotropical é o subgênero *Drosophila*, onde se inclui pelo menos 25 grupos de espécies (VAL et al., 1981).

Malogolowkin (1953) e Throckmorton (1975) subdividiram o subgênero *Drosophila* em dois clados principais, a seção radiação *virilis-repleta*, contendo 15 grupos de espécies, e a seção *quinaria-tripunctata* (também conhecida como a radiação *immigrans-Hirtodrosophila*). O clado *immigrans-tripunctata*, segundo dados conjuntos de Remsen e O'Grady (2002), Perlman e colaboradores (2003), Katoh e colaboradores (2007) e Robe e colaboradores (2010a), engloba atualmente 308 espécies (BÄCHLI, 2013), divididas em 17 grupos: *bizonata*, *calloptera*, *cardini*, *funebis*, *guarani*, *guaramunu*, *guttifera*, *histrion*, *immigrans*, *macroptera*, *pallidipennis*, *pinicola*, *quinaria*, *rubrifrons*, *sticta*, *testacea* e *tripunctata*. Dentre estes 17 grupos, nove são Neotropicais, incluindo os grupos *guarani* e *guaramunu*.

As espécies destes dois grupos, *guarani* e *guaramunu*, pertenciam a dois subgrupos de mesmo nome dentro de um único grupo, anteriormente denominado de grupo *guarani*. Porém, recentemente estes subgrupos foram elevados a categoria de grupos (ROBE et al., 2010b) uma vez que dados citogenéticos e moleculares mostraram que espécies do subgrupo *guaramunu* apresentam maior similaridade com espécies do grupo *tripunctata* do que com espécies do subgrupo *guarani* (KASTRITSIS, 1969; KASTRITSIS et al., 1970; YOTOKO et al., 2003; ROBE et al., 2005; ROBE et al., 2010b).

Moscas do gênero *Drosophila*, em ambientes naturais, são insetos altamente sensíveis a pequenas modificações do ambiente como temperatura e umidade, que podem afetar parâmetros vitais, tais como viabilidade, fertilidade, tempo de desenvolvimento e outros fatores que influenciam a taxa de aumento e sobrevivência da população (SENE et al., 1980; TIDON-SKLORZ & SENE, 1992; BALANYA et al., 2006; TORRES e MADI-RAVAZZI, 2006). Segundo Dobzhansky e Pavan (1950), a maior parte do território brasileiro é de áreas tropicais que apresentam duas estações bem definidas, seca e úmida. Isto reflete nas mudanças no ambiente, no tamanho das populações naturais e também na diversidade de espécies ocupando um determinado habitat. Estudos a respeito da utilização de drosofilídeos como bioindicadores têm avançado no decorrer dos últimos anos, principalmente como indicadores da qualidade e diversidade do ambiente (PARSONS, 1991; AVONDET et al., 2003; FERREIRA & TIDON, 2005;

TORRES & MADI-RAVAZZI, 2006, DA MATA et al, 2008; PENARIOL & MADI-RAVAZZI, 2013). Este tipo de estudo só é possível pois estes insetos possuem a capacidade de refletir mudanças ecológicas devido ao fato de espécies distintas apresentarem exigências diferentes em relação à qualidade do ambiente (FERREIRA & TIDON, 2005; MATEUS et al., 2006).

A diminuição da diversidade biológica é considerada um problema ecológico atual devido à perda de cobertura vegetal natural por campos de pastagem, instalações urbanas e outros fatores antrópicos, resultando em pequenos fragmentos florestais isolados uns dos outros (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Além da perda da biodiversidade, a limitação do fluxo gênico e a diminuição do tamanho populacional são resultados do processo de fragmentação de habitats, que podem levar a endogamia e a perda de variabilidade genética, restringindo a capacidade da população de responder a novas condições ambientais (CASWELL, 2001). A alta sensibilidade de *Drosophila* em relação às variáveis bióticas e abióticas, fatores este que interferem na dinâmica populacional desses organismos, faz com que este gênero se torne um excelente modelo para estudos ambientais, pois possuem uma grande diversidade na maior parte do ecossistema e existe a facilidade de coleta desses indivíduos no ambiente natural (PARSONS, 1991; FOOTE & CARSON, 2004).

Alguns trabalhos referentes à composição da assembleia de *Drosophila* tem relatado a ocorrência de algumas espécies dos grupos *guarani* e *guaramunu* em diversos domínios morfoclimáticos brasileiros, remanescentes de áreas naturais com indicativos de baixa ação antrópica (MEDEIROS & KLACZKO, 2004; TIDON, 2006; GOTTSCHALK et al., 2007; DÖGE et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010; HOCHMÜLLER et al., 2010; CAVASINI et al., *in press*). Uma delas, *Drosophila maculifrons*, pertence ao grupo *guaramunu* (ROBE et al., 2010b) e habita áreas de matas do Brasil, ocorrendo principalmente nos domínios da Mata Atlântica das regiões sul, sudeste e centro-oeste (GOTTSCHALK et al., 2008). Já *D. ornatifrons*, pertence ao grupo *guarani* (ROBE et al., 2010b) e tem sido encontrada em todo o Brasil (GOTTSCHALK et al., 2008). Apesar da grande quantidade de dados citogenéticos e moleculares para estas espécies (principalmente relacionados a análises filogenéticas), não existe nenhum estudo comparativo entre características morfológicas utilizando suas populações naturais. Pelo fato de suas recentes alterações taxonômicas e por elas ocorrerem em áreas de remanescentes florestais,

elas se tornam objetos relevantes para estudos populacionais, ecológicos e evolutivos, podendo ser importantes fontes de informação sobre o estado de conservação da fitofisionomia a que estão associadas.

Assim, a variação morfológica das asas e edeagos das populações de *D. maculifrons* e *D. ornatifrons* de diferentes domínios fitofisionômicos foram analisadas com o intuito de quantificar a diferenciação e identificar os padrões de variação populacional e obter resultados sobre a história evolutiva destas espécies.

2. Objetivos

2.1 Geral:

Analisar a variação morfométrica da asa e do edeago de populações naturais das espécies *Drosophila maculifrons* e *D. ornatifrons*, com o intuito de avaliar a variação morfológica e tentar determinar padrões que podem estar relacionados com aspectos populacionais, ecológicos e evolutivos destas espécies por meio destes marcadores morfológicos.

2.2 Objetivo Específico:

- Caracterizar as populações naturais de *Drosophila maculifrons* coletada nas regiões sul e sudeste do Brasil e as populações naturais de *D. ornatifrons* coletadas na região sul do Brasil, por meio da variação morfológica da asa e do edeago, com o intuito de determinar padrões determinantes correlacionados com a variação genética e com a variação ambiental.

3. Material e Métodos

Os materiais e métodos específicos utilizados neste trabalho estão descritos a seguir nos capítulos correspondentes a cada artigo científico.

4. Resultados

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

4.1. Capítulo I

Variação morfológica em caracteres sistemático-taxonômicos de populações naturais de *Drosophila maculifrons* (Diptera: Drosophilidae)

Trava, B.M.; Santos, K.; Machado, L.P.B. e Mateus, R.P.

4.1.1. Introdução

A biologia evolutiva tem como um dos objetivos entender os mecanismos relacionados com a evolução da morfologia, e as relações deste caráter com o ambiente. Diversos trabalhos tem abordado como a variação genética e/ou ambiental tem influência sobre características morfológicas (CARROLL, 2000; IMASHEVA et al., 1995; GILCHRIST et al., 2000; CARROLL, 2008; HOFFMANN & SHIRRIFFS 2002; CARREIRA et al. 2006; SOTO et al. 2007, 2010; SOTO, 2012; como exemplos). Estudos de diferenciação populacional são geralmente baseados em marcadores moleculares, através de estatísticas derivadas da genética de populações e filogeografia (AVISE, 2000). No entanto, os marcadores morfológicos podem ser úteis fornecendo ideias alternativas em estudos populacionais, provendo uma boa avaliação de como a variação genética está distribuída entre as diferentes entidades, devido às características morfológicas estarem geralmente sob controle poligênico (FALCONER, 1989; GARNIER et al., 2005). Em um contexto moderno, os estudos da variação morfológica devem envolver a análise simultânea de fatores genéticos e de fatores ambientais que causam variação intraespecífica e divergência interespecífica (MACKAY, 2004).

Dois marcadores morfológicos tem se mostrado muito importantes em estudos de variação intra e interespecífica em insetos. Um deles é a asa, e segundo Kunkel (2004), Comstock (1893) foi o primeiro a difundir o uso da venação em asa para estudos de classificação tradicional de insetos. A partir da década de 1970, as asas de insetos começaram a ser utilizadas por diversos autores para estudos morfométricos em sistemática e filogenia (PLOWRIGHT & STEPHEN, 1973; ROHLF, 1993; GUMIEL et al., 2003; KLINGENBERG, 2003). A asa da *Drosophila* é um órgão que possui muitos pontos de referência homólogos entre espécies (DEBAT et al.,

2003) e seu desenvolvimento é muito estudado e bem compreendido (DE CELIS, 2003). Sabe-se que possui altos níveis de plasticidade fenotípica em relação às diferentes fontes de variação ambiental (WEBER, 1990; DAVID et al., 1994; MORIN et al., 1999; CARREIRA et al., 2006; SOTO et al., 2008a), e há evidências de que a variação no tamanho e na forma da asa são alvos da seleção natural (POWELL, 1997; GILCHRIST et al., 2000, 2004; HUEY et al., 2000).

O outro marcador morfológico que tem se mostrado importante é a terminália masculina. Em *Drosophila* ela é formada por um conjunto de apêndices com diversas estruturas que podem servir como elementos de diferenciação interespecífica. O estudo comparativo desses elementos tem facilitado ao sistemata o estabelecimento de relações entre grupos de espécies (BREUER & PAVAN, 1950, 1954). O edeago de insetos, que é o órgão genital intromitente masculino (MAGGENTI et al., 2005), tem apresentado evolução muito rápida e divergente quando comparada com outras características morfológicas, sendo considerado um dos padrões mais difundidos de evolução animal (EBERHARD, 1985; GARNIER et al., 2005; SOTO et al., 2007, 2008b).

Segundo Bächli (2013), cerca de 3800 espécies pertencem a família Drosophilidae (Diptera), distribuídas ao longo de mais de 60 gêneros, com cerca de metade do número total de espécies pertencendo ao gênero *Drosophila*. Este gênero contém 15 subgêneros (POWELL, 1997) e tem uma distribuição ampla e dispersa (WHEELER, 1982). O maior grupo, desta família, que habita a região Neotropical é o subgênero *Drosophila*, onde se inclui pelo menos 25 grupos de espécies (VAL et al., 1981). Malogolowkin (1953) e Throckmorton (1975) subdividiram o subgênero *Drosophila* em dois clados principais, a seção radiação *virilis-repleta*, contendo 15 grupos de espécies, e a seção *quinaria-tripunctata* (também conhecida como a radiação *immigrans-Hirtodrosophila*). O clado *immigrans-tripunctata*, segundo dados conjuntos de Remsen e O'Grady (2002), Perlman e colaboradores (2003), Katoh e colaboradores (2007) e Robe e colaboradores (2010a), engloba atualmente 308 espécies (BÄCHLI, 2013), divididas em 17 grupos: *bizonata*, *calloptera*, *cardini*, *funebri*, *guarani*, *guaramunu*, *guttifera*, *histrion*, *immigrans*, *macroptera*, *pallidipennis*, *pinicola*, *quinaria*, *rubrifrons*, *sticta*, *testacea* e *tripunctata*. Dentre estes 17 grupos, nove são Neotropicais. O conhecimento da riqueza da família Drosophilidae ainda é incompleto, especialmente na região Neotropical. Segundo Medeiros e Klaczko (2004) e Döge e colaboradores (2008), cerca de 40% das espécies brasileiras de

Drosophila ainda não foram descritas, e até mesmo a distribuição geográfica de diversas espécies também ainda não foi determinada (DÖGE et al, 2006, 2008; DA MATA et al., 2008).

Estudos de populações são importantes por possibilitar inferências sobre a distância genética, a diversidade genética, o fluxo gênico, além de permitir a avaliação dos níveis de endogamia. Fatores que têm sido relacionados à extinção de espécies e tem maior importância em populações pequenas e isoladas, nas quais os efeitos da deriva genética, da endogamia e do fluxo gênico restrito são pronunciados. O processo de perda de habitat implica, quase invariavelmente, na diminuição do tamanho populacional das espécies. As populações menores são afetadas diferenciadamente por processos ligados às aleatoriedades ambientais, demográfica e genética além da perda de flexibilidade adaptativa (BRITO & FERNANDEZ, 2000).

A enorme biodiversidade da Mata Atlântica foi influenciada em grande parte devido a grande variação latitudinal, as diferenças de altitude e seus diversos regimes climáticos. Os climas, atualmente, variam de regimes sub-úmidos com estações secas, no Nordeste, até ambientes de pluviosidade extrema, em alguns locais da serra do Mar. Outro fator foi a história geológica e climática da região como um todo. Na era Cenozóica, falhas de grande profundidade criaram diferenças no relevo, influenciando diretamente os biomas. Além disso, no Pleistoceno, houve períodos de clima frio e seco alternados com períodos interglaciais quentes e úmidos. Nos períodos mais frios e secos, e também mais longos, a floresta fragmentou-se em manchas separadas por áreas de cerrado ou caatinga. Quando alterações na temperatura e na umidade permitiam, as florestas expandiam-se novamente. Nos períodos frios, as florestas de araucária podem ter coberto grandes áreas, como evidenciam pequenas partes isoladas desse tipo de floresta que ainda restam. Nas situações climáticas mais favoráveis, as florestas pluviais provavelmente ocuparam áreas maiores e chegaram a conectar-se com a Floresta Amazônica. Com isso, grande diversidade de condições ecológicas, associada às sucessivas retrações e expansões das diferentes formações florestais, contribuiu para a enorme diversidade biológica e para o grande número de espécies endêmicas que persiste, apesar do desmatamento extremo.

Dentro deste contexto, um trabalho de levantamento da ocorrência das espécies *Drosophila ornatifrons*, grupo *guarani*, e *D. maculifrons*, grupo *guaramunu*,

foi iniciado recentemente, objetivando a sua posterior utilização em estudos de variação intraespecífica, tanto morfológica quanto molecular, e também como fontes de informação sobre o estado de conservação do bioma Mata Atlântica a que elas estão associadas. *Drosophila maculifrons* pertence ao grupo *guaramunu* e é endêmica da América do Sul, habitando remanescentes de Mata Atlântica do sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (GOTTSCHALK et al., 2008). Ela foi estudada quanto a variação citogenética (SALZANO, 1955; KASTRITSIS, 1969; KASTRITSIS et al., 1970) e alguns trabalhos tem focado em análises filogenéticas moleculares (YOTOKO et al., 2003; ROBE et al., 2005; HATADANI et al., 2009; ROBE et al., 2010a, 2010b), porém não existe nenhum estudo comparativo utilizando características morfológicas em suas populações naturais. Assim, este trabalho é o pioneiro neste sentido e quantificou a diferenciação morfológica e identificou alguns padrões populacionais para estas variações nesta espécie. Para tanto, foram realizadas coletas em populações naturais das regiões sul e sudeste do Brasil, em áreas de Mata Atlântica de Interior, incluindo as fitofisionomias Floresta Ombrófila Mista (FOM) e Floresta Estacional Decidual e Semidecidual (FES). Foram realizadas análises comparativas da morfologia das asas e do edeago por meio da morfometria geométrica. Assim, obtivemos informações que podem contribuir para o entendimento de aspectos ecológicos e da história evolutiva desta espécie, e também sobre o estado de conservação do bioma Mata Atlântica.

4.1.2. Material e Métodos

Neste trabalho foram realizadas coletas de amostras de *D. maculifrons* de sete populações naturais localizadas no sul e sudeste do Brasil (Figura 1). Indivíduos de cada população foram coletados a partir de armadilhas abertas, contendo isca de banana, laranja e fermento biológico, distribuídas no chão dentro da mata, e utilizando rede entomológica para captura, de acordo com o método descrito por Dos Santos et al. (2010). As moscas capturadas foram transferidas para tubos contendo meio de cultura e transportadas para o laboratório. As moscas foram triadas e identificadas por meio de chave de identificação e análise da genitália do macho (FREIRE-MAIA & PAVAN, 1949; VILELA & BÄCHLI, 1990). Após a identificação das espécies pela forma do edeago, foram montadas 400 lâminas das

asas direita e 408 lâminas de edeago dos machos adultos de *Drosophila maculifrons* de todas as populações amostradas, conforme descrito na Tabela 1.

Preparação das lâminas

- Asas

A asa direita de cada indivíduo foi removida e montada em lâminas. As imagens das asas foram capturadas usando um microscópio estereoscópico (Stemi 2000 C, Zeiss) com aumento de 2,5X com câmera 5 MP acoplada. Foram obtidos nove marcos anatômicos do tipo I e um do tipo II utilizando o programa tpsDig 2 (ROHLF, 2005). Segundo Bookstein (1991), a utilização do marco Tipo I tem sentido mais desenvolvimentista e evolutivo, mas geralmente marcos de referência de Tipo II também podem ser utilizados pois são funcionalmente equivalentes (O'HIGGINS, 2000). Os dez marcos anatômicos estão localizados nas intersecções de veias ou onde a veia encontra as margens da asa (Figura 2). Todas as marcações foram realizadas duas vezes para reduzir o erro de medição (ARNQVIST & MARTENSSON, 1998).

- Edeago

A preparação dos edeagos para as análises foi realizada a partir de modificações da técnica descrita por Kaneshiro (1969). Os dois últimos tergitos do abdômen de cada macho foram extraídos com uma microagulha e transferidos a um microtubo com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% e deixado em repouso por 12 horas. Após esse período a peça foi lavada em água destilada e colocada em outro microtubo contendo o corante diluído de Gage (quatro partes de fucsina ácida para uma parte de ácido acético glacial), também repousando por aproximadamente 12 horas. A peça foi lavada novamente em água e colocada em uma lâmina escavada contendo glicerina para a separação dos demais apêndices (*hipandrium* e *epandrium*), deixando somente o edeago. Em seguida, o edeago foi colocado no centro de uma lâmina e sobre ele foi adicionada uma gota de bálsamo do Canadá. Esta lâmina continha duas lamínulas fixadas nas suas extremidades, formando uma base de apoio para a movimentação do edeago na lâmina durante captura de imagem. Sobre o edeago e o bálsamo foi colocada uma lamínula maior. O edeago é uma estrutura tridimensional, complexa e muito pequena. Devido a sua morfologia

rígida foi possível, mediante toques suaves na lamínula, posicioná-lo em vista lateral ou frontal. Assim, correções da posição foram realizadas cuidadosamente com o objetivo de posicionar o edeago na lâmina em vista lateral, o edeago foi então fotografado num aumento de 400x utilizando um microscópio (Primo Star, Zeiss) com câmera 5 MP acoplada. Após a captura, as imagens foram editadas no programa Adobe Photoshop CS6 para criação de arquivos de contorno em preto e branco (Figura 3) para análise no pacote de programas SHAPE v1.3 (IWATA & UKAI, 2002).

Análises morfométricas

- Asa

As análises morfométricas das asas foram realizadas utilizando o programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2011). O tamanho da asa foi estimado pelo tamanho do centróide, que é calculado a partir do centro de gravidade de cada asa por meio da raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada um dos marcos anatômicos (DRYDEN & MARDIA, 1998). Diferenças de tamanho e forma da asa foram testadas por Análise de Variância Univariada (ANOVA) de forma populacional (utilizando as amostras das sete populações individualizadas) e também após a separação das amostras populacionais em dois grupos, FOM (Sul) e FES (Sudeste), com base na latitude e no tipo de vegetação onde as populações estão inseridas.

Para a obtenção da variação na forma, os dez marcos anatômicos foram superpostos segundo o método de quadrados mínimos (BOOKSTEIN, 1996; DRYDEN & MARDIA, 1998), onde as coordenadas x e y foram transladas, proporcionalizadas e rotacionadas, a fim de retirar o efeito de posição, tamanho e sentido (MONTEIRO & REIS, 1999). Sem esses três efeitos as diferenças observadas são referentes somente a variação da forma das estruturas. Após, foram obtidas as distâncias de Procrustes entre as populações e foi realizada a análise das variáveis canônicas (CVA). Esta última fornece uma descrição das diferenças entre grupos específicos na diferenciação da forma mesmo quando é utilizada em análises discriminantes realizadas a partir de amostras com observações repetidas, e com base em um grande número de características originais correlacionadas (KHATTREE & NAIK, 2000). Os resultados foram apresentados como distâncias de Procrustes e os seus respectivos graus de significância ($P < 0,05$). Foi realizada ANOVA de Procrustes, resultando em valores de soma de quadrados (SS) e

quadrados médios (MS) (KLINGENBERG & MCINTYRE, 1998). Todas estas análises foram realizadas no programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2011). Além disso, a correlação entre a distância de procruste e a distância geográfica linear foi calculado pelo teste de Mantel (1967), através do programa TFGA versão 1.3 (Miller, 1997). A significância da correlação entre as duas matrizes foi testada utilizando 999 permutações aleatórias da matriz de similaridade, gerando uma distribuição nula de coeficientes de correlação, sendo considerado significativo se o resultado for igual ou superior a 95%.

- Edeago

Para análise morfométrica do edeago foi utilizado o programa SHAPE v1.3. Com este pacote de programas é possível avaliar o contorno de formas baseadas em Descritores Elípticos de Fourier (DEFs), originalmente propostos por Kuhl e Giardina (1982), que delinea qualquer tipo de forma com um contorno bidimensional fechado. As imagens bidimensionais foram utilizadas para obter os Componentes Principais (PC), e contagens com base numa matriz de variância-covariância criada a partir dos coeficientes dos DEFs, utilizando 25 harmônicas. Estes PCs são considerados comparáveis às medições contínuas de características morfológicas e foram usados como tal em análises estatísticas subsequentes. Como os coeficientes de Fourier são normalizados com base na primeira elipse harmônica, o tamanho é desconsiderado na análise estatística.

Após a determinação dos PCs, estes foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (*W*). Os PCs que apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA), e aqueles que não apresentaram tal distribuição foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Estes testes foram aplicados para verificação da existência ou não de diferenciação morfológica entre as populações analisadas. Quando diferenças estatisticamente significativas foram encontradas na ANOVA, o teste *Post Hoc* de Tukey foi realizado, determinando entre quais pares de populações ocorreu tal diferenciação. Estas análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

A análise de agrupamento CLUSTER foi realizada pelo programa PAST 3.01 (KHATTREE & NAIK, 2000) para verificar a existência de estruturação morfológica, utilizando as populações como agrupamentos, o que resulta num dendograma.

A existência de estruturação morfológica, sem a existência de qualquer tipo de agrupamento *a priori*, foi determinada por meio da análise de agrupamento no programa MCLUST versão 4.2, utilizando os valores de PC. Este programa é um pacote do programa R (FRALEY & RAFTERY, 2006) que possui um algoritmo de classificação que combina uma classificação hierárquica aglomerativa, baseada em modelos de classificação, com base na probabilidade de classificação, com algoritmos de Expectativa-Maximização (EM) por Máxima Verossimilhança de modelos de mistura multivariada Gaussiana. Este algoritmo testa dez modelos que diferem em hipóteses sobre a forma e volume, baseado no Critério de Informação Bayesiana (BIC), resultando em um gráfico que demonstra o número de agrupamentos existentes. Os modelos testados foram: "EII": distribuição esférica, volume igual; "VII": distribuição esférica, volume desigual; "EEI": distribuição diagonal; volume e forma iguais; "VEI": distribuição diagonal; volume variável e forma igual; "EVI": distribuição diagonal; volume igual e forma variável; "VVI": distribuição diagonal; volume e forma variáveis; "EEE": distribuição elipsoidal; volume, forma e orientação iguais; "EEV": distribuição elipsoidal; volume e forma iguais; "VEV": distribuição elipsoidal; forma igual; "VVV": distribuição elipsoidal; volume, forma e orientação variáveis. Além disso, ele também permite reclassificar os indivíduos dentro dos agrupamentos detectados sem a classificação *a priori*. Cada indivíduo é atribuído a um grupo com uma probabilidade de incerteza.

4.1.3. Resultados

4.1.3.1. Análise das Asas

Variação no Tamanho e na Forma

Para análise da variação no tamanho das asas foi utilizado o centróide, que é a variável de tamanho que não se correlaciona com a forma e não apresenta dependência alométrica. Houve diferença significativa no tamanho das asas entre as sete populações de *D. maculifrons* ($F=84,48$; $p<0,0001$) (Tabela 2). Quando as amostras foram analisadas separando as de Floresta Ombrófila Mista, daquelas da Floresta Estacional Semidecidual (*D. maculifrons* FOMxFES), também houve diferença significativa para o tamanho ($F=228,86$; $p<0,0001$ - Tabela 2).

Na análise da forma das asas, também foi observada diferença significativa entre todas as populações ($F=4,64$; $p<0,0001$ – Tabela 2). Quando as populações *D. maculifrons* foram analisadas separadas por diferentes fitofisionomias (*D. maculifrons* SxSE) também foram encontradas diferenças significativas ($F=8,47$; $p<0,0001$ - Tabela 2).

Distâncias de Procrustes

O maior valor de distância de Procrustes observado entre as populações de *D. maculifrons* (Tabela 3) foi entre as populações do Parque Municipal das Araucárias/PR e Matão/SP (0,0150) e a menor foi entre Cajuru/SP e Chapecó/SC (0,0034), ambas significativas ($p < 0,001$ e $p = 0,0120$, respectivamente). As únicas distâncias que não foram significativas foram entre Matão/SP e Sertãozinho/SP (0,0075; $p=0,18$) e entre Matão/SP e Canguçu/RS (0,0096; $p=0,3240$). De uma maneira geral, os valores de distância de Procrustes entre as populações de *D. maculifrons* foram menores que os obtidos para *D. ornatifrons* (ver Capítulo 2 a seguir).

Análise das Variáveis Canônicas

A análise das variáveis canônicas para as populações de *D. maculifrons*, as populações estão se divergindo de acordo com distribuição geográfica (Figura 4), mostrou que aquelas localizadas na Floresta Ombrófila Mista e as da Floresta Estacional Semidecidual foram separadas de forma distinta de acordo com os valores da CV1. Quando avaliadas as populações individualmente, os valores médios de CV1 e CV2 representaram 72,6% da variância total da forma entre as populações, onde CV1 representou 56,3% da variância e CV2 representou 16,2% da variância (Figura 5 - A). A Região Intervenial D (IVRD) é a porção da asa que demonstrou maior diferenciação entre os indivíduos de *D. maculifrons* coletados na região de Floresta Estacional Semidecidual - FES e as coletadas em Floresta Ombrófila Mista, a distribuição de cada população no espaço das Variáveis Canônicas mostrou que, para CV1, Cajuru/SP, Sertãozinho/SP e Matão/SP (FES) apresentaram IVRD maior (pelo deslocamento do posicionamento dos marcos 4, 5, 6 e 7) e região proximal mais ampla (mudança do marcos 1, 8, 9 e 10) quando comparadas com Parque das Araucárias/PR (FOM) (Figuras 5 – D e E). Para CV2, Sertãozinho/SP, Matão/SP e Canguçu/RS apresentaram os marcos 3, 4, 9 e 10

numa posição mais distal, e os marcos 1, 5, 6 e 7 em posição mais proximal do que as demais populações.

Teste de Mantel

O teste de Mantel não foi significativo ($r=0.3328$; $p=0,9240$) entre as matrizes de distâncias de procrustes e geográficas.

4.1.3.2. Análise dos Edeagos

Variação da forma do edeago de *Drosophila maculifrons*

Na análise da forma, incluindo as sete populações de *D. maculifrons*, onze PCs foram eficazes e descreveram 92,14% da variação total (Figura 6), sendo que os quatro primeiros descreveram mais de 70% da variação. Grande parte da variação da forma descrita pelo PC1 ocorreu na região do nariz e da cabeça. Para PC2, a variação está associada à largura do tronco e a posição relativa do nariz com o tronco. Para PC3, a variação ocorreu principalmente na base do tronco e na posição do nariz. E para PC4, a maior parte da variação ocorreu na cabeça.

A análise da normalidade dos dados mostrou que os PC1 a PC6, e os PC8 e PC9 apresentaram valores seguindo a distribuição normal, portanto foram analisados por meio da ANOVA. Já os PC7, PC10 e PC11 não apresentaram distribuição normal e foram, portanto, analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A ANOVA revelou que existe diferença significativa para a maioria dos PCs, com exceção do PC8 (Tabela 4). O teste de Kruskal-Wallis resultou em diferenças significativas para PC7 ($H=19,57086$; $p=0,0033$), mas não para PC10 ($H=6,079433$; $p=0,4144$) e PC11 ($H=5,270583$; $p=0,5096$).

Análises pareadas *a posteriori* (teste *Post Hoc* de Tukey), avaliando principalmente as diferenças significativas para os PCs que representaram a maior parte da variação encontrada para a forma do edeago na ANOVA (PC1 a PC4), mostraram que a população do Parque Municipal das Araucárias-PR foi a que apresentou a maior diferenciação com relação às demais, seguida das populações de Cajuru-SP, Sertãozinho-SP e Salto São Francisco-PR (Tabela 5). Já para o teste de Kruskal-Wallis, a análise pareada evidenciou que a diferença encontrada foi devido a diferença significativa entre as populações do Parque Municipal das Araucárias-PR e as de Salto São Francisco-PR ($p=0,004961$).

Análise de agrupamento CLUSTER

Análise de agrupamento CLUSTER, realizada utilizando todos os indivíduos de *D. maculifrons* amostrados, resultou no dendograma da Figura 7. Porém, a reclassificação das amostras não mostrou um padrão consistente com a reclassificação dentro das populações amostradas, havendo no geral um espalhamento das amostras dentro dos sete agrupamentos. Isto demonstra que não há um padrão morfológico de estruturação das amostras por meio da análise de CLUSTER.

Análise de agrupamento MCLUST

A análise de agrupamento MCLUST, realizada para verificar a existência de estruturação morfológica nos edeagos de *D. maculifrons* sem uma suposição *a priori* da existência de qualquer agrupamento, resultou em três modelos que melhor explicaram a dispersão dos dados para a forma. Este modelos foram: "EEI" – distribuição diagonal, volume e forma iguais; "EVI" – distribuição diagonal, volume igual e forma variável, e; "VEI" – distribuição diagonal, volume variável e forma igual. De acordo com esses modelos, apenas um agrupamento foi reconhecido a partir da variabilidade morfológica total dos edeagos analisados (Figura 8). Desta forma, nenhum indivíduo foi alocado com classificação incerta dentro do único agrupamento gerado.

4.1.4. Discussão

As populações de *Drosophila maculifrons* apresentam diferenças significativas para o tamanho e para a forma de suas asas e para a forma de seus edeagos. Este resultado corrobora o poder taxonômico destes caracteres morfológicos, o que já havia sido demonstrado para outras espécies de *Drosophila* (SHORROCKS, 1972), inclusive para espécies crípticas. Neste último caso é esperado encontrar uma alta semelhança morfológica, porém, quando são utilizados métodos morfométricos algumas diferenças morfológicas podem ser detectadas e podem permitir a discriminação entre elas (MORAES et al., 2004a, 2004b). Variações no tamanho e na forma da asa estão associadas com o modo de

exploração do ambiente (FITZPATRICK, 1985).

A análise intraespecífica da asa demonstrou que há diferenças significativas para a heterogeneidade da forma e tamanho entre as populações desta espécie, permitindo inclusive reconhecer diferentes formas da asa em compartimentos distintos. A Região Intervenial D (IVRD) é a porção da asa que demonstrou maior diferenciação entre os indivíduos de *D. maculifrons* coletados na região de Floresta Estacional Semidecidual - FES e as coletadas em Floresta Ombrófila Mista. Estes resultados também foram obtidos por Cavicchi e colaboradores (1985) para *D. melanogaster*, uma espécie cosmopolita e encontrada geralmente associada a atividades humanas, o qual demonstrou que a parte posterior da asa exibe resposta plástica para a variação na temperatura do ambiente. Porém no teste de Mantel não houve relação estatisticamente significativa em relação a distância geográfica.

Ainda dentro das análises das asas, as populações de *D. maculifrons* apresentaram menor distância de Procrustes entre si do que as de *D. ornatifrons* (Capítulo 2 a seguir). Análises filogeográficas para estas duas espécies mostraram uma baixa variabilidade molecular para genes do DNA mitocondrial analisados, com evidências de expansão populacional do sul para o sudeste do Brasil (CENZI-DE-RÉ et al., *in press*; GUSTANI, 2013). Assim, a variação morfológica encontrada para as duas espécies, e mais acentuada para *D. ornatifrons*, pode ter mais relação com aspectos ecológicos do que com questões históricas.

Com relação a forma do edeago, a análise de agrupamento sem uma suposição de ocorrência de agrupamento *a priori*, realizada pelo CLUSTER mostrou que não há um padrão na distribuição do agrupamento e o MCLUST, resultou no agrupamento de todos os edeagos das populações amostradas em um único grupo. Portanto, estas análises mostraram que não há diferenciação na forma dos edeagos de todas as populações de *D. maculifrons* amostradas. Porém, as ANOVA e o teste *Post Hoc* de Tukey mostraram que há diferenças significativas para a forma entre as populações amostradas, principalmente entre as localizadas em FOM, e as encontradas em FES, fato também observado para os resultados da asa descritos acima. A diferença entre os resultados do CLUSTER e o MCLUST e a ANOVA pode ser devido a sensibilidade diferencial intrínseca de cada teste, mostrando que há uma diferença significativa populacional, mas trata-se da mesma espécie com morfologia do edeago bem conservativa. Estudos tem demonstrado que há variação no tamanho e na forma do edeago de diversas espécies de *Drosophila* devido a

influência da temperatura e do tipo de substrato larval (ANDRADE, et al., 2005; SOTO, et al., 2007, 2008b), como também mudança no tamanho da asa em *D. melanogaster* devido as mudanças sazonais, mostrando uma relação entre características morfológicas e variáveis ambientais (SEVENSTER & VAN ALPHEN, 1993).

A genitália masculina apresenta uma evolução rápida e divergente, sendo considerado um dos padrões mais difundidos de evolução animal (EBERHARD, 1985). Segundo Arnqvist (1997), há três hipóteses principais para explicar a evolução deste órgão: a hipótese chave e fechadura (DUFOUR, 1844), a hipótese de pleiotropia (MAYR, 1963) e a hipótese de seleção sexual (FISHER, 1930). Além dessas hipóteses, o estudo da evolução genital pode ser ainda mais complicado, não só por ser influenciada pela seleção natural e sexual, mas também porque sua expressão fenotípica pode ser influenciada por fatores ambientais como ocorrem com outras características morfológicas (ANDRADE et al., 2005). As variações morfométricas, entre e dentro dos grupos de organismos, também tem a formação de sua estrutura afetada devido a fatores epigenéticos e ambientais (ATCHLEY et al., 1992), sua expressão fenotípica também pode ser resultante de um controle poligênico integrado, que é alterado durante a cladogênese e a evolução dos grupos (FALCONER, 1989).

O clima da região do PMA, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfb, sem estação seca definida. A temperatura média do ar do mês mais quente é próxima a 20,9 °C e a média do mês mais frio 8,4 °C. Os índices de precipitação médios apontam 93,9 mm para o mês mais seco e 202,6 mm para o mais chuvoso, com um mínimo de oito e máximo de 16 dias por mês de chuva (Cordeiro & Rodrigues 2007). A precipitação média está entre os 1300 e 1400 mm/ano (GOLFARI, 1971). Já, segundo Conceição e colaboradores (2009), as áreas coletadas no sudeste apresentam um clima tropical úmido, caracterizado pelo verão chuvoso e pelo inverno seco. No verão a temperatura média é aproximadamente 25°C e no inverno é de aproximadamente 19°C. E a precipitação média está em torno de 1300 mm/ano.

Grande parte da divergência entre populações de *D. maculifrons* foi entre aquelas localizadas em região de FES e a população do Parque das Araucárias, localizada em FOM. Este resultado, além dos fatores temperatura e umidade, pode ser devido ao fato de a FES ser um dos mais ameaçados ecossistemas florestais

brasileiros, pois foi o tipo florestal com uma rápida e extensa área degradada do estado de São Paulo (RIBEIRO et al. 2009). Esta devastação ocorreu principalmente devido a expansão das fronteiras agrícolas no início do século XX, por possuir solos de maior fertilidade em regiões que favoreciam à agricultura (DURIGAN et al. 2000).

O conhecimento de que o acesso a novos recursos ecológicos pode promover a diversificação tem sido importante para o pensamento evolutivo (SCHLUTER, 2001; DRÉS & MALLETT, 2002; DIECKMANN et al., 2004). Um estudo comparativo envolvendo diversos grupos como sapos, aves, peixes, Lepidoptera e *Drosophila* apresentou evidência crítica ligando a divergência ecológica ao isolamento reprodutivo (FUNK et al., 2006). Em conclusão, a evolução e a divergência morfológica entre as populações de *D. maculifrons* parecem estar ligadas provavelmente a exploração diferencial de nichos para esta espécie e/ou relacionadas a diferença de temperatura e umidade entre os locais de coleta analisados em Florestas Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual. Desse modo, a morfometria geométrica da asa e do edeago demonstram ser eficientes como marcadores para evidenciar a sensibilidade desta espécie a variações ecológicas e ambientais.

4.1.5. Referências Bibliográficas

ANDRADE, C. A. C.; HATADANI, L. M.; KLACZKO, L. B. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata* : effect of the temperature. **J. Therm. Biol.**, v. 30, p. 518-523. 2005.

ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biol J Linn.**, v. 60, p. 365–379, 1997.

ARNQVIST, G.; MÅRTENSSON, T. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. **Acta Zoologica Academia Scientiarum Hungaricae**, v. 44, p. 73-96, 1998.

ATCHLEY, W.R.; COWLEY, D.E.; VOGI, C.; MCLELLANT, E. Evolutionary divergence, shape change, and genetic correlation structure in the rodent mandible. **Syst. Biol.**, v. 41, p. 196–221. 1992.

AVISE, J. C. Phylogeography: the history and formation of species. **Harvard University Press**, p. 447, 2000.

BÄCHLI, G. **TaxoDros: the database on taxonomy of Drosophilidae**, v.1.04, Database 2013/6. <http://taxodros.unizh.ch/>> Accessed on 30 September 2013, 2013.

BOOKSTEIN, F.L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bull. Math. Biol.**, v. 58, p. 313-365, 1996.

BOOKSTEIN, F.L. Morphometric tools for landmark data. Geometry and Biology. **Cambridge University Press.**, p. 435, 1991.

BREUER, M.E.; PAVAN, E.C. Genitalia masculina de *Drosophila* (Diptera): grupo Annulimana. **Rev. Bras. Biol.**, v. 4, p. 469-488, 1950.

BREUER, M.E.; PAVAN, C. Genitalia masculina de *Drosophila* do grupo *dreyfusi* (Diptera). **Rev. Bras. Biol.**, v. 14, p. 465–475, 1954.

BRITO, D.; FERNANDEZ, F. A. S. Dealing with extinction is forever: understanding the risks faced by small populations. **Ciência e Cultura**. v. 52, n. 3, p. 161-170, 2000.

CARREIRA, V.; SOTO, I.M.; FANARA, J.J.; HASSON, E. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1275–1282, 2006.

CARROLL, S.B. Endless Forms: The Evolution Minireview of Gene Regulation and Morphological Diversity. *Cell*. v. 101, p. 577–580, 2000.

CARROLL, S.B. Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: A Genetic Theory of Morphological Evolution. *Cell*, v.134,p. 25-36, 2008.

CAVICCHI, S.; GUERRA, D.; GIORGI, G.; PEZZOLI, C. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. **Genetics**, v. 109, p. 665-689, 1985.

CENZI-DE-RÉ, F.; GUSTANI, E.C.; OLIVEIRA, A.P.F.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R.P.; LORETO, E.L.S.; ROBE, L.J. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera, Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. **Biol. J. Linn. Soc. Lond.**, *in press*.

COMSTOCK J.H. Evolution and Taxonomy. An essay on the application of the theory of natural selection in the classification of animals and plants, illustrated by a study of the evolution of the wings of insects. The Wilder Quarter-Century Book, Ithaca, New-York (CD edition available on <http://snapper.bio.umass.edu/kunkel/comstock/essay/>), 1893.

CONCEIÇÃO, F.T.; CUNHA, R.; SARDINHA, D.S.; SOUZA, A.D.G.; SINELLI, O. Hidrogeoquímica do Aquífero Guarani na Área Urbana de Ribeirão Preto (SP). **Geociências**, v. 1, p. 65-77, 2009.

CORDEIRO, J.; RODRIGUES, W.A. Caracterização fitossociológica de um Remanescente de floresta Ombrófila Mista em Guarapuava, PR. **Rev. Árvore** <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622007000300020>. v.31(3), p. 545-554, 2007.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Divergência genética. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária. Cap.6, p. 287-323, 1994.

DA MATA, R. A.; ROQUE, F.; TIDON, R. Drosophilids (Insecta, Diptera) of the Paranã Valley: eight new records for the Cerrado biome. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 55-60, 2008.

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

DE CELIS, J.F. Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. **Bioessays**, v. 25, p. 443–451, 2003.

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

DIECKMANN, U.; DOEBELI, M.; METZ, J.A.J.; TAUTZ, D. **Adaptive speciation**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 2004.

DÖGE, J.S.; GOTTSCHALK, M.S.; DE TONI, D.C.; BIZZO, L.E.M.; OLIVEIRA, S.C.F.; SCHMITZ, H.J.; VALENTE, V.L.; HOFMANN, P.R.P. New data on the occurrence of the subgenus *Drosophila* (*Drosophila*) in Brazil: I. The *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). **Studia Dipterologica**, v. 13, p.181-187, 2006.

DÖGE, J.S.; VALENTE, V.L.S., HOFMANN, P.R.P. Drosophilids (Diptera) from an

Atlantic Forest area in Santa Catarina, southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.52, p.615-624, 2008.

DOS SANTOS, K.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R.P. 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.**, v. 93, p. 185-188, 2010.

DRÈS, M.; MALLET, J. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 357, p. 471- 492, 2002.

DRYDEN, I.L.; MARDIA, K.V. Statistical shape analysis. **Chichester**: Wiley, 1998.

DUFOUR, L. Anatomie generale des Dipteres. **Annuaire de Science Naturelle**, v. 1, p. 244–264, 1844.

DURIGAN, G., FRANCO, G.A.D.C., SAITO, M. & BAITELLO, J.B. Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação. Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. *Rev. Brasil. Bot.* v.4, p.371-383, 2000.

EBERHARD, W.G. **Sexual Selection and the Evolution of Animal Genitalia**. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1985.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 2.ed., London: Longman. 1989.

FISHER, R.A. **Genetical Theory of Natural Selection**. Oxford: Clarendon Press, 1930.

FITZPATRICK, J.W. **Form, foraging behavior, and adaptive radiation in the Tyrannidae**. *Ornithol. Monogr.* v.36, p.447-470, 1985.

FRALEY, C.; RAFTERY, A.E. **MCLUST version 3 for R: normal mixture modeling**

and model-based clustering. CiteSeerX, The Pennsylvania State University, University Park, PA. 2006.

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

FUNK, D.J.; NOSIL, P.; ETGES, W. Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.103, p. 3209 - 3213, 2006.

GARNIER, S.; MAGNIEZ-JANNIN, F.; RASPLUS, J.Y.; ALIBERT, P. When morphometry meets genetics: Inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. **Journal Evolution Biology**, v. 18, p. 269-80, 2005.

GILCHRIST, A.S.; AZEVEDO, R.B.R.; PARTRIDGE, L.; O'HIGGINS, P. Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. **Evolution and Development**, v. 2, p.114–124, 2000.

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

GOLFARI, L. **Coníferas aptas para o reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.** Rio de Janeiro: IBDF, (Brasil florestal, Boletim técnico n. 1), p.71, 1971.

GOTTSCHALK, M.S.; HOFMANN, P.R.P.; VALENTE, V.L.S. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Check List**, v. 4, p. 485-518, 2008.

GUMIEL. M.; CATALA, S.; NOIREAU, F.; ROJAS DE ARIAS, A.; GARCIA, A.; DUJARDIN, J.P. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). **Systematic Entomology** v.28, p.173-179, 2003.

GUSTANI, E.C. **Filogeografia de duas espécies de *Drosophila* dos grupos *guaramunu e guarani***. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, UNICENTRO, Guarapuava-PR, 2013.

HATADANI, L.M.; MCINERNEY, J.O.; MEDEIROS, H.F.; JUNQUEIRA, A.C.M.; AZEREDO-ESPIN, A.M.; KLACZKO, L.B. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related groups (Diptera: Drosophilidae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 51, p. 595–600, 2009.

HOFFMANN, A.A.; SHIRRIFFS, J. Geographic Variation for Wing Shape in *Drosophila serrate*. **Evolution**, v. 56, p.1068–1073, 2002.

HUEY, R.B.; GILCHRIST, G.W.; CARLSON, M.L.; BERRIGAN, D.; SERRA, L. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. **Science**, v. 287, p.308–309, 2000.

IMASHEVA, A. G.; BUBLI, O.A.; LAZEBNY, O.E.; Zhivotovsky, L.A. Geographic differentiation in wing shape in *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 96, p.303–306, 1995.

IWATA, H., UKAI, Y. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. **J. Hered.**, v. 93, p. 384-385, 2002.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. New Jersey: Prantice Hall, 3 ed. p. 642, 1992.

KANESHIRO, K. Y. A study of the relationship of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. **Univ. Tex. Publs.**, v. 6918, p. 55-70, 1969.

KASTRITSIS, C. D. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. **J. Heredity**, v. 60, p. 51-57, 1969.

KASTRITSIS, C.D.; PASTEUR, G.; QUICK, J. Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediotriata* and *Drosophila griseolineata*. **Canad. J. Genet. Cytol.**, v. 12, p. 952–959, 1970.

KATOH, T.; NAKAYA, D.; TAMURA, K.; AOTSUKA, T. Phylogeny of the *Drosophila immigrans* species group (Diptera: Drosophilidae) based on Adh and Gpdh sequences. **Zoolog Sci.**, v. 24, p. 913–921, 2007.

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

KLINGENBERG, C.P. Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. p.427-442, 2003.

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

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

KUHL, F.P.; GIARDINA, C.R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **Comp. Graph. Ima. Proc.**, v. 18, p. 236-258, 1982.

KUNKEL J.G. Wing discrimination projects. Web-page.<http://marlin.bio.umass.edu/biology/kunkel/wing_discrim.html > 2004.

MACKAY, T.F.C. The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 14, p. 253–257, 2004.

MAGGENTI, M.A.B.; MAGGENTI, A.R.; GARDNER, S. **Online Dictionary of Invertebrate Zoology: Complete Work.** [<http://digitalcommons.unl.edu/onlinedictinvertezoology/2>]. University of Nebraska –

Lincoln, 2005.

MALOGOLOWKIN, C. Sobre a genitália dos drosofilídeos. IV. A genitália masculina no subgênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 13, p. 245–264, 1953.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, Baltimore. v. 27, n. 2, p. 209-220, 1967.

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

MEDEIROS, H.F.; KLACZKO, L.B. How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forest of São Paulo, Brazil? Species list of three forest remnants. **Biota Neotropica**, v. 4, p. 1-12, 2004.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. [S. I.]: Software de computador distribuído pelo autor, 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: **Holos**, p.198, 1999.

MORAES, E.M.; MANFRIN, M.H.; LAUS, A.C.; ROSADA, R.S.; BOMFIN, S.C.; SENE, F.M. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. **Heredity**, v. 92, p. 466–473, 2004a.

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

MORIN, J.P.; MORETEAU, B.; PÉTAVY, G.; DAVID, J.R. Divergence of reaction

norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **J. Evol. Biol.**, v. 12, p. 329–339, 1999.

O'HIGGINS, P. Study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. **J. Anat.**, v. 197, p. 103-120, 2000.

PERLMAN, S.J.; SPICER, G.S.; SHOEMAKER, D.D.; JAENIKE, J. Associations between mycophagous *Drosophila* and their *Howardula* nema-tode parasites: a worldwide phylogenetic shuffle. **Mol Ecol.**, v. 12, p. 237–249, 2003.

PLOWRIGHT, R.C.; STEPHEN, W.P. A numerical taxonomic analysis of the evolutionary relationships of *Bombus* and *Psithyrus* (Apidae: Hymenoptera). **Canadian Entomologist**, v. 105, p.733-743, 1973.

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

REMSEN, J., O'GRADY, P.O. Phylogeny of *Drosophilinae* (Diptera: Drosophilidae) with comments on combined analysis and character support. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 24, p. 249–264, 2002.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distribution? Implications for conservation. **Biol. Conserv.**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.S.; BUDNIK, M.; LORETO, E.L.S. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 623–640, 2005.

ROBE, L.J.; LORETO, E.L.S.; VALENTE, V.L.S. Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **J Zool Syst Evol Res.**, v. 48, p. 310–321, 2010a.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.S.; LORETO, E.L.S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v. 138, p. 725–735, 2010b.

ROHLF F.J. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. in Marcus L.F., Bello E. Garcia-Valdecasas A. (eds.) Contributions to Morphometrics. **Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)**, Madrid. v. 8. p.131-159, 1993.

ROHLF, F. J. TpsDig version 2.05. Digitize landmarks and outlines. Department of Ecology and Evolution, **State University of New York at Stony Brook**, 2005.

SALZANO, F.M. Chromosomal polymorphism in two species of the *guarani* group of *Drosophila*. **Chromosoma**, v. 7, p. 39-50, 1955.

SCHLUTER, D. Ecology and the origin of species. **Trends. Ecol. Evol.**, v.16, p. 372-380, 2001.

SEVENSTER, J.G.; VAN ALPHEN, J.J.M. A life history trade-off in *Drosophila* species and community structure in variable environments. **J. Anim. Ecol.**, v. 62, p. 720-736. 1993.

SHORROCKS B. *Drosophila*. Ginn & Company Limited: London. 1972.

SOTO, I.M. Aedeagal Divergence in Sympatric Populations of Two Sibling Species of Cactophilic *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): Evidence of Character Displacement? **Neotrop Entomol.**, v. 41, p. 207–213, 2012.

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

SOTO, I. M., E. HASSON, and M. H. MANFRIN. Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera, Drosophilidae).

Biol. J. Linn. Soc. Lond., v. 95, p. 655-665, 2008a.

SOTO, I.M.; MANFRIN, M.H.; HASSON, E. Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic *Drosophila*. **J. Zool. Syst. Evol. Res.**, v. 46, p.368-373, 2008b.

SOTO, I.M.; SOTO, E.M.; CORIO, C.; CARREIRA, V.P.; MANFRIN, M.; HASSON E. Male Genital and Wing Morphology in the Cactophilic Sibling Species *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* and Their Hybrids Reared in Different Host Plants. **Environmental Entomology**, v. 39, p. 865-873, 2010.

STATSOFT, Inc. Statistica (data analysis software system). version 7. www.statsoft.com. 2004.

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

VAL, F.C.; MARQUES, M.D.; VILELA, C.R. *Drosophilidae* of Neotropical region. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. **Academic Press, Orlando**, p. 123–168, 1981.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal**. Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro. p. 124, 1991.

VILELA, C. R.; BÄCHLI, G. Taxonomics studies on Neotropical species of seven genera of *Drosophilidae* (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 63, p. 1 - 332, 1990.

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

WHEELER, M.R. The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. **Academic Press**, Orlando, p.1–97, 1982.

YOTOKO, K.S.C.; MEDEIROS, H.F.; SOLFERINI, V.N.; KLACZKO, L.B. A molecular study of the Systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 28, p. 614-619, 2003.

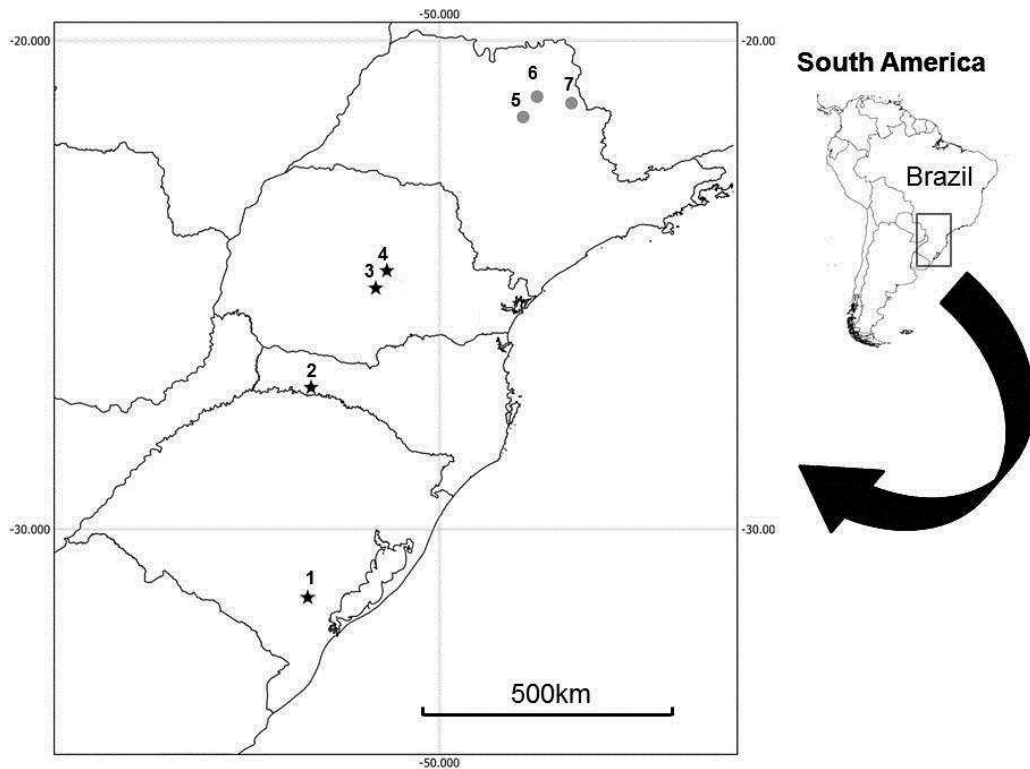


Figura 1. Mapa das localidades de coleta de *Drosophila maculifrons* no sul, FOM (estrelas) e sudeste FES (círculos) do Brasil. 1. Canguçu-RS; 2. Chapecó-SC; 3. Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR; 4. Salto São Francisco da Esperança, Guarapuava-PR; 5. Matão-SP; 6. Sertãozinho-SP; 7. Cajuru-SP.

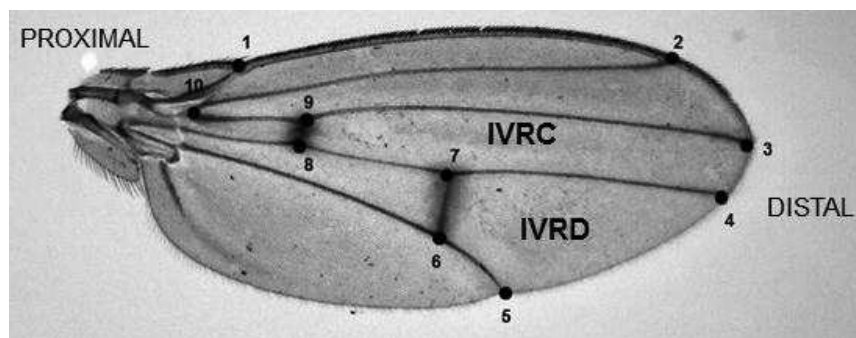


Figura 2. Imagem da asa direita de *Drosophila maculifrons* mostrando a posição dos marcos anatômicos do tipo I (2 a 10) e do tipo II (1). IVRC = região intervenal C; IVRD = região intervenal D; de acordo com Birdsall et al. (2000).

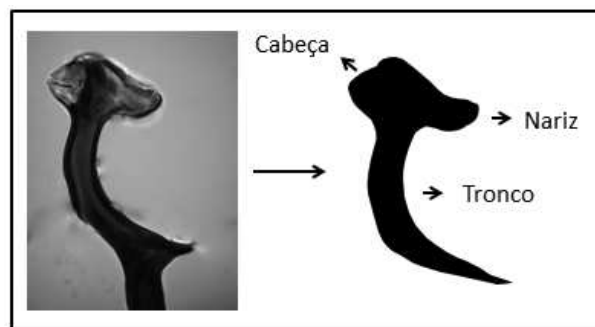


Figura 3. Vista lateral de edeago de *Drosophila maculifrons*, evidenciando a área do contorno da porção do órgão considerada nas análises e as denominações das suas respectivas partes.

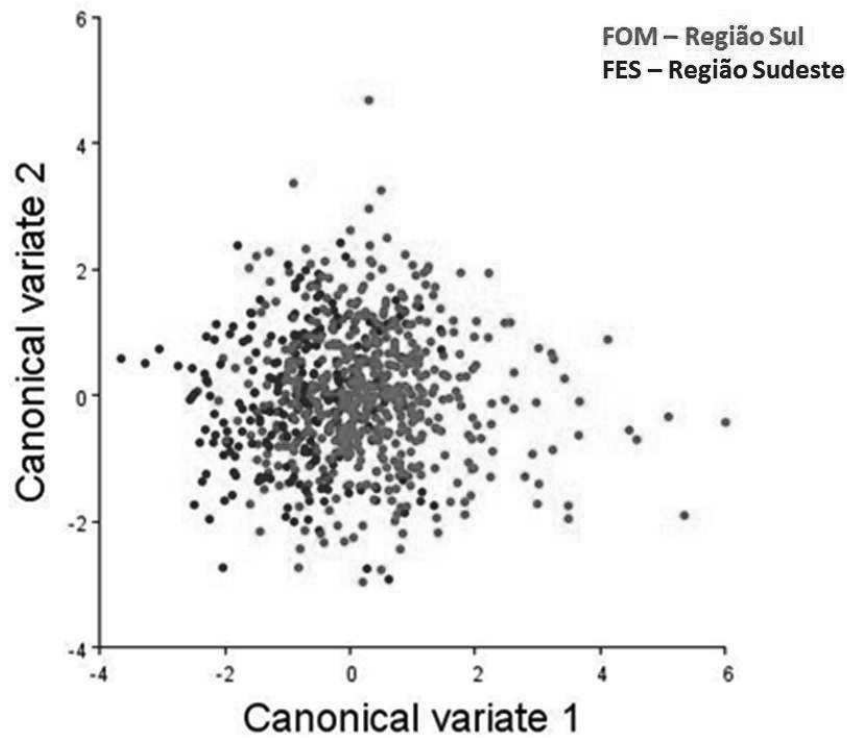


Figura 4. Distribuição da forma das asas de *Drosophila maculifrons* da região sul, principalmente Floresta Ombrófila Mista (em vermelho), e da região sudeste, Floresta Estacional Semidecidual (em azul), no espaço das Variáveis Canônicas (CV1 e CV2), com base na matriz W de componentes uniformes e escores de deformações parciais.

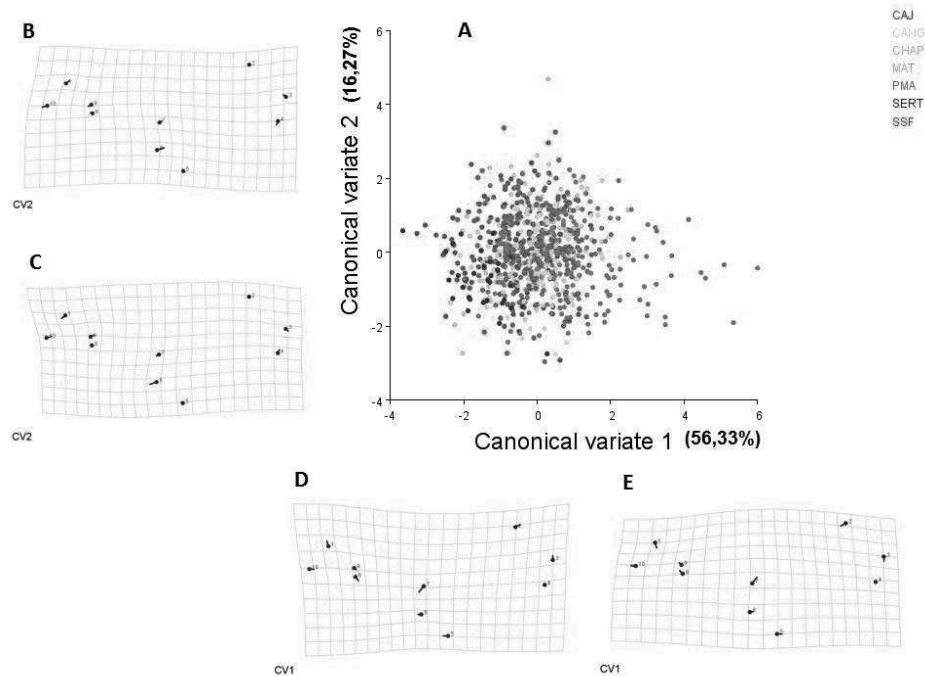


Figura 5. Distribuição das asas de *Drosophila maculifrons* no espaço das Variáveis Canônicas (CV1 e CV2), com base na matriz W de componentes uniformes e escores de deformações parciais. Entre parênteses estão representadas as porcentagens da variância da forma para cada CV. Os gráficos inseridos abaixo do eixo X e à esquerda do eixo Y representam diferenças da forma ao longo de cada eixo indicado como vetores que mostram o deslocamento dos pontos de referência a partir da forma média.

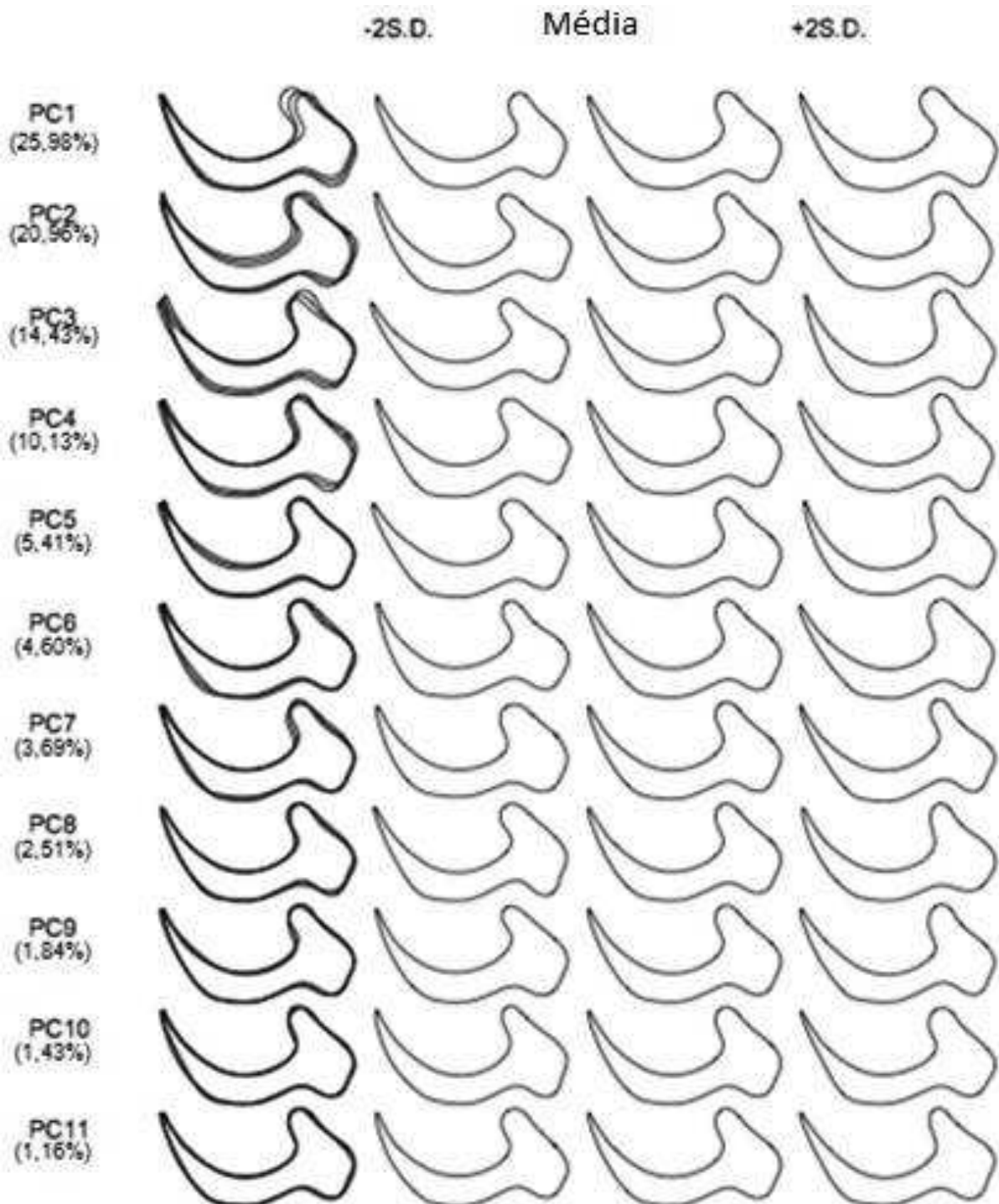


Figura 6. Contorno de reconstrução da variação na forma do edeago a partir das sete populações de *Drosophila maculifrons* descritos por cada componente principal eficaz (PC). A sobreposição de linhas na primeira coluna são áreas de variação do edeago. As colunas restantes fornecem uma visualização sem sobreposição destes mesmos contornos.

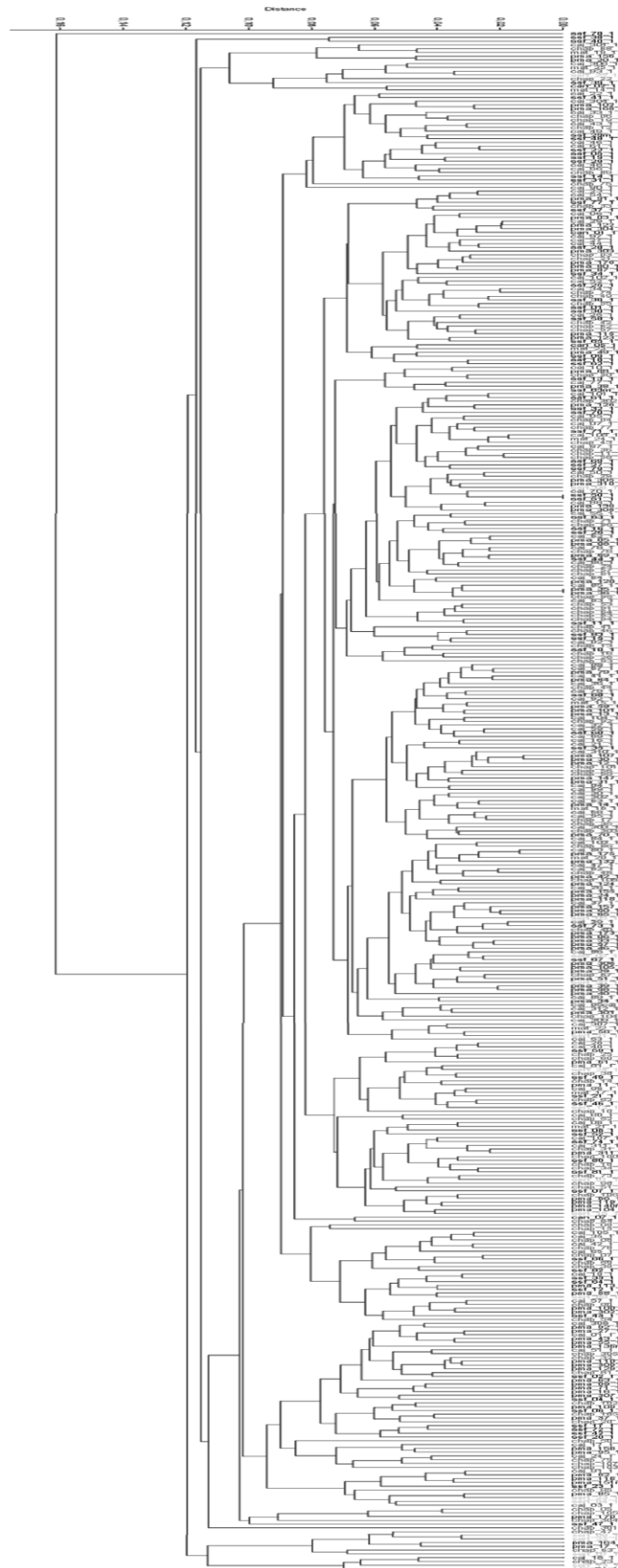


Figura 7. Análise de agrupamento realizado pelo CLUSTER para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *Drosophila maculifrons*. Azul escuro=CANG; Rosa=CHAP; Azul=SSF; Roxo=PMA; Verde=SER; Vermelho=CAJ; Verde escuro=MAT.

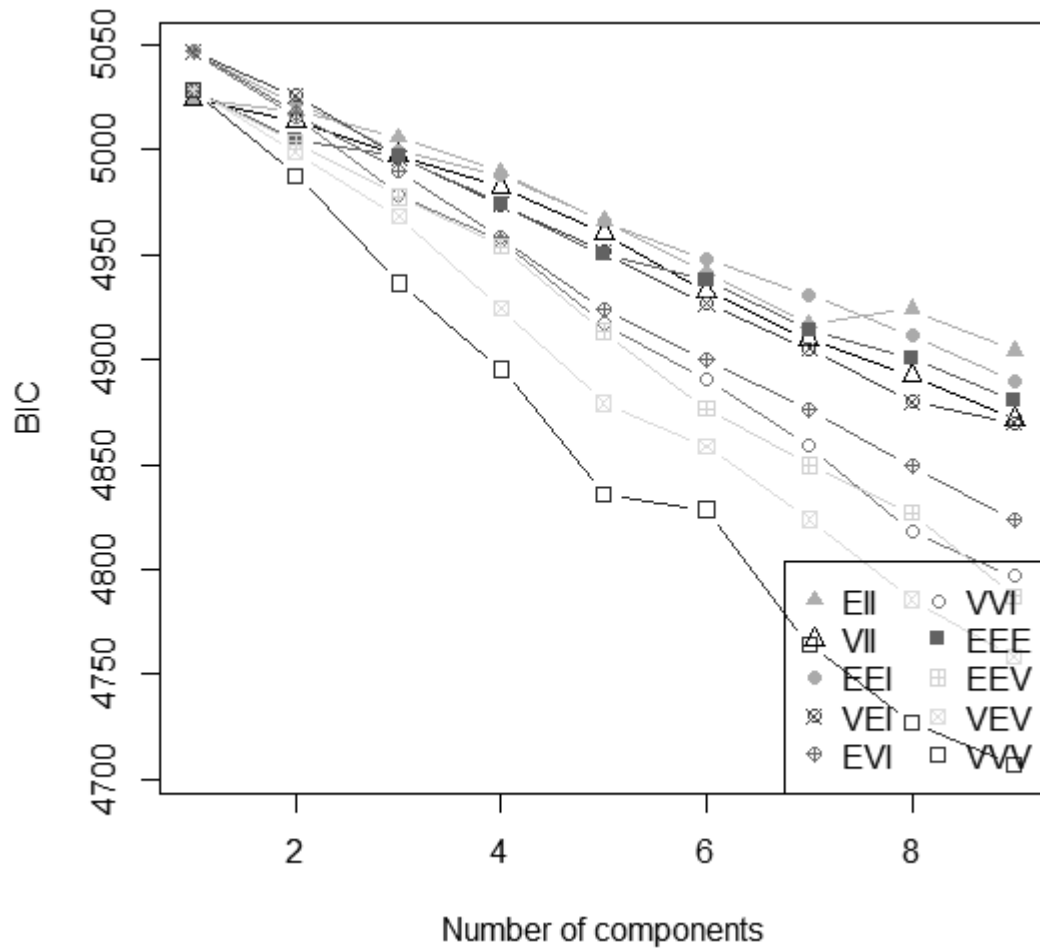


Figura 8. Análise de agrupamento realizado pelo MCLUST utilizando dez modelos (símbolos referentes as linhas no gráfico) para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *Drosophila maculifrons*. BIC = Critério de Informação Bayesiana. Number of components = número de agrupamentos.

Tabela 1. Quantidade de asas direita e edeagos analisados de *Drosophila maculifrons*, por localidade amostrada.

Localidade	<i>D. maculifrons</i>	
	Asas	Edeagos
Canguçu-RS	5	5
Chapecó- SC	100	100
Parque das Araucárias – PR	101	100
Salto São Francisco – PR	71	75
Cajuru – SP	99	100
Matão – SP	8	17
Sertãozinho – SP	16	11
Total	400	408

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para as diferenças intraespecíficas no (a) tamanho (tamanho do centróide) e (b) na forma da asa para sete populações de *Drosophila maculifrons*. *P<0.0001; d.f. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios.

Fonte de Variação	Fator de variância	SS	MS	d.f.	F
(a) Tamanho					
<i>D. maculifrons</i>	Grupos	2670656,382706	445109,397118	6	84,48*
	Resíduos	4178318,524446	5269,001922	793	
<i>D. maculifrons</i> SxSE	Grupos	1526439,625067	1526439,625067	1	228,86*
	Resíduos	5322535,282082	6669,843712	798	
(b) Forma					
<i>D. maculifrons</i>	Grupos	0,01445136	0,0001505350	96	4,64*
	Resíduos	0,41125279	0,0000324127	12688	
<i>D. maculifrons</i> SxSE	Grupos	0,00447117	0,0002794481	16	8,47*
	Resíduos	0,42123298	0,0000329913	12768	

Tabela 3. Distâncias de Procrustes entre as sete populações de *Drosophila maculifrons*. CAJ= Cajuru/SP; CAN = Canguçu/RS; CHA = Chapecó/SC; MAT = Matão/SP; PMA = Parque Municipal das Araucárias-Guarapuava/PR; SER = Sertãozinho/SP; SSF = Parque Municipal São Francisco da Esperança-Guarapuava/PR. *P<0,05 ; **P<0,01.

Populações	CAJ	CAN	CHA	MAT	PMA	SER
CAN	0,0108*	---				
CHA	0,0034*	0,0104*	---			
MAT	0,0098*	0,0096	0,0114*	---		
PMA	0,0072**	0,0139*	0,0060**	0,0150**	---	
SER	0,0095**	0,0127*	0,0109**	0,0075	0,0139**	---
SSF	0,0038*	0,0124*	0,0039*	0,0115**	0,0052**	0,0102**

Tabela 4. Análise de Variância (ANOVA) para a forma do edeago de sete populações de *Drosophila maculifrons*. d.f. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fontes de Variação	d.f.	SS	MS	F
PC1				
Intersecção	1	0,002029	0,002029	1,760179
Populações	6	0,028759	0,004793	4,158271***
Erro	401	0,462224	0,001153	
Total	407	0,490982		
PC2				
Intersecção	1	0,008824	0,008824	10,149510**
Populações	6	0,047465	0,007911	9,099440***
Erro	401	0,348620	0,000869	
Total	407	0,396085		
PC3				
Intersecção	1	0,002804	0,002804	4,470631*
Populações	6	0,021247	0,003541	5,646686***
Erro	401	0,251479	0,000627	
Total	407	0,272726		
PC4				
Intersecção	1	0,001853	0,001853	4,088633*
Populações	6	0,009705	0,001617	3,568628**
Erro	401	0,181750	0,000453	
Total	407	0,191455		
PC5				
Intersecção	1	0,001278	0,001278	5,491764*
Populações	6	0,008905	0,001484	6,377793***
Erro	401	0,093319	0,000233	
Total	407	0,102224		
PC6				
Intersecção	1	0,000131	0,000131	0,728190
Populações	6	0,014675	0,002446	13,557260***
Erro	401	0,072343	0,000180	
Total	407	0,087018		
PC8				
Intersecção	1	0,000007	0,000007	0,062902
Populações	6	0,000558	0,000093	0,794478
Erro	401	0,046905	0,000117	
Total	407	0,047462		
PC9				
Intersecção	1	0,000074	0,000074	0,885053
Populações	6	0,001292	0,000215	2,574613*
Erro	401	0,033534	0,000084	
Total	407	0,034826		

Tabela 5. Teste *Post Hoc* de Tukey para a forma do edeago entre pares das sete populações de *Drosophila maculifrons*. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$. Em negrito estão destacados os quatro primeiros Componentes Principais (PC), que representaram mais de 70% da variação encontrada para os edeagos.

Populações	CAN	CHA	PMA	SER	MAT	CAJ
CAN	---					PC3*e PC5*
CHA		---				PC3**
PMA		PC1**, PC2**, PC3** e PC6**	---		PC1*	PC1**e PC6*
SSF	PC4* e PC5**	PC5**e PC6**	PC1*, PC2**, PC5** e PC6**	PC2**, PC5** e PC6**		PC3*e PC6**
SER	PC4*	PC2**	PC2**	---		PC2**e PC6**

4.2. Capítulo II

Morfometria da asa e do edeago de *Drosophila ornatifrons* (Diptera: Drosophilidae)

Trava, B.M.; Machado, L.P.B. e Mateus, R.P.

4.2.1. Introdução

A utilização de drosofilídeos tem contribuído amplamente para o desenvolvimento das mais diversas áreas da biologia, e a variação morfológica na natureza e evolução do tamanho e formato de órgãos tem sido temas centrais de investigação (IMASHEVA et al., 1995; CARROLL, 2000; GILCHRIST et al., 2000; CARROLL, 2008; HOFFMANN & SHIRRIFFS 2002; CARREIRA et al. 2006; SOTO et al. 2007a, 2010; SOTO, 2012; como exemplos).

Em moscas do gênero *Drosophila* existe uma grande variação com relação à sobrevivência, ao tamanho do corpo, o tempo de desenvolvimento e a ovoposição, e essas diferenças quantitativas provavelmente evoluíram como adaptações à exploração dos diversos recursos disponíveis na natureza (FANARA et al., 1999). Em estudos de variação clinal, tem sido dado mais ênfase com relação ao tamanho do corpo, medido por meio da razão entre o comprimento da asa e a sua área, o peso e o tamanho do tórax (AZEVEDO et al., 1998; IMASHEVA et al., 1995, como exemplos). Além do tamanho, caracteres morfológicos também podem variar na forma.

A asa de *Drosophila* tem sido considerada um modelo apropriado para estudos de evolução morfológica em populações naturais por diversos motivos (BITNER-MATHÉ & KLACZKO, 1999a, 1999b; HUEY et al., 2000), entre eles está o fato de serem estruturas articuladas, facilitando seu manuseio, e tem sido demonstrado que são ferramentas úteis para estudos de morfometria geométrica (PAVLINOV, 2001). Alguns estudos tem encontrado evidências da seleção natural sobre a forma da asa em populações naturais (WEBER, 1990; GILCHRIST & PARTRIDGE, 2001), e outros tem revelado alta herdabilidade da forma (BITNER-MATHÉ & KLACZKO, 1999a, 1999b; MORAES et al., 2004a). Porém, a maior parte dos trabalhos tem estudado as alterações na forma da asa em *Drosophila*

considerando o aspecto do desenvolvimento embrionário (GARCIA-BELLIDO & DE CELIS, 1992; GARCIA-BELLIDO, 1997), e apenas alguns poucos estudos tem examinado a variação quantitativa na forma da asa em populações naturais.

Outro método da morfometria geométrica que tem sido utilizado é o contorno de estruturas, muitas vezes, quando não existem marcos anatômicos homólogos precisos e facilmente identificáveis (ROHLF, 1990; McLELLAN & ENDLER, 1998; MONTEIRO & REIS, 1999). A análise do contorno do edeago é capaz de revelar mudanças na forma, como curvatura e rugosidade, que não são capturados por meio de métodos que utilizam de marcos anatômico, sendo, portanto, uma análise aplicada com sucesso na forma deste órgão reprodutor importante (SOTO, et al., 2007a; FRANCO et al., 2008). Os Descritores Elípticos de Fourier (DEF) têm sido efetivamente aplicados com sucesso à análise biológica de diversas formas em animais (ROHLF & ARCHIE, 1984; FERSON et al., 1985; BIERBAUM & FERSON, 1986; DIAZ et al., 1989; LIU, et al., 1996; LAURIE, et al., 1997).

A espécie *Drosophila ornatifrons* pertence ao grupo *guarani* e tem sido encontrada em fragmentos florestais em todo o Brasil (GOTTSCALK et al., 2008). A Floresta Ombrófila Mista (FOM) concentra-se, principalmente, no Planalto Meridional Brasileiro, na região sul do Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, também na Província de Misiones na Argentina, sucedendo também em refúgios situados nas Serras do Mar e da Mantiqueira (IBGE, 1992; Klein, 1960). Hueck (1972) afirma que a Floresta Ombrófila Mista ocorre principalmente nos três estados da região sul, sendo o estado do Paraná a apresentar a maior extensão desta unidade fitoecológica. A Floresta Ombrófila Mista ocupava, no Paraná, 37% da superfície desse Estado (MAACK, 1981) abrigando uma grande diversidade de espécies. Porém desde o século XVIII, vem sofrendo uma intensa destruição, que se acentuou no começo do século passado até a década de sessenta. Atualmente, somando os três Estados da região sul, restam cerca de 10% de florestas manejadas e apenas 2% de florestas originais dessa fitosionomia (KOCH, 2002). Segundo dados de Britez e colaboradores (2000) e Castella & Britez (2004), no estado do Paraná resta menos de 1% de composições da FOM em estágio avançado de sucessão florestal.

Os estudos que abordam a variação intraespecífica, divergência interespecífica e hibridização podem proporcionar uma abordagem útil para entender as bases genéticas subjacentes da morfologia genital e os processos evolutivos

envolvidos (ARNQVIST, 1997; HOSKEN & STOCKLEY, 2004; SOTO et al., 2007a). A técnica de morfometria geométrica tem sido usada em estudos de diversas áreas, devido à interpretação e comparação dos padrões de variação dos caracteres quantitativos (CAVALCANTI & LOPES, 1990). Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar o nível de diferenciação morfológica de populações naturais de *D. ornatifrons*, amostradas na região sul do Brasil, utilizando a morfometria geométrica da asa e do edeago como marcador, tentando entender a origem e a distribuição desta variação.

4.2.2. Material e Métodos

Neste trabalho foram realizadas coletas de amostras das populações naturais de *Drosophila* localizadas no sul e sudeste do Brasil, porém *D. ornatifrons* só foi encontrada na região sul (Figura 1). Indivíduos de cada população foram coletados a partir de armadilhas abertas, contendo isca de banana, laranja e fermento biológico, distribuídas no chão dentro da mata, e utilizando rede entomológica para captura, de acordo com o método descrito por Dos Santos e colaboradores (2010). As moscas capturadas foram transferidas para tubos contendo meio de cultura e transportadas para o laboratório, onde foram triadas e previamente identificadas por meio de chave de identificação e análise da genitália do macho (FREIRE-MAIA & PAVAN, 1949; VILELA & BÄCHLI, 1990). Após a identificação das espécies pela forma do edeago, foram montadas 43 lâminas de asas direita e 56 lâminas de edeago dos machos adultos de *Drosophila ornatifrons* de todas as populações amostradas (Tabela 1).

Preparação das lâminas

- Asa

Após a identificação das espécies pela forma do edeago, a asa direita de cada indivíduo foi removida e montada em lâminas. As imagens das asas foram capturadas usando um microscópio estereoscópico (Stemi 2000 C, Zeiss) no aumento de 2,5X com câmera 5 MP acoplada. Foram obtidos nove marcos anatômicos do tipo I e um do tipo II utilizando o programa tpsDig 2 (ROHLF, 2005). Segundo Bookstein (1991), a utilização do marco Tipo I tem sentido mais

desenvolvimentista e evolutivo, mas geralmente marcos de referência de Tipo II também podem ser utilizados pois são funcionalmente equivalentes (O'HIGGINS, 2000). Os dez marcos anatômicos estão localizados nas intersecções de veias ou onde a veia encontra as margens da asa (Figura 2). Todas as marcações foram realizadas duas vezes para reduzir o erro de medição (ARNQVIST & MÅRTENSSON, 1998).

- Edeago

A preparação dos edeagos para as análises foi realizada a partir de modificações da técnica descrita por Kaneshiro (1969). Os dois últimos tergitos do abdômen de cada macho foram extraídos com uma microagulha e transferidos a um microtubo com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% e deixado em repouso por 12 horas. Após esse período a peça foi lavada em água destilada e colocada em outro microtubo contendo o corante diluído de Gage (quatro partes de fucsina ácida para uma parte de ácido acético glacial), também repousando por aproximadamente 12 horas. A peça foi lavada novamente em água e colocada em uma lâmina escavada contendo glicerina para a separação dos demais apêndices (*hipandrium* e *epandrium*), deixando somente o edeago. Em seguida, o edeago foi colocado no centro de uma lâmina e sobre ele foi adicionada uma gota de bálsamo do Canadá. Esta lâmina continha duas lamínulas fixadas nas suas extremidades, formando uma base de apoio para a movimentação do edeago na lâmina durante captura de imagem. Sobre o edeago e o bálsamo foi colocada uma lamínula maior. O edeago é uma estrutura tridimensional, complexa e muito pequena. Devido a sua morfologia rígida foi possível, mediante toques suaves na lamínula, posicioná-lo em vista lateral ou frontal. Assim, correções da posição foram realizadas cuidadosamente com o objetivo de posicionar o edeago na lâmina em vista lateral, o edeago foi então fotografado num aumento de 400x utilizando um microscópio Primo Star da Zeiss com câmera 5 MP acoplada. Após a captura, as imagens foram editadas no programa Adobe Photoshop CS6 para criação de arquivos de contorno em preto e branco (Figura 3) para análise no pacote de programas SHAPE v1.3 (IWATA & UKAI, 2002).

Análises morfométricas

- Asa

As análises morfométricas das asas foram realizadas utilizando o programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2011). O tamanho da asa foi estimado pelo tamanho do centróide, que é calculado a partir do centro de gravidade de cada asa por meio da raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada um dos marcos anatômicos (DRYDEN & MARDIA, 1998). Diferenças de tamanho e forma da asa foram testadas por Análise de Variância Univariada (ANOVA).

Para a obtenção da variação na forma, os dez marcos anatômicos foram superpostos segundo o método de quadrados mínimos (BOOKSTEIN, 1996; DRYDEN & MARDIA, 1998), onde as coordenadas x e y foram transladas, proporcionalizadas e rotacionadas, a fim de retirar o efeito de posição, tamanho e sentido (MONTEIRO & REIS, 1999). Sem esses três efeitos as diferenças observadas são referente somente a variação da forma das estruturas. Após, foram obtidas as distâncias de Procrustes entre as populações e foi realizada a análise das variáveis canônicas (CVA). Esta última fornece uma descrição das diferenças entre grupos específicos na diferenciação da forma mesmo quando é utilizada em análises discriminantes realizadas a partir de amostras com observações repetidas, e com base em um grande número de características originais correlacionadas (KHATTREE & NAIK, 2000). Os resultados foram apresentados como distâncias de Procrustes e os seus respectivos graus de significância ($P < 0,05$). Além disso, foi realizada ANOVA de Procrustes, resultando em valores de soma de quadrados (SS) e quadrados médios (MS) (KLINGENBERG & MCINTYRE, 1998; KLINGENBERG et al., 2002). Todas estas análises foram realizadas no programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2011). Também foi realizada a correlação entre a distâncias de procrustes e distâncias geográficas lineares pelo teste de Mantel (1967), utilizando o programa TFGA versão 1.3 (Miller, 1997). A significância da correlação entre as duas matrizes foi testada em 999 permutações aleatórias da matriz de similaridade, gerando uma distribuição nula de coeficientes de correlação, sendo considerado significativo se o resultado igual ou superior 95%.

A análise de agrupamento CLUSTER, técnica multivariada utilizada para discriminar e classificar grupos por meio da separação de indivíduos de uma população em duas ou mais classes, resultando num dendograma, foi realizada no programa PAST 3.01 (KHATTREE & NAIK, 2000).

- Edeago

Para análise morfométrica do edeago foi utilizado o programa SHAPE v1.3. Com este pacote de programas é possível avaliar o contorno de formas baseadas em Descritores Elípticos de Fourier (DEFs), originalmente propostos por Kuhl e Giardina (1982), que delinea qualquer tipo de forma com um contorno bidimensional fechado. As imagens bidimensionais foram utilizadas para obter os Componentes Principais (PC), e contagens com base numa matriz de variância-covariância criada a partir dos coeficientes dos DEFs, utilizando 25 harmônicas. Estes PCs são considerados comparáveis às medições contínuas de características morfológicas e foram usados como tal em análises estatísticas subsequentes. Como os coeficientes de Fourier são normalizados com base na primeira elipse harmônica, o tamanho é desconsiderado na análise estatística.

Após a determinação dos PCs, estes foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (*W*). Os PCs que apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA), e aqueles que não apresentaram tal distribuição foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Estes testes foram aplicados para verificação da existência ou não de diferenciação morfológica entre as populações analisadas. Quando diferenças estatisticamente significativas foram encontradas na ANOVA, o teste *Post Hoc* de Tukey foi realizado, determinando especificamente em quais pares de populações ocorreu tal diferenciação. Estas análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004). A análise de agrupamento CLUSTER foi realizada no programa PAST 3.01 (KHATTREE & NAIK, 2000) para ver a existência de estruturação morfológica, resultando num dendograma.

A existência de estruturação morfológica, sem a existência de qualquer tipo de agrupamento *a priori*, foi determinada por meio da análise de agrupamento no programa MCLUST versão 4.2, utilizando os valores de PC. Este programa é um pacote do programa R (FRALEY & RAFTERY, 2006) que possui um algoritmo de classificação que combina uma classificação hierárquica aglomerativa, baseada em modelos de classificação, com base na probabilidade de classificação, com algoritmos de Expectativa-Maximização (EM) por Máxima Verossimilhança de modelos de mistura multivariada Gaussiana. Este algoritmo testa dez modelos (descritos na seção Material e Métodos do Capítulo I desta dissertação) que diferem em hipóteses sobre a forma e volume, baseado no Critério de Informação Bayesiana

(BIC), resultando em um gráfico que demonstra o número de agrupamentos existentes. Além disso, ele também permite reclassificar os indivíduos dentro dos agrupamentos detectados sem a classificação *a priori*. Cada indivíduo é atribuído a um grupo com uma probabilidade de incerteza.

4.2.3. Resultados

4.2.3.1. Análise das Asas

Variação do Tamanho e na Forma

Para análise da variação no tamanho das asas foi utilizado o centróide, que é a variável de tamanho que não se correlaciona com a forma e não apresenta dependência alométrica. A análise de variância (Tabela 2) mostrou que houve diferença significativa no tamanho das asas entre as cinco populações de *D. ornatifrons*, coletadas na região Sul ($F=18,62$; $p<0,0001$). Na análise da forma das asas, também foi observada diferença significativa entre todas as cinco populações ($F=3,05$; $p<0,0001$).

Distância de Procrustes

O maior valor de distância de Procrustes observado entre as populações de *D. ornatifrons* (Tabela 3) foi entre as populações de Canguçu/RS e Salto São Francisco/PR (0,0176), e a menor foi entre Canguçu/RS e Parque das Araucárias/PR (0,0112), ambas significativas ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente). Este resultado está de acordo com o observado na Figura 4, onde as amostras de Canguçu/RS e Salto São Francisco/PR apresentaram-se mais distantes dentro do eixo da variável canônica 1 (CV1) do que as amostras de Canguçu/RS e Parque das Araucárias/PR. Distância de Procrustes significativa também foi observada entre as populações de Salto São Francisco/PR e o Parque Municipal das Araucárias (0,0114; $p<0,001$). As demais não apresentaram valores significativos (Tabela 3).

Teste de Mantel

O teste de Mantel mostrou que não há correlação significativa entre as matrizes de distância de procruste e geográfica ($r=0.3806$; $p=0,8300$).

Análise das Variáveis Canônicas

A análise das variáveis canônicas para as populações de *D. ornatifrons* (Figura 4) mostrou que os valores médios de CV1 e CV2 representaram cerca de 84,21% da variância total da forma, onde CV1 representou 57,93% da variância, e CV2 representou 26,28% da variância (Figura 4 - A). A distribuição de cada população no espaço das Variáveis Canônicas mostrou que, para CV1, as amostras de Salto São Francisco/PR apresentaram valores positivos e ficaram mais afastadas das amostras das demais populações analisadas, Parque das Araucárias/PR, Chapecó/SC e Canguçu/RS, que apresentaram principalmente valores negativos para CV1. Esta diferenciação provavelmente deve ser devido principalmente a asa de Parque das Araucárias/PR, Chapecó/SC e Canguçu/RS apresentarem uma maior IRVD (delimitada pelos marcos 4, 5, 6 e 7) do que o Salto São Francisco/PR (Figura 4 – D e E). Além disso, nesta comparação, Salto São Francisco apresentou maior diferenciação com relação a Canguçu/RS do que com as demais, o que concorda com os dados das Distâncias de Procrustes (Tabela 3). Com relação a CV2, Chapecó/SC e Canguçu/RS apresentaram a região proximal mais ampla (distanciamento do posicionamento dos marcos 1, 8, 9 e 10) e a parte distal da IVRC mais larga (pelo distanciamento dos marcos 3 e 4) do que Parque das Araucárias/PR e o Salto São Francisco/PR (Figuras 4 – B e C).

Análise de agrupamento CLUSTER

Análise de agrupamento CLUSTER, realizada com todos os indivíduos de *D. ornatifrons* amostrados, resultou no dendograma da Figura 5, onde pode ser observada a reclassificação das amostras agrupando todos os indivíduos de Chapecó-SC com a maioria dos indivíduos de Salto São Francisco-PR, e todos os indivíduos de Canguçu-RS com a maioria dos indivíduos do Parque Municipal das Araucárias-PR.

4.2.3.2. Análise dos Edeagos

Variação da forma do edeago de *Drosophila ornatifrons*

Na análise da forma, incluindo as quatro populações de *D. ornatifrons*, seis

Componentes Principais (PC) foram eficazes e descreveram 95,57% da variação total (Figura 6), sendo que os três primeiros PCs descreveram mais de 80% da variação. Grande parte da variação da forma descrita pelo PC1 ocorreu na região da cabeça, associada com a largura desta parte do edeago, e no comprimento do nariz, afetando a forma da base do tronco. Para o PC2 a variação ocorreu em grande parte associada com o grau de curvatura entre o nariz e a cabeça. Já para o PC3, a variação ocorreu principalmente com relação ao comprimento da base do tronco até a cabeça (Figura 6).

Porém, a ANOVA para PC1 e PC3 a PC8 (PCs com valores seguindo a distribuição normal), e o teste de Kruskal-Wallis para PC2 (PC que apresentou desvio da distribuição normal) mostrou que todas estas diferenças morfológicas entre as populações de *D. ornatifrons* não foram significativas (Tabela 4).

Análise de agrupamento CLUSTER

Análise de agrupamento CLUSTER, realizada utilizando todos os indivíduos de *D. ornatifrons* amostrados, resultou no dendograma da Figura 7, onde pode ser observado que a reclassificação das amostras não mostrou um padrão consistente com a reclassificação dentro das populações, havendo no geral um espalhamento das amostras dentro dos quatro agrupamentos. Isto demonstra que não há um padrão morfológico de estruturação das amostras por meio da análise pelo CLUSTER.

Análise de agrupamento MCLUST

A análise de agrupamento MCLUST, realizada para verificar a existência de estruturação morfológica nos edeagos de *D. ornatifrons* sem uma suposição *a priori* da existência de qualquer agrupamento, resultou em três modelos que melhor explicaram a dispersão dos dados para a forma. Estes modelos foram: "EEV" – distribuição elipsoidal, volume e forma iguais; "VEV" – distribuição elipsoidal, forma igual, e; "VVV" – distribuição elipsoidal, volume, forma e orientação variáveis. De acordo com esses modelos, foram reconhecidos quatro agrupamentos para a variabilidade morfológica total dos edeagos analisados (Figura 8). Dentro destes agrupamentos, o maior número de indivíduos de Canguçu-RS e Salto São Francisco-PR foram agrupados no grupo 2, e a maioria dos indivíduos de Chapecó-SC e Parque das Araucárias-PR foram reclassificados ao grupo 3 conforme mostra a

Tabela 5.

4.2.4. Discussão

As amostras populacionais de *Drosophila ornatifrons* apresentaram diferenças significativas com relação ao tamanho e a forma de suas asas pela análise de variância. Estes resultados corroboram o poder taxonômico deste caráter morfológico, que já havia sido demonstrado para outras espécies de *Drosophila* (SHORROCKS, 1972), inclusive para espécies crípticas. Neste último caso é esperado encontrar uma alta semelhança morfológica, porém, quando são utilizados métodos morfométricos algumas diferenças morfológicas podem ser detectadas e podem permitir a discriminação entre elas (MORAES et al., 2004a, 2004b).

A análise intraespecífica das asas demonstrou que as diferenças significativas para a heterogeneidade da forma e tamanho entre as populações de *D. ornatifrons* podem ser particionadas, permitindo inclusive reconhecer diferentes taxas de desenvolvimento da asa em compartimentos distintos. Neste sentido, a Região Intervenial D (IVRD) foi a porção da asa que melhor discriminou os indivíduos de *D. ornatifrons* coletados no Parque das Araucárias/PR e Canguçu/RS daqueles coletados no Salto São Francisco/PR e na análise de agrupamento CLUSTER houve uma aproximação entre as amostras do PMA e CAN e um afastamento dos indivíduos de SSF. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para duas outras espécies de *Drosophila* endêmicas da América do Sul, *D. buzzatii* e *D. koepferae*, que são espécies cactofílicas que utilizam tecidos de cactos em decomposição como sítios de oviposição e alimentação larval (revisão em MANFRIN & SENE, 2006). Soto e colaboradores (2008a) observaram uma resposta plástica da IVRD relacionada com a criação de diferentes linhagens destas moscas em diferentes tipos de cactos hospedeiros naturais.

Já os dados de análise de variância para a forma do edeago evidenciaram que as variações morfológicas detectadas entre as populações amostradas de *D. ornatifrons* não são significativas. Portanto, não podemos considerar que houve diferenciação morfológica para a forma do edeago nesta espécie considerando esta análise. Por outro lado, quando foi aplicada a análise de agrupamento por meio do programa CLUSTER, não houve um padrão consistente de agrupamento e através do

programa MCLUST, foram identificados quatro agrupamentos distintos. Porém, a reclassificação das amostras para essas duas análises, não mostraram um padrão consistente com a reclassificação dentro das populações amostradas, havendo no geral um espalhamento das amostras dentro dos quatro agrupamentos. Isto demonstra que não há um padrão morfológico de estruturação das amostras por meio da análise pelo CLUSTER e MCLUST. Estas análises nesta espécie, ANOVA, CLUSTER e MCLUST, devem ser consideradas com cautela devido ao tamanho reduzido de amostras.

Em condições ambientais heterogêneas, variações fenotípicas na asa podem ocorrer principalmente devido a dois fatores, a temperatura e/ou a utilização diferencial de recursos. Este tipo de observação tem sido detectado em alguns trabalhos, onde foram demonstradas a ocorrência de variações no tamanho e na forma de acordo com estações climáticas (TANTAWY, 1965; KARI & HUEY, 2000) e com a exploração de diferentes recursos, tais como diferentes cactos hospedeiros (CARREIRA et al., 2006). Porém, resultado diferente foi encontrado para a variação no edeago, não ocorrendo diferenciação entre as populações de *D. ornatifrons*. Isto corrobora a ideia de que a diferenciação nos caracteres da genitália masculina sofrida pelos indivíduos nem sempre é acompanhada por igual diferenciação na morfologia do restante do corpo (VILELA, 1983).

Em um estudo paralelo utilizando a espécie *D. maculifrons*, que é filogeneticamente próxima a *D. ornatifrons* (capítulo 1 desta dissertação), foi evidenciado que há diferenças significativas para o tamanho e para a forma das asas e para a forma de seus edeagos nesta espécie. Estudos recentes (GUSTANI, 2013; CENZI-DE-RÉ et al., *in press*) mostraram que *D. ornatifrons* e *D. maculifrons*, que são espécies próximas relacionadas filogeneticamente, apresentam baixa variabilidade molecular em genes do DNA mitocondrial, com evidências de expansão do sul para o sudeste do Brasil. Então, como as diferenças nos resultados entre as duas espécies podem ser explicadas?

No caso de *D. ornatifrons*, todas as amostras analisadas são provenientes áreas de ocorrência de Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucária), o que pode ter sido um fator importante para a observação de ausência de diferenciação morfológica para o edeago. No caso de *D. maculifrons* (Capítulo 1 desta dissertação), nas localidades do sul do Brasil onde ela foi coletada ocorre a presença de Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucária), e no sudeste ocorre

Floresta Estacional Semidecidual (Mata Atlântica de Interior). Estas duas fitofisionomias são bem diferenciadas, principalmente quanto ao padrão de chuvas, temperatura e umidade (GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2003; RIBEIRO et al., 2009), fatores que podem ter levado a maior diferenciação morfológica do edeago entre suas populações.

Diferentes estudos mostram que o ambiente onde as espécies se desenvolvem tem grande influência na sua morfologia. Por exemplo, a utilização de espécies de diferentes cactos hospedeiros tem alterado de forma significativa o tamanho e a forma do edeago e das asas em espécies do cluster *D. buzzatii* (SOTO, et al., 2007a, 2008a, 2008b, 2010; SOTO, 2012), mostrando que a divergência e a evolução dessas espécies estão relacionadas à história do uso de diferentes sítios de ovoposição (HASSON, et al., 1992; FANARA, et al., 1999; SOTO, et al., 2007b, 2008c). Além disso, também foi demonstrado nestes drosofilídeos cactofílicos que os sistemas sensoriais, o tempo de desenvolvimento, a ovoposição e a forma de sobrevivência podem acelerar a divergência quando associadas à mudanças de cacto hospedeiro como novo recurso (FANARA & HASSON, 2001; MARKOW & O'GRADY, 2005; McBRIDE, 2007). Essa mudança de hospedeiro pode ter como consequência a evolução de isolamento sexual entre populações (COYNE & ORR, 2004; ETGES et al., 2006).

Os elementos do clima como a luminosidade, o vento e a água, são complexamente relacionados, tornando o clima um fator determinante da vegetação, pois influencia diretamente a disponibilidade de água e temperatura do ambiente e recursos (PIANKA, 1994). Dados de levantamento de fauna sugerem que um dos fatores determinantes para a captura de *D. ornatifrons* somente na região sul deste trabalho seja a ocorrência de umidade alta e temperatura amena, visto que a maior frequência de indivíduos desta espécie é observada em áreas mais úmidas da Mata Atlântica do sul e sudeste do Brasil (MEDEIROS & KLACZKO, 2004; GOTTSCHALK et al., 2007; DÖGE et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010; HOCHMÜLLER et al., 2010; CAVASINI et al., *in press*), e em florestas de galeria do Cerrado (TIDON, 2006). Ela tem sido raramente coletada ou está ausente na Floresta Amazônica (MARTINS, 1987; ACURIO & RAFAEL, 2009), na fitofisionomia Floresta Semidecídua da Mata Atlântica (MEDEIROS & KLACZKO, 2004), no Cerrado *stricto sensu* (TIDON, 2006), em manguezais (SCHMITZ et al., 2007), em áreas de restinga (BIZZO et al., 2010), em matas de Floresta Ombrófila Densa do litoral (MEDEIROS &

KLACZKO, 2004), e no Pampa gaúcho (POPPE et al., 2012).

A baixa frequência de indivíduos de *D. ornatifrons* na fitofisionomia Floresta Semidecídua da Mata Atlântica, um ambiente com baixa umidade relativa, também foi evidenciada nas coletas para este trabalho e para o de Gustani (2013), realizadas quatro vezes entre setembro de 2010 e novembro de 2012, em cada uma de três áreas distintas no sudeste do Brasil. Mesmo utilizando metodologia de coleta mais adequada para captura de espécimes da “radiação” *tripunctata* (MEDEIROS & KLACZKO, 2004; DOS SANTOS et al., 2010), e em períodos mais úmidos, nenhum indivíduo de *D. ornatifrons* foi coletado, enquanto espécimes de *D. maculifrons* foram capturados em abundância nestas mesmas áreas. Ainda, regiões de mata mais propícias para a captura desta espécie muitas vezes apresentam baixa frequência de indivíduos (como indicado pelo pequeno número amostral deste trabalho - Tabela 1), sugerindo que além dos fatores abióticos (temperatura e umidade), fatores ecológicos ainda não identificados também parecem ser importantes para a ocorrência de *D. ornatifrons*. Estudos sobre anurofauna de florestas brasileiras mostra registro de menor riqueza de espécies de anuros em FES, quando comparada a taxocenoses de Floresta Ombrófila (HADDAD & SAZIMA, 1992; TOLEDO et al., 2003; BERTOLUCI et al., 2007; ZINA et al., 2007; SANTOS et al., 2009), possivelmente decorrente do menor grau de heterogeneidade estrutural da paisagem e da menor diversidade de habitats e microhabitats úmidos disponíveis às espécies (HADDAD & PRADO, 2005). Este estudo sobre a composição de espécies de anuros de áreas de Floresta Estacional Semidecídua é mais semelhante às registradas em áreas do Cerrado, do Pantanal e até mesmo do Pampa do que as encontradas na Floresta Ombrófila. Esse padrão pode ser resultado tanto da sazonalidade climática daquelas áreas, com estação seca bem definida, favorecendo a ocorrência de espécies generalistas que se reproduzem em corpos d’água de áreas abertas (VASCONCELOS & ROSSA-FERES, 2005; SANTOS et al., 2007), como da distância geográfica que ocorre entre essas áreas e os centros de diversificação de anuros, como a Floresta Ombrófila (CARNAVAL et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

Assim, a variação morfológica da asa observada entre as populações de *D. ornatifrons* pode estar relacionada com aspectos ecológicos das mesmas, com esta espécie provavelmente possuindo uma maior especificidade ecológica, o que acaba limitando a sua ocorrência. Por outro lado, *D. maculifrons* deve ser mais generalista

e por este motivo deve provavelmente sofrer menor pressão ambiental quando comparada com *D. ornatifrons*. Segundo Gottschalk e colaboradores (2008), espécies do grupo *guaramunu*, *D. maculifrons* e *D. griseolineata*, foram observadas em fungos coletados em áreas florestais e ambientes antropizados na região sul e sudeste do Brasil. Geralmente os drosofilídeos encontrados em áreas antropizadas são mais versáteis, utilizando maior fonte de recurso para alimentação e reprodução.

Deste modo, a distribuição atual das populações desta espécie em fragmentos de Mata Atlântica do sul do Brasil, assim como a sua variabilidade genética e morfológica, pode ser resultado da combinação de fatores climáticos recentes e históricos, com fatores ecológicos, paleogeográficos, e também devido a ocorrência de possíveis refúgios.

4.2.5. Referências Bibliográficas

ACURIO, A.E.; RAFAEL, V.L. Inventario taxonómico de Drosophilidae (Diptera) en el Parque Nacional Yasuni, Amazonia Ecuatoriana. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 713-718, 2009.

ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biol J Linn.**, v. 60, p. 365–379, 1997.

ARNQVIST, G.; MÅRTENSSON, T. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. **Acta Zoologica Academia Scientiarum Hungaricae**, v. 44, p. 73-96, 1998.

AZEVEDO, R.B.R.; JAMES, A.C.; McCABE, J.; PARTRIDGE, L. Latitudinal variation of wing:thorax size ratio and wing-aspect ratio in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 52, p. 1353–1362, 1998.

BERTOLUCI, J.; BRASSALOTI, R.A.; JÚNIOR, J.W.R.; VILELA, V.M.F.N.; SAWAKUCHI, H.O. Species composition and similarities among anuran assemblages of forests in southeastern Brazil. **Sci Agric.**, v. 64, p. 364 – 374, 2007.

BIERBAUM, R.M.; FERSON, S. Do symbiotic pea crabs decrease growth rate in mussels? **Biol. Bull.**, v. 170, p. 51-61, 1986.

BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L.B. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. **Heredity**, v. 83, p. 688–696, 1999a.

BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L.B. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. **Genetica**, v. 105, p. 35–42, 1999b.

BIZZO, L.; GOTTSCHALK, M.S.; DE TONI, D.; HOFMANN, P.R.P. Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potencial as bioindicator in open environments. **Iheringia Ser. Zool.**, v. 100, p. 185-191, 2010.

BOOKSTEIN, F.L. Morphometric tools for landmark data. Geometry and Biology. **Cambridge University Press.**, p. 435, 1991.

BOOKSTEIN, F.L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bull. Math. Biol.**, v. 58, p. 313-365, 1996.

BRITEZ, R. M.; CASTELLA, P. R.; TIEPOLO, G.; PIRES, L.A. Estratégias de conservação da floresta com Araucária para o Estado do Paraná – Diagnóstico da vegetação. In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 2., 2000, Campo Grande. **Anais**. [S.I.]: Rede Nacional Pró-Unidades de Conservação, v.3, p. 731-737, 2000.

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C.M. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785 – 789, 2009.

CARREIRA, V.; SOTO, I.M.; FANARA, J.J.; HASSON, E. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1275–1282, 2006.

CARROLL, S. B. Endless Forms: The Evolution Minireview of Gene Regulation and Morphological Diversity. *Cell*. v. 101, p. 577–580, 2000.

CARROLL, S.B. Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: A Genetic Theory of Morphological Evolution. *Cell*, v.134,p. 25-36, 2008.

CASTELLA, P.R.; BRITZ, R. M. **A Floresta com Araucária no Estado do Paraná**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 236, 2004.

CAVALCANTI, M.J.; LOPES, P.R.D. Morfometria comparada de *Ctenosciaena gracilicirrus*, *Paralonchurus brasiliensis* e *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) pela análise multivariada de redes de treliças. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, p. 627-635, 1990.

CAVASINI, R.; BUSCHINI, M.L.T.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R.P. Comparison of *Drosophilidae* (Diptera) Assemblages from two Highland Araucaria Forest Fragments, with and without Environmental Conservation Policies. **Braz. J. Biol.**, *in press*.

CENZI-DE-RÉ, F.; GUSTANI, E.C.; OLIVEIRA, A.P.F.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R.P.; LORETO, E.L.S.; ROBE, L.J. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera, Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. **Biol. J. Linn. Soc. Lond.**, *in press*.

COYNE, J.A.; ORR, H.A. **Speciation**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 2004.

DIAZ, G.; ZUCCARELLI, A.; PELLIGRA, I.; GHIANI, A. Elliptic Fourier analysis of cell and nuclear shapes. **Comp. Biomed. Res.**, v. 22, p. 405-414, 1989.

DÖGE, J.S.; VALENTE, V.L.S., HOFMANN, P.R.P. *Drosophilids* (Diptera) from an Atlantic Forest area in Santa Catarina, southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.52, p.615-624, 2008.

DOS SANTOS, K.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R.P. 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.**, v. 93, p. 185-188, 2010.

DRYDEN, I.L.; MARDIA, K.V. Statistical shape analysis. **Chichester**: Wiley, 1998.

ETGES, W.J.; VEENSTRA, C.L.; JACKSON, L.L. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. **J. Chem. Ecol.**, v. 32, p. 2629-2646, 2006.

FANARA, J. J.; HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. **Evolution**, v. 55, p. 2615-2619. 2001.

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

FERSON, S., ROHLF, F.J., KOEHN, R.K. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. **Syst. Zool.**, v. 34, p. 59-68, 1985.

FRALEY, C.; RAFTERY, A.E. **MCLUST version 3 for R: normal mixture modeling and model-based clustering**. CiteSeerX, The Pennsylvania State University, University Park, PA. 2006.

FRANCO, F.F.; SOTO, I.M.; SENE, F.M.; MANFRIN, M.H. Phenotypic variation of the aedeagus of *Drosophila serido* Vilela & Sene (Diptera: Drosophilidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 37, p. 558-563. 2008.

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

GALINDO-LEAL, C., CÂMARA, I. Atlantic forest hotspots status: an overview. In: **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Galindo-Leal, C., Câmara, I. (Eds.), CABS and Island Press, Washington, p. 3-11, 2003.

GARCIA-BELLIDO, A. Inductive mechanisms in the process of wing vein formation in *Drosophila*. **Wilh. Roux Arch.**, v.182, p.93–106, 1997.

GARCIA-BELLIDO, A.; DE CELIS, J.F. Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 26, p. 277–304, 1992.

GILCHRIST, A.S.; PARTRIDGE, L. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, v. 86, p. 144–152, 2001.

GILCHRIST, A.S.; AZEVEDO, R.B.R.; PARTRIDGE, L.; O’HIGGINS, P. Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. **Evolution and Development**, v. 2, p. 114–124, 2000.

GOTTSCHALK, M.S.; DE TONI, D.C.; VALENTE, V.L.S.; HOFMANN, P.R.P. Changes in Brazilian *Drosophilidae* (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 848–862, 2007.

GOTTSCHALK, M.S.; HOFMANN, P.R.P.; VALENTE, V.L.S. Diptera, *Drosophilidae*: historical occurrence in Brazil. **Check List**, v. 4, p. 485-518, 2008.

GUSTANI, E.C. **Filogeografia de duas espécies de *Drosophila* dos grupos *guaramunu* e *guarani***. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, UNICENTRO, Guarapuava-PR, 2013.

HADDAD, C.F.B.; PRADO, C.P.A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **Bioscience**, v. 55, p. 207 – 217, 2005.

HADDAD, C.F.B.; SAZIMA, I. **Anfíbios anuros da Serra do Japi**. In: MORELLATO,

L.P.C. (ed.), História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. 1st ed. Campinas (Brazil): Editora UNICAMP/FAPESP, p. 188–211, 1992.

HASSON, E.; NAVEIRA, H.; FONTDEVILA, A. The breeding sites of the Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila repleta* group). **Rev. Chil. Hist. Nat.**, v. 65, p. 319-326, 1992.

HOCHMÜLLER, C.J.; LOPES-DA-SILVA, M.; VALENTE, V.L.S.; SCHMITZ, H.J. 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. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, p. 285-295, 2010.

HOFFMANN, A.A.; SHIRRIFFS, J. Geographic Variation for Wing Shape in *Drosophila serrate*. **Evolution**, v. 56, p.1068–1073, 2002.

HOSKEN, D.J., STOCKLEY, P. Sexual selection and genital evolution. **Trends Ecol Evol.**, v.19, p.87-93, 2004.

HUECK, K. A região das Matas de Araucária do Sul do Brasil. **As florestas da América do Sul**. Polígono, São Paulo. p. 236-239, 1972.

HUEY, R.B.; GILCHRIST, G.W.; CARLSON, M.L.; BERRIGAN, D.; SERRA, L. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. **Science**, v. 287, p.308-309, 2000.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira. Série - Manuais Técnicos em Geociências**, n.1, Rio de Janeiro: IBGE, 1992

IMASHEVA, A. G.; BUBLI, O.A.; LAZEBNY, O.E.; Zhivotovsky, L.A. Geographic differentiation in wing shape in *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 96, p.303–306, 1995.

IWATA, H., UKAI, Y. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. **J. Hered.**, v. 93, p. 384-385, 2002.

KANESHIRO, K. Y. A study of the relationship of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. **Univ. Tex. Publs.**, v. 6918, p. 55-70, 1969.

KARI, J.S.; HUEY, R.B. Size and seasonal temperature in free-ranging *Drosophila subobscura*. **Journal of Thermal Biology**, v. 25, p. 267 -272, 2000.

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

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Selowia**, n.12, p.17-44, 1960.

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

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

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

KOCH, Z. **Araucária**: a floresta do Brasil Meridional. Curitiba: Olhar Brasileiro. p.148, 2002.

KUHL, F.P.; GIARDINA, C.R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **Comp. Graph. Imag. Proc.**, v.18, p. 236-258, 1982.

LAURIE, C.C.; TRUE, J.R.; LIU, J.; MERCER, J.M. An introgression analysis of

quantitative trait loci that contribute to a morphological difference between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. **Genetics**, v. 145, p. 339-348, 1997.

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

MAAK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Rio de Janeiro: J. Olympio, p.450, 1981.

MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. Cactophilic *Drosophila* in South America: a model for evolutionary studies. **Genetica**, v. 126, p. 57–75, 2006.

MARKOW, T.A.; O'GRADY, P.M. Evolution genetics of reproductive behavior in *Drosophila*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 263–291. 2005.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, Baltimore. v. 27, n. 2, p. 209-220, 1967.

MARTINS, M. 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. Museu Paraense Emilio Goeldi**, v. 3, p.195-218, 1987.

McBRIDE, C. S. Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host-specialization in *Drosophila sechellia*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, p. 4996-5001, 2007.

McLELLAN, T.; ENDLER, J.A. The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects. **Syst. Biol.**, v. 47, p. 264–281, 1998.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. [S. I.]: Software de computador distribuído pelo autor, 1997. Disponível em:

<<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

MEDEIROS, H.F.; KLACZKO, L.B. How many species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forest of São Paulo, Brazil? Species list of three forest remnants. **Biota Neotropica**, v. 4, p. 1-12, 2004.

MONTEIRO, L.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica**. Holos Editora. 188 p. 1999.

MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: **Holos**, p.198, 1999.

MORAES, E.M.; MANFRIN, M.H.; LAUS, A.C.; ROSADA, R.S.; BOMFIN, S.C.; SENE, F.M. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. **Heredity**, v. 92, p. 466–473, 2004a.

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

O'HIGGINS, P. Study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. **J. Anat.**, v. 197, p. 103-120, 2000.

PAVLINOV, I.Y. Geometric morphometrics, a new analytical approach to comparison of digitized images, in: Information Technology in Biodiversity Research. **Abstracts of the 2nd. International Symposium**, St. Petersburg. p. 41-90, 2001.

PIANKA, E.R. **Evolutionary ecology**. 5 ed. New York: Harper Collins College Publishers, p. 486, 1994.

POPPE, J.L.; VALENTE, V.L.S.; SCHMITZ, H.J. Structure of *Drosophilidae* assemblage (Insecta, Diptera) in Pampa Biome (São Luiz Gonzaga, RS). **Pap. Avulsos Zool.**, v. 52, p. 185-195, 2012.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distribution? Implications for conservation. **Biol. Conserv.**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 21, p. 299–316. 1990.

ROHLF, F. J. TpsDig version 2.05. Digitize landmarks and outlines. Department of Ecology and Evolution, **State University of New York at Stony Brook**, 2005.

ROHLF, F.J.; ARCHIE, J.W. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Ritera: culicidae). **Syst. Zool.**, v. 33, p. 302-317, 1984.

SANTOS, T.G.; ROSSA-FERES, D.C.; CASATTI, L. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. **Iheringia (Zool.)**, v. 97, p. 37 – 49, 2007.

SANTOS, T.G.; VASCONCELOS, T.S.; ROSSA-FERES, D.C.; HADDAD, C.F.B. Anurans of a seasonally dry tropical forest: Morro do Diabo State Park, Sao Paulo State, Brazil. **J. Nat. Hist.**, v. 43, p. 973 – 993, 2009.

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

SHORROCKS, B. *Drosophila*. Ginn & Company Limited: London. 1972.

SOTO, I.M. Aedeagal Divergence in Sympatric Populations of Two Sibling Species of Cactophilic *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): Evidence of Character Displacement? **Neotrop Entomol.**, v. 41, p. 207–213, 2012.

SOTO, I.M.; CARREIRA, V.P.; FANARA, J.J.; HASSON, E. Evolution of male genitalia: Environmental and genetic factors affect genital morphology in two

Drosophila sibling species and their hybrids. **BMC Evol. Biol.**, v. 7, p. 77, 2007a.

SOTO, I.M.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M.; HASSON, E. Viability and developmental time in the cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera: Drosophilidae) are dependent of the cactus host. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 4, p. 490–496. 2007b.

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

SOTO, I.M.; MANFRIN, M.H.; HASSON, E. Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic *Drosophila*. **J. Zool. Syst. Evol. Res.**, v. 46, p.368-373, 2008b.

SOTO, E.M.; SOTO, I.M.; CARREIRA, V.P.; FANARA, J.J.; HASSON, E. Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 126, p. 18-27, 2008c.

SOTO, I.M.; SOTO, E.M.; CORIO, C.; CARREIRA, V.P.; MANFRIN, M.; HASSON, E. Male Genital and Wing Morphology in the Cactophilic Sibling Species *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* and Their Hybrids Reared in Different Host Plants. **Environmental Entomology**, v. 39, p. 865-873, 2010.

STATSOFT, Inc. Statistica (data analysis software system). version 7. www.statsoft.com. 2004.

TANTAWY, A. O. Studies on natural populations of *Drosophila*. III. Morphological and genetic differences of wing length in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* in relation to season. **Evolution**, v. 18, p. 560 -570, 1965.

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 87, p. 233–247, 2006.

TOLEDO, L.F.; ZINA, J.; HADDAD, C.F.B. Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de anfíbios anuros do município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. **Holos Environ.**, v. 3, p. 136 – 149, 2003.

VASCONCELOS, T.S.; ROSSA-FERES, D.C. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. [Internet]. **Biota Neotrop.** [serial online]; v. 5, 2005. [cited 2008 May 14]. Available from: <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?article+BN0170502>. 2005.

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

VILELA, C.R.; BÄCHLI, G. Taxonomic studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). **Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft**, v. 63, p.1-332, 1990.

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

ZINA, J.; ENNSER, J.; PINHEIRO, S.C.P.; HADDAD, C.F.B.; TOLEDO, L.F. Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do Estado, sudeste do Brasil. [Internet]. **Biota Neotrop.** [serial online]; v. 7, 2007 [cited 2008 April 15]. Available from: <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n2/pt/abstract?article+bn0060702>. 2007.

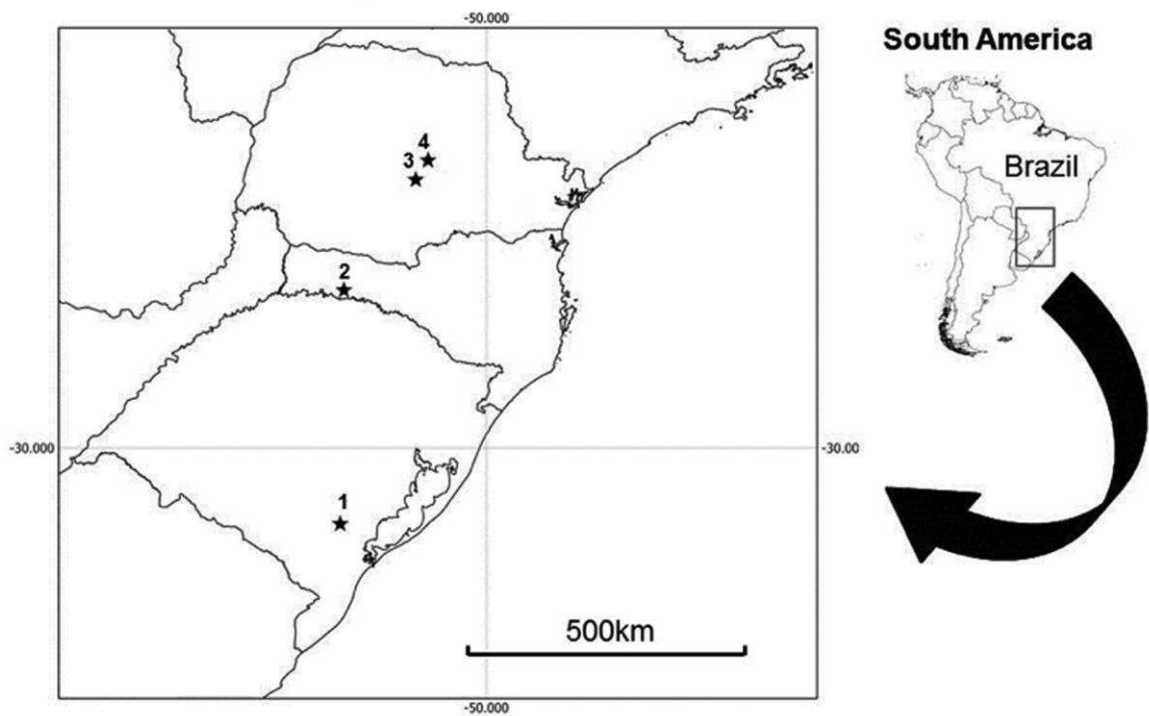


Figura 1. Mapa das localidades de coleta de *Drosophila ornatifrons* no sul do Brasil. 1 - Canguçu-RS; 2 - Chapecó-SC; 3 - Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR; 4 - Salto São Francisco, Guarapuava-PR.

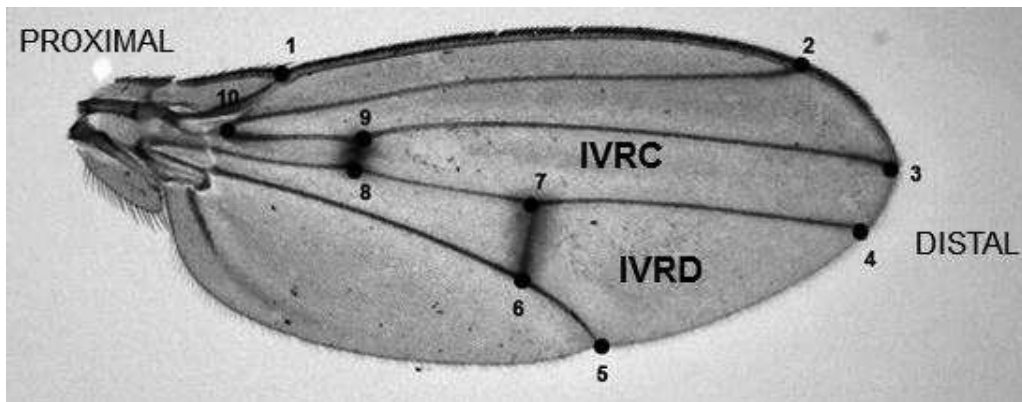


Figura 2. Imagem da asa direita de *Drosophila ornatifrons* mostrando a posição dos marcos anatômicos do tipo I (2 a 10) e do tipo II (1). IVRC = região intervenal C; IVRD = região intervenal D; de acordo com Birdsall et al. (2000).

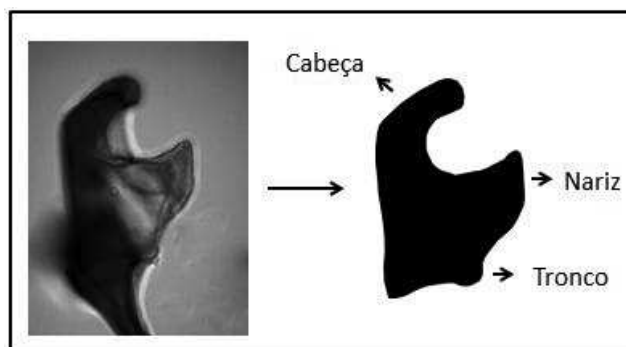


Figura 3. Vista lateral de eedeago de *Drosophila ornatifrons*, evidenciando a área do contorno da porção do órgão considerada nas análises e as denominações das suas respectivas partes.

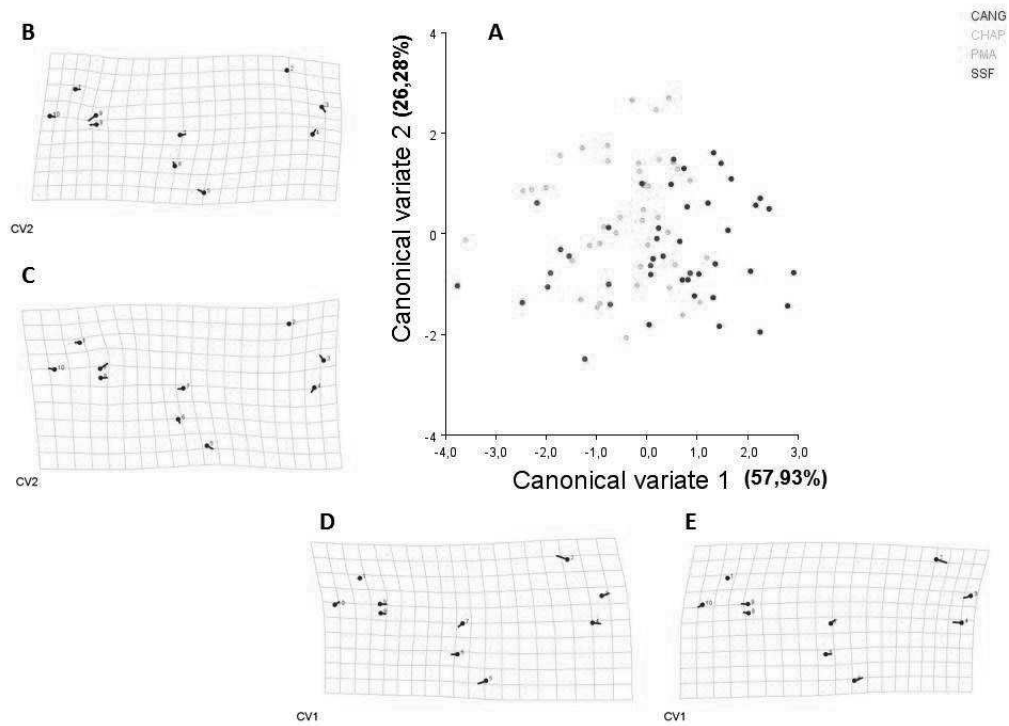


Figura 4. Distribuição das asas de *Drosophila ornatifrons* no espaço das Variáveis Canônicas (CV1 e CV2) com base na matriz W de componentes uniformes e escores de deformações parciais. Entre parênteses estão representadas a porcentagens da variância da forma para cada CV. Os gráficos inseridos abaixo do Eixo X e à esquerda do Eixo Y representam diferenças da forma ao longo de cada eixo representado como vetores que indicam o deslocamento dos pontos de referência a partir da forma média.

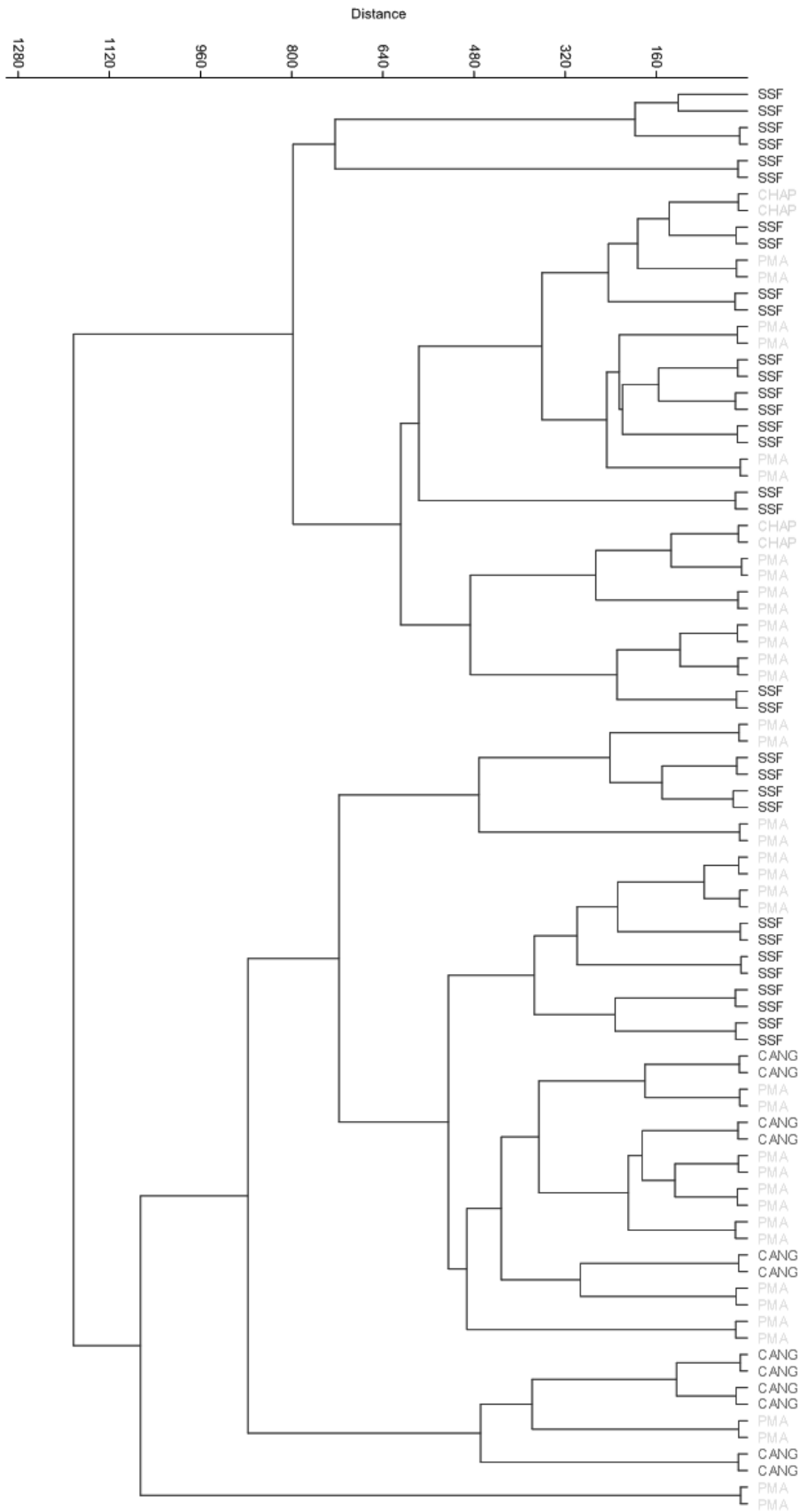


Figura 5. Análise de agrupamento realizado pelo CLUSTER para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) das asas de *Drosophila ornatifrons*.

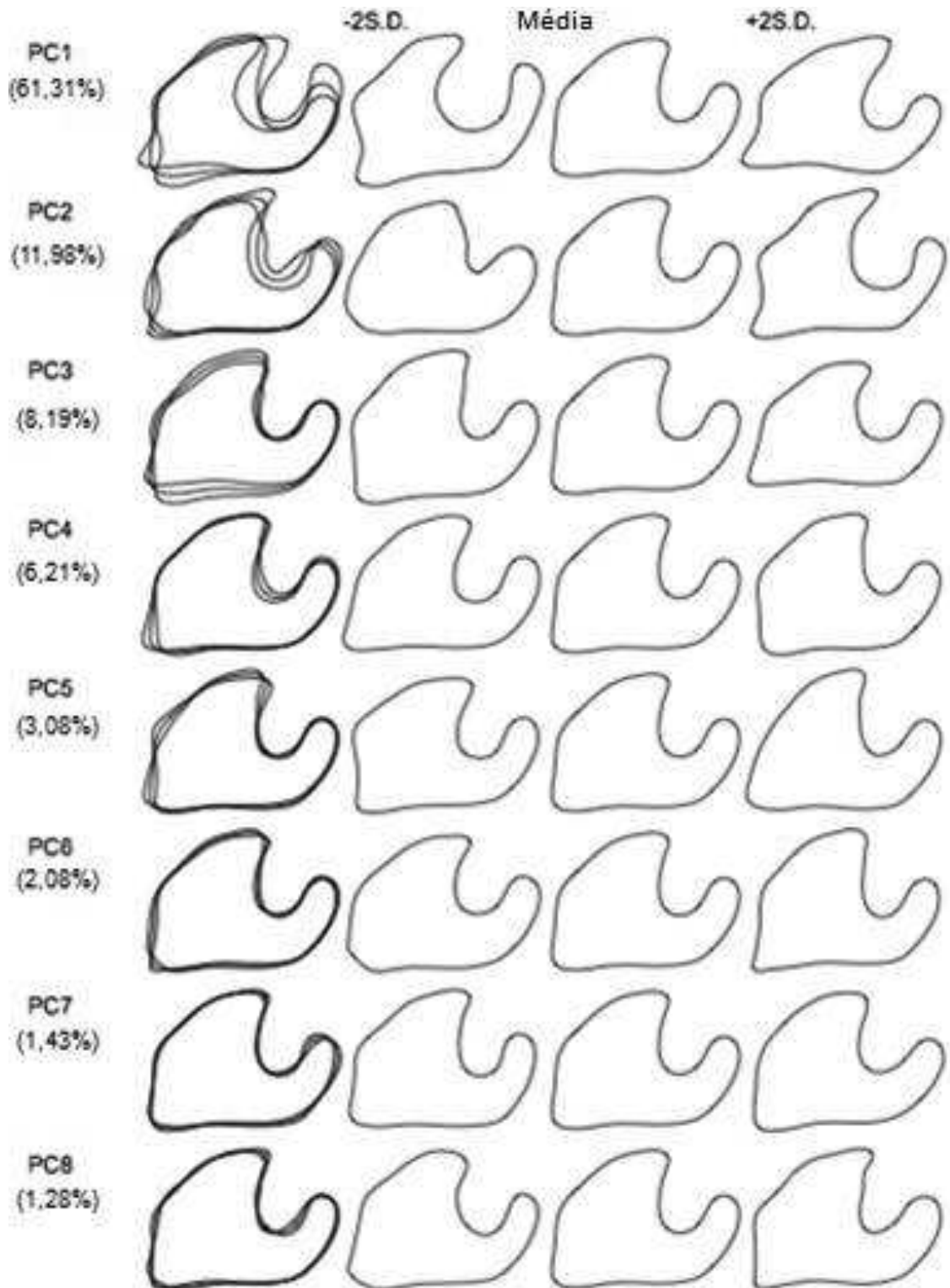


Figura 6. Contorno de reconstrução da variação na forma do edeago a partir das quatro populações de *Drosophila ornatifrons* descritos por cada componente principal eficazes (PC). A sobreposição de linhas na primeira coluna são áreas de variação do edeago. As colunas restantes fornecem uma visualização sem sobreposição destes mesmos contornos.

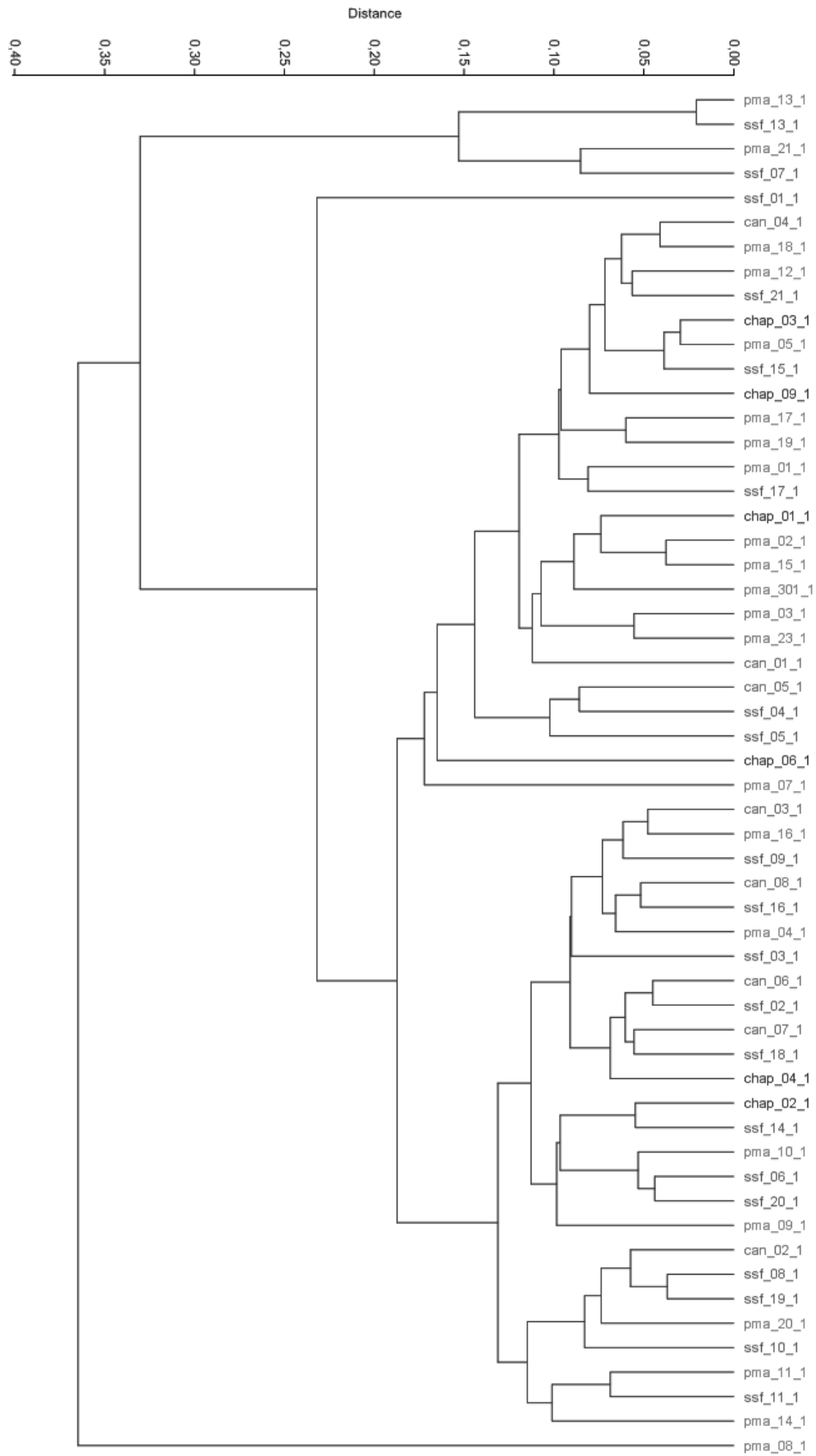


Figura 7. Análise de agrupamento realizado pelo CLUSTER para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos eedeagos de *Drosophila ornatifrons*.

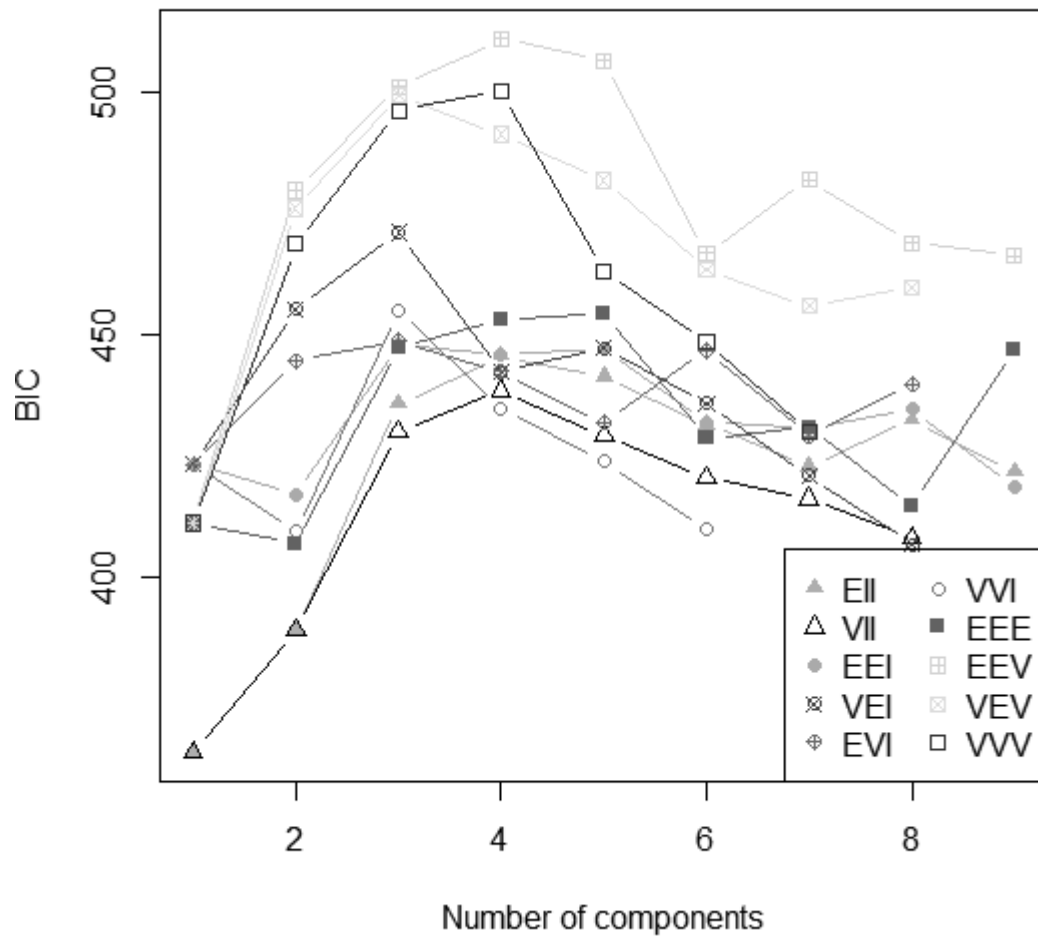


Figura 8. Análise de agrupamento realizado pelo MCLUST utilizando dez modelos (símbolos referentes as linhas no gráfico) para verificar a existência de agrupamentos morfológicos relacionado com as variáveis da forma (modelos descritos na seção Material e Métodos) dos edeagos de *Drosophila ornatifrons*. BIC = Critério de Informação Bayesiana. Number of componentes = número de agrupamentos.

Tabela 1. Quantidade de asas direita e edeagos analisados de *Drosophila ornatifrons*, por localidade amostrada.

Localidade	Asas	Edeagos
Canguçu-RS	6	8
Chapecó- SC	2	6
Parque das Araucárias – PR	19	22
Salto São Francisco – PR	16	20
Total	43	56

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para as diferenças intraespecíficas no (a) tamanho (tamanho do centroide) e (b) na forma da asa para quatro populações de *Drosophila ornatifrons*. *P<0.0001; d.f. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios.

Fator de variância	SS	MS	d.f.	F
(a) Tamanho				
Grupos	729416,842903	243138,947634	3	18,62*
Resíduos	1070674,923177	13057,011258	82	
(b) Forma				
Grupos	0,00470481	0,0000980169	48	3,05*
Resíduos	0,04211590	0,0000321005	1312	

Tabela 3. Distâncias de Procrustes entre as quatro populações de *Drosophila ornatifrons*. CAN = Canguçu/RS; CHA = Chapecó/SC; SSF = Parque Municipal São Francisco da Esperança-Guarapuava/PR e PMA = Parque Municipal das Araucárias-Guarapuava/PR. *P<0,05; **P<0,01.

Populações	CAN	CHA	PMA
CHA	0,0161	---	
PMA	0,0112*	0,0147	---
SSF	0,0176**	0,0142	0,0114**

Tabela 4. Análise de Variância para a forma do edeago de quatro populações de *Drosophila ornatifrons*. g.l. = graus de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = quadrados médios.

Fontes de Variação	d.f.	SS	MS	F	p
PC1					
Intersecção	1	0,004126	0,004126	0,295996	0,588729
Populações	3	0,045143	0,015048	1,079583	0,365901
Erro	52	0,724792	0,013938		
Total	55	0,769935			
PC3					
Intersecção	1	0,000047	0,000047	0,024135	0,877142
Populações	3	0,002134	0,000711	0,367083	0,777043
Erro	52	0,100755	0,001938		
Total	55	0,102889			
PC4					
Intersecção	1	0,002212	0,002212	1,668004	0,202237
Populações	3	0,008992	0,002997	2,259931	0,092343
Erro	52	0,068968	0,001326		
Total	55	0,077960			
PC5					
Intersecção	1	0,000851	0,000851	1,253772	0,267979
Populações	3	0,003360	0,001120	1,649616	0,189270
Erro	52	0,035300	0,000679		
Total	55	0,038660			
PC6					
Intersecção	1	0,000019	0,000019	0,039490	0,843256
Populações	3	0,000503	0,000168	0,339850	0,796582
Erro	52	0,025667	0,000494		
Total	55	0,026171			
PC7					
Intersecção	1	0,000038	0,000038	0,115309	0,735547
Populações	3	0,000612	0,000204	0,612446	0,609987
Erro	52	0,017320	0,000333		
Total	55	0,017931			
PC8					
Intersecção	1	0,000003	0,000003	0,008258	0,927942
Populações	3	0,000156	0,000052	0,170448	0,915872
Erro	52	0,015874	0,000305		
Total	55	0,016030			

Tabela 5. Total (e porcentagens) de reclassificações das amostras dos edeagos de *Drosophila ornatifrons* dentro dos agrupamentos morfológicos formados por meio de Critérios de Inferência Bayesiana (BIC).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
CAN	1 (12,5)	4 (50,0)	3 (37,5)	-
CHA	-	2 (33,3)	4 (66,7)	-
PMA	1 (4,6)	5 (22,7)	14 (63,6)	2 (9,1)
SSF	2 (10,0)	9 (45,0)	7 (35,0)	2 (10,0)

5. Considerações finais

Este trabalho contribuiu com dados importantes acerca dos padrões de diferenciação morfológica para as espécies *D. maculifrons* e *D. ornatifrons*. Os nossos resultados mostraram que os padrões encontrados para as asas foram diferentes do detectados para os edeagos, corroborando com a hipótese de que estas diferentes partes do corpo podem apresentar taxas e histórias evolutivas não congruentes. De uma maneira geral, as variações observadas para *D. ornatifrons* parecem estar relacionadas com aspectos ecológicos, tais como, exploração diferencial de nichos e/ou temperatura do ambiente, mas isto deve ser visto com cautela devido ao tamanho amostral pequeno para esta espécie. Para *D. maculifrons*, os padrões parecem estar relacionada com o local de ocorrência das populações, ocorrendo uma diferenciação nas populações coletadas no sul, Floresta Ombrofila Mista, com as populações coletadas em Floresta Estacional Semidecídua.

6. Referências Bibliográficas

ANDRADE, C.A.C.; HATADANI, L.M.; KLACZKO, L.B. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: Effect of the temperature. **J. Therm Biol.**, v. 30, p. 518-523, 2005.

ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biol. J. Linn.**, v. 60, p. 365–379, 1997.

AVISE, J.C. Phylogeography: the history and formation of species. **Harvard University Press**, p.447, 2000.

AVONDET, J.L.; BLAIR, R.B.; BERG, D.J.; EBBERT, M.A. *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. **Environ. Entomol.**, v. 32, p. 347–358, 2003.

BÄCHLI, G. TaxoDros: **the database on taxonomy of Drosophilidae**, v.1.04, Database 2013/6. <http://taxodros.unizh.ch/>> Accessed on 30 September 2013, 2013.

BALANYA, J.; OLLER, J. M.; HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; SERRA, L. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. **Science**, v. 313, p. 1773-1775, 2006.

BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L.B. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. **Heredity**, v. 83, p. 688–696, 1999a.

BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO, L.B. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. **Genetica**, v. 105, p. 35–42, 1999b.

BITNER-MATHÉ, B.C.; PEIXOTO, A.A.; KLACZKO, L.B. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. **Heredity**, v. 75, p. 54–61, 1995.

BLACKITH, R.E.; REYMENT, R.A. Multivariate morphometrics. Academic Press, London. p. 412, 1971.

BOOKSTEIN, F.L. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. **Cambridge University Press**: Cambridge, 1991.

BREUER, M.E.; PAVAN, C. Genitalia masculina de *Drosophila* do grupo *dreyfusi* (Diptera). **Rev. Bras. Biol.**, v. 14, p. 465–475, 1954.

CALLE, D.A.; QUIÑONES, M.L.; ERAZO, H.; JARAMILLO, O. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (Nyssorhynchus) presentes en Colombia. **Biomedica**, v. 28, p. 371–385, 2008.

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

CASWELL, H. Matrix Population Models: Construction, Analysis and Interpretation. Sunderland: Sinauer, 2001.

CAVASINI, R.; BUSCHINI, M.L.T.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R.P. Comparison of *Drosophilidae* (Diptera) Assemblages from two Highland Araucaria Forest Fragments, with and without Environmental Conservation Policies. **Braz. J. Biol.**, *in press*.

CAVALCANTI, M.J.; LOPES, P.R.D. Morfometria comparada de *Ctenosciaena gracilicirrus*, *Paralonchurus brasiliensis* e *Micropogonias fumieri* (Teleistei: Sciaenidae) pela análise multivariada de redes de treliças. *Revista Brasileira de Zoologia*. v.15, n.1, p. 53-64, 1993.

COOK, L. G.; EDWARDS, R. D.; CRISP, M. D.; HARDY, N. B. Need morphology always be required for new species descriptions? **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 322-326, 2010.

DA MATA, R.A.; MCGEOCH, M.; TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biod. Cons.**, v. 17, p. 2899–2916, 2008.

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

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

DEBAT V.; CORNETTE, R.; KOROL, A.B.; NEVO, E.; SOULET, D.; DAVID, J.R. Multidimensional Analysis of *Drosophila* wing variation in Evolution Canyon. **J. Genet.** v. 87, p. 407–419, 2008.

DEBAT, V.; DEBELLE, A.; DWORKIN, I. Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. **Evolution**, v. 63, p. 2864–2876, 2009.

DE CELIS, J.F. Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. **Bioessays**, v. 25, p. 443–451, 2003.

DOBZHANSKI, T.; PAVAN, C. Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **Journal of Animal Ecology**, v. 19, p. 1-14, 1950.

DÖGE, J.S.; VALENTE, V.L.S.; HOFMANN, P.R.P. Drosophilids (Diptera) from an Atlantic Forest Area in Santa Catarina, Southern Brazil. **Rev. Bras. Entomol.**, v. 52, p. 615-624, 2008.

DONNELLY, M.; TOWNSON, H. Evidence for extensive genetic differentiation among populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Eastern Africa. **Insect Molecular Biology**, v. 9, p. 357-367, 2000.

DOS SANTOS, K.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R.P. 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. **Drosoph. Inf. Serv.**, v. 93, p.185-188, 2010.

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

DUFOUR, L. Anatomie generale des Dipteres. **Annuaire de Science Naturelle**, v. 1, p. 244–264, 1844.

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

EBERHARD, W.G. Animal genitalia and female choice. **Am Sci.**, v. 78, p.134-141,1990.

EBERHARD, W.G. Evaluating models of sexual selection: genitalia as a test case. **Am. Nat.**, v. 142, p. 564–571, 1993.

EBERHARD, W.G. **Female control: sexual selection by cryptic female choice**. Princeton University Press, ISBN 0691010846, 1996.

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

FALCONER, D.S. Introduction to quantitative genetics. London, **Longman**, 2^a ed., p. 456, 1989.

FERREIRA, L.B.; TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Biod. Cons.**, v. 14, p. 1809–1821, 2005.

FERSON, S.; ROHLF, F.J.; KOEHN, R.K. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. **Syst. Zool.**, v. 34, p. 59-68, 1985.

FISHER, R.A. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon Press, 1930.

FOOTE, D., CARSON, H.L. *Drosophila* as monitor of change in hawaiian ecosystems. p. 368–372. In: **Our Living Resources: A Report to the Nation on the Distribution, Abundance, and Health of U.S. Plants, Animals, and Ecosystems**. LaRoe, E.T. (Ed.), Washington, DC, 2004.

FORNEL, R. **Estudo da variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 78f, 2005.

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

FRANCO, F.F., SOTO, I.M., SENE, F.M., MANFRIN, M.H. Phenotypic variation of the aedeagus of *Drosophila serido* Vilela & Sene (Diptera: Drosophilidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 37, p. 558–563, 2008.

GARNIER, S.; MAGNIEZ-JANNIN, F.; RASPLUS, J.Y.; ALIBERT, P. When morphometry meets genetics: Inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. **Journal Evolution Biology**, v. 18, p. 269-80, 2005.

GERLACH, G.; MUSOLF, K. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. **Conservation Biology**, v. 14, p.1066-1074, 2000.

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

GOTTSCHALK, M.S.; DE TONI, D.C.; VALENTE, V.L.S.; HOFMANN, P.R.P. Changes in Brazilian *Drosophilidae* (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotrop. Entomol.**, v. 36, p. 848–862, 2007.

GOTTSCHALK, M.S.; HOFMANN, P.R.P.; VALENTE, V.L.S. Diptera, *Drosophilidae*: historical occurrence in Brazil. **Check List**, v. 4, p. 485-518, 2008.

HEY, J. Gene Categories, and species: the evolutionary and cognitive causes of the species problem. **Oxford University Press**, USA, 2001.

HOCHMÜLLER, C.J.; LOPES-DA-SILVA, M.; VALENTE, V.L.S.; SCHMITZ, H.J. 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. Avulsos Zool.**, v. 50, p. 285-295, 2010.

HOSKEN, D.J.; STOCKLEY, P. Sexual selection and genital evolution. **Trends Ecol Evol.**, v. 19, p. 87-93, 2004.

KASTRITSIS, C. D. The chromosomes of some species of the *guarani* group of *Drosophila*. **J. Heredity**, v. 60, p. 51-57, 1969.

KASTRITSIS, C.D.; PASTEUR, G.; QUICK, J. Relationships of the polytene chromosomes of *Drosophila mediotriata* and *Drosophila griseolineata*. **Canad. J. Genet. Cytol.**, v. 12, p. 952–959, 1970.

KATOH, T.; NAKAYA, D.; TAMURA, K.; AOTSUKA, T. Phylogeny of the *Drosophila immigrans* species group (Diptera: *Drosophilidae*) based on *Adh* and *Gpdh* sequences. **Zoolog Sci.**, v. 24, p. 913–921, 2007.

KLINGENBERG, C.P. Morphometric integration and modularity in configurations of

landmarks: Tools for evaluating a-priori hypotheses. **Evol. Dev.**, v. 11, p. 405–421, 2009.

KOKUDAI, C.B.S.; SENE, F.M.; MANFRIN, M.H. Sympatry and Asymmetric Introgression between the Cactophilic Species *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 104, p. 434-442, 2011.

KUHL, F.P.; GIARDINA, C.R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **Comp. Graph. Imag. Proc.**, v.18, p. 236-258, 1982.

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

LIU, J.; MERCER, J.M.; STAM, L.F.; GIBSON, G.C.; ZENG, Z.B.; LAURIE, C.C. Genetic Analysis of a Morphological Shape Difference in the Male Genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. **Genetics**, v. 142, p. 1129-1145, 1996.

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

MACKAY, T.F.C. The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 14, p. 253–257, 2004.

MAGGENTI, M.A.B.; MAGGENTI, A.R.; GARDNER, S. **Online Dictionary of Invertebrate Zoology: Complete Work**. [<http://digitalcommons.unl.edu/onlinedictinvertezoology/2>]. University of Nebraska – Lincoln, 2005.

MALOGOLOWKIN, C. Sobre a genitália dos drosos lídeos. IV. A genitália masculina no subgênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 13, p. 245–

264, 1953.

MATEUS, R.P.; BUSCHINI, M.L.T.; SENE, F.M. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay river basin. **Braz. J. Biol.**, v. 66, p.719-729, 2006.

MATEUS, R.P.; MOURA, M.O.; MANFRIN, M.H.; MONTEIRO, S.G.; SENE, F.M. Contrasting Patterns of Within-Species Morphological Variation in Two Cactophilic *Drosophila* Species (Diptera: Drosophilidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 42, p. 384–392, 2013.

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

MEDEIROS, H.F.; KLACZKO, L.B. 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 Neotr.**, v. 4, p. 1-12, 2004.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S.F. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto: Holos, p.198, 1999.

MORAES, D.A. **A Morfometria Geométrica e a “Revolução na Morfometria”:** **localizando mudanças na forma dos organismos**. <http://www.bioetim.hpg.ig.com.br/III-3/Artigos/moraes.htm>. Acesso: Janeiro de 2011. 2003.

MORAES, E.M.; SENE, F.M. Microsatellite and morphometric variation in *Drosophila gouveai*: the relative importance of historical and current factors in shaping the genetic population structure. **J. Zool. Syst. Evol. Res.**, v. 45, p. 336–344, 2007.

MORAES, E.M.; MANFRIN, M.H.; LAUS, A.C.; ROSADA, R.S.; BOMFIN, S.C.; SENE, F.M. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. **Heredity**, v. 92, p. 466–473, 2004.

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

MOURÃO, C.A.; GALLO, A.J.; BICUDO, H.E.M.C. Sobre a Sistemática de *Drosophila* no Brasil, com a Descrição de *D. mendeli* sp.n. e “Relações de Espécies Brasileiras do Gênero *Drosophila*”. **Ciência e Cultura**, v. 17, p. 577-585, 1965.

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

PARSONS, P.A. Biodiversity conservation under global climatic change: the insect *Drosophila* as a biological indicator? **Global Ecol. Biogeog.**, v. 1, p. 77–83, 1991.

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

PAVAN, C. Espécies Brasileiras de *Drosophila*. II. **Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências Universidade de São Paulo**, v. 111, p. 1-37, 1950.

PAVAN, C. Relações entre populações naturais de *Drosophila* e o meio ambiente. **Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências Universidade de São Paulo**, v. 221, p.1-81, 1959.

PAVAN, C.; da CUNHA, A. B. Espécies Brasileiras de *Drosophila*. **Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências Universidade de São Paulo**, v. 86, p. 3-47, 1947.

PENARIOL, L.V.; MADI-RAVAZZI, L. Edge-interior differences in the species richness and abundance of drosophilids in a semideciduous forest fragment. **SpringerPlus**, v. 2, p.114-120, 2013.

PERES, P. R.N.; VALENTIN, J.L.; FERNANDEZ, F. Tópicos em tratamentos de dados biológicos. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

PERLMAN, S.J.; SPICER, G.S.; SHOEMAKER, D.D.; JAENIKE, J. Associations between mycophagous *Drosophila* and their *Howardula* nema-tode parasites: a worldwide phylogenetic shuffle. **Mol Ecol.**, v. 12, p. 237–249, 2003.

POMIANKOWSKI, A.; MÖLLER, A.P. A resolution of the lek paradox. **Proc. R. Soc. Lond, B, Biol Sci.**, v. 260, p. 21-29, 1995.

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

PRADO, P.R.P.; FRANCO, F.F.; MANFRIN, M.H.; COSTA, L.F.; SENE, F.M. An easy and fast way to analyze morphometric characters. **Proc Third Braz Symp Mathem Comp Biol**, v. 1, p. 329–340, 2004.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, Ed. Planta, 327p., 2001.

REMSEN, J., O'GRADY, P.O. Phylogeny of *Drosophilinae* (Diptera: Drosophilidae) with comments on combined analysis and character support. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 24, p. 249–264, 2002.

RICHARDS, O.W. Subgeneric divisions of the genus *Bombus* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology**, v. 22, p. 210-276, 1968

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

RICHTSMEIER, J.T.; ZUMWALT, A.; CARLSON, E.J.; EPSTEIN, C.J.; REEVES, R.H. Craniofacial Phenotypes in Segmentally Trisomic Mouse Models for Down

Syndrome. **Am. J. Med. Gen.**, v. 9999, p.1-9, 2002.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.S.; BUDNIK, M.; LORETO, E.L.S. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 623–640, 2005.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics.. **J. Zool. Syst. Evol. Res.**, v. 48, p. 310–321, 2010a.

ROBE, L. J.; VALENTE, V. L. S.; LORETO, E. L. S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v. 138, p. 725–735, 2010b.

ROHLF, F.J. Fitting curves to outlines. **Proceedings of the Michigan morphometrics workshop**. p.167-177, 1990.

ROHLF, F. J. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: *Advances in morphometrics*. MARCUS, L. E. et al. (Eds.), Plenum: New York, v.284 p. 117-129, 1996.

SENE, F. M.; VAL, F. C.; VILELA, C. R.; PEREIRA, M. A. Q. R. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura**, v. 33, p. 315-326, 1980.

SHAPIRO, A.M.; PORTER, A.H. The lock-and-key hypothesis: evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. **Annu Rev Entomol.** v. 34, p. 231–245, 1989.

SILVA, A.F.G.; SENE, F.M. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Entomol.**, v. 35, p. 455-468, 1991.

SISODIA, S.; SINGH, B.N. Mating success and morphometric traits in *Drosophila ananassae*. **Curr. Sci.**, v. 80, p.1444–1447, 2001.

SLICE, D. BOOKSTEIN, F., MARCUS, L.;F. J. ROHLF. **A Glossary for Geometric morphometrics**. <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>. Último acesso em janeiro de 2011.

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

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

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

SOTO, I. M.; MANFRIN, M.H.; HASSON, E. Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic *Drosophila*. **J. Zool. Syst. Evol. Res.**, v. 46, p. 368-373, 2008b.

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

SOTO, I.M.; CARREIRA, V.P.; SOTO, E.M.; MÁRQUEZ, F.; LIPKO, P.; HASSON, E. Rapid Divergent Evolution of Male Genitalia Among Populations of *Drosophila buzzatii*. **Evol. Biol.**, v. 40, p. 395-407, 2013.

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

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the

environment in two contrasting tropical vegetations. **Biol. J. Linn. Soc. Lond.**, v. 87, p. 233–247, 2006.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 52, p. 311-317, 1992.

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

TIEDEMANN, R.; HARDY, O.; VEKEMANS, X.; MILINKOVITCH, M. C. Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. **Molecular Ecology**, v. 9, p.1159-1163, 2000.

TORRES, F.R.; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp (Diptera) in two woodlond in the state of São Paulo, Brazil . **Iheringia, Sér. Zool.**, v. 96, p. 437 - 444, 2006.

VAL, F.C.; MARQUES, M.D.; VILELA, C.R. Drosophilidae of Neotropical region. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. **Academic Press, Orlando**, p. 123–168, 1981.

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

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

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

WHEELER, M.R. The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: Ashburner, M.,

Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. **Academic Press**, Orlando, p.1–97, 1982.

YOTOKO, K.S.C.; MEDEIROS, H.F.; SOLFERINI, V.N.; KLACZKO, L.B. A molecular study of the Systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 28, p. 614-619, 2003.