

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/46031

IB/ 81651

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

VARIAÇÃO MORFOLÓGICA NOS EDEAGOS DE
DROSOPHILA MEDIOPUNCTATA

Carlos Alberto da Conceição Andrade

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) *Carlos Alberto da Conceição Andrade* e aprovada pela Comissão Julgadora. *26/09/2001*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Campinas, SP

2001

UNIDADE	IB/21651	
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP	
	Am24v	
V.	Ex.	
TOMBO BC/	46031	
PROC.	16-392/01	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00	
DATA	15-02-01	
N.º CPD		

ii

CM00158790-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

An24
v

Andrade, Carlos Alberto da Conceição

Variação morfológica nos edeagos de *Drosophila mediopunctata*/Carlos Alberto da Conceição Andrade
Campinas, SP. [s.n.], 2001.
85f: ilus.

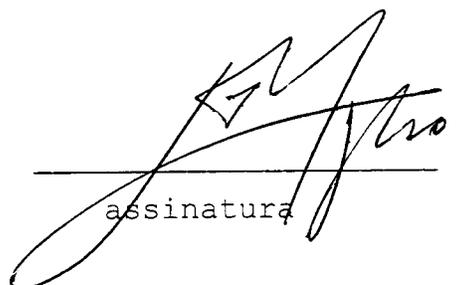
Orientador: Louis Bernard Klaczko
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Órgãos genitais masculinos. 2. Morfologia.
3. *Drosophila mediopunctata*. I. Klaczko, Louis Bernard. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 26 de abril de 2001

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko:
(Orientador)



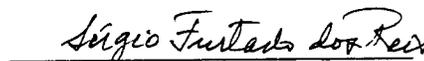
assinatura

Profa. Dra. Rosana Tidon-Sklorz:



assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis:



assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza:

assinatura

A minha companheira, Ana Maria, e a
Tobias, Esther e Eduardo, meus filhos.

AGRADECIMENTOS

A MEU ORIENTADOR, PROF. LOUIS B. KLACZKO, QUE COM SUA COMPETÊNCIA, AMIZADE E, SOBRETUDO, CAVALHEIRISMO AJUDOU-ME NÃO SÓ A CONFECCIONAR UMA TESE, MAS MOSTROU-ME ALGUNS MODOS PERCUCIENTES COMO EU DEVIA ME POSICIONAR PERANTE VÁRIOS PROBLEMAS QUE EMERGIRAM NO ANDAMENTO DO TRABALHO.

A MEUS JOVENS COLEGAS DE BANCADA ANANINA, HERMES, HORÁCIO, JORGE, LUCIANE E ROBERTO QUE ME AUXILIARAM NAS COLETAS E EM BOA PARTE DA PESQUISA. FOI NO COTIDIANO TRIVIAL QUE TIVEMOS A OPORTUNIDADE DE COMPARTILHAR DISCUSSÕES INTERESSANTES SOBRE TEMAS GERAIS DA GENÉTICA E DE NOSSAS VIDAS.

À WILMA NASCIMENTO DE SOUZA E DONA APARECIDA RAMOS LIBÂNIO PELO APOIO TÉCNICO EM TODOS OS SENTIDOS. UM PERÍODO DE PAZ E HARMONIA FOI DESFRUTADO, PORQUE ELAS IMPUSERAM ESSAS VIRTUDES NO DIA A DIA.

A WAGNER C. XAVIER PELA HOSPITALIDADE E GENEROSIDADE. CONHECEMO-NOS SEM APERTO DE MÃO, MAS CONSEGUIMOS ESTREITAR NOSSAS RELAÇÕES DE PROFUNDA AMIZADE NUMA CIDADE QUE POUCO A POUCO SE AGIGANTA, TRANSFORMANDO-SE EM MAIS UMA SELVA DE PEDRA.

À ELIANE E ANDREA KLACZKO QUE ME PROPORCIONARAM UM AMBIENTE FAMILIAR ACONCHEGANTE E ILUMINADO DE SENTIMENTOS NOBRES. ELIANE TEM UM PENSAMENTO ARGUTO E UM ENORME CORAÇÃO.

A MEUS PAIS, FRANCISCO E RITA, QUE NUNCA DEIXARAM DE ME AJUDAR. AMBOS ACREDITARAM QUE A SAÍDA PARA UMA VIDA MELHOR VIRIA ATRAVÉS DA EDUCAÇÃO.

À MINHA ETERNA COMPANHEIRA, ANA MARIA, PELA COMPREENSÃO E APOIO NOS MOMENTOS MAIS DIFÍCEIS. ANA TEM UM ESPÍRITO AGUERRIDO E ISTO CONTRIBUIU SOBREMANEIRA PARA QUE EU ANDASSE A PASSOS LARGOS.

AO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ), COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), FUNDO DE APOIO AO ENSINO E PESQUISA DA UNICAMP (FAEP-UNICAMP), FUNDAÇÃO PARA O AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) PELO APOIO FINANCEIRO E TAMBÉM AO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MARINHA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A genitália masculina como um caráter diagnóstico para identificar drosofilídeos	2
1.2. Evolução da genitália	4
1.2.1 Hipótese chave-e-fechadura	4
1.2.2 Hipótese da pleiotropia	5
1.2.3 Hipótese da seleção sexual	6
1.3. Plasticidade fenotípica	9
1.4. O problema	10
1.5. Morfometria	11
1.6. <i>Drosophila mediopunctata</i> , um modelo experimental	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Coleta de drosofilídeos	17
3.2. Identificação de <i>Drosophila mediopunctata</i> por intermédio da morfologia e cromossomos politênicos	19
3.3. Densidade das larvas	21
3.4. Preparação dos edeagos	22
3.5. Tomada dos pontos de referência	24
3.5.1 Edeago	24
3.5.2 Asa	26
3.5.3 "Software" e pacote estatístico	28
3.6. Análise dos componentes principais	30

4. RESULTADOS	32
4.1. Asa	32
4.2. Edeago	34
4.3. Asa e edeago	36
4.4. Inversões	37
4.5. Densidade das larvas	43
5. DISCUSSÃO	47
5.1. A variação da asa	47
5.2. A variação do edeago	50
5.3. Os tamanhos do edeago e da asa são correlacionados	51
5.4. Inversões cromossômicas e morfologia do edeago	51
5.5. Efeito da densidades das larvas	52
5.6. Hipóteses sobre a evolução da genitália masculina	54
5.6.1. Hipótese chave-e-fechadura	55
5.6.2. Hipótese da pleiotropia	56
5.6.3. Hipótese da seleção sexual	57
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

A morfologia da asa e do edeago de *Drosophila mediopunctata* de duas amostras coletadas na Serra do Japi foi caracterizada pela análise de componentes principais (CP). Foram tomadas 27 medidas dos edeagos e 11 de uma das asas de cada animal. Na asa, os primeiros três CPs explicaram 95,3% da variação total; e foi possível caracterizar duas fontes de variação: tamanho (CP1) e forma, responsáveis, respectivamente, por 80,6% e 19,4% da variação total. Já para o edeago o tamanho (CP2) explicou apenas 19,2%, enquanto os 80,8% restantes foram devidos à forma; os 3 primeiros CPs explicaram 57,3%. Em média os coeficientes de variação do edeago foram maiores que os da asa. Uma correlação fenotípica positiva alta foi detectada entre os tamanhos da asa e do edeago, porém nenhuma outra correlação foi detectada entre os CPs dos dois órgãos. Não houve efeito significativo das inversões cromossômicas sobre os dois órgãos. Houve, porém, influência da densidade das larvas na morfologia do edeago, sobretudo no tamanho. Discutimos nossos dados em relação a três hipóteses sobre a evolução da genitália masculina. É possível refutar a hipótese chave-e-fechadura, mas não as hipóteses de seleção sexual e pleiotropia. O padrão de variação do edeago descoberto

foi inesperado já que não havia sido previsto explicitamente por nenhuma das três hipóteses.

SUMMARY

The wing and aedeagus morphology of *Drosophila mediopunctata* from two samples collected in the Japi Range was characterized by principal component analysis (PC). Twenty-seven measurements of the aedeagus and eleven measurements of the wing were taken from each animal. For the wing, the first three PCs accounted for 95,3% of total variation. Furthermore, it was possible to characterize two sources of variation: size (PC1) and shape, respectively responsible for 80,6% and 19,4% of total variation. As for the aedeagus, the size (CP2) explained only 19,2%, while 80,8% was due to the shape; and the three first PCs accounted for 57,3%. In general, the variation coefficients of the aedeagus were greater than those of the wing. A high positive phenotypic correlation was detected between the wing and aedeagus sizes; however, no other correlation was detected between the PCs of the two organs. There was no significant effect of chromosome inversions on both organs. There was, however, influence of larval density on the aedeagus, particularly in its size. We have discussed our data in regard to three main hypotheses on the evolution of the male genitalia. It is possible to refute the lock-and-

key hypothesis, but not pleiotropy and sexual selection hypotheses. The variation pattern found in the aedeagus was unexpected since it had not been explicitly anticipated by the three hypotheses.

1. INTRODUÇÃO

A morfologia é uma das fontes mais ricas de informação a respeito de relações sistemáticas, evolutivas e ecológicas (McLellan e Endler, 1998). No entanto, a base genética da diversidade morfológica nos organismos vivos e no registro fóssil tem sido um assunto controverso na teoria evolutiva, sobretudo depois que Darwin (1859) sugeriu que diferenças dramáticas na função e forma seriam resultantes da acumulação gradual de pequenas diferenças individuais por meio da seleção natural.

Um outro problema a ser explicado em biologia é como o processo de evolução, considerado lento e gradual por vários autores, pode gerar grupos morfológicamente descontínuos, as espécies (Coyne, 1992). Lewontin (1974) comentando sobre o darwinismo, caracteriza a evolução como sendo a conversão da variação entre indivíduos dentro de um grupo inter cruzante em variação entre grupos no espaço e no tempo. Portanto, o exame das variações individuais rege qualquer estudo de populações sexuadas.

1.1 - A genitália masculina como um caráter diagnóstico para identificar drosofilídeos

A genitália masculina de *Drosophila* é formada por um conjunto de apêndices com numerosas diferenciações que podem servir como elementos de distinção específica. O estudo comparativo desses elementos facilita bastante ao sistemata o estabelecimento das relações entre grupos de espécies (Breuer e Pavan, 1950, 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. O grupo *repleta*, por exemplo, é composto de dezenas de espécies com morfologia externa bastante parecida, mas apresenta acentuadas diferenças nos diversos apêndices da genitália masculina, especialmente o edeago (Vilela, 1983). Em espécies morfologicamente semelhantes, como é o caso da superespécie *serido*, o edeago exibe variações que podem ser percebidas pela análise de sua morfologia (Tidon-Sklorz, 1992; Tidon-Sklorz e Sene, 1995). No entanto, se existe variação geográfica com relação ao edeago, isto pode representar o início de um processo de diferenciação interpopulacional que pode até resultar em especiação (Silva e Sene, 1991), ainda que não obrigatoriamente.

O grupo *tripunctata* é composto de diversas espécies morfológicamente diferentes, entretanto há uma parcela de espécies que compartilha morfologia semelhante, sendo muitas vezes necessário fazer uso de caracteres da genitália masculina ou analisar os cromossomos politênicos, a fim de distinguí-las.

Embora o ovipositor, um processo ventral encontrado em fêmeas a partir dos segmentos VIII e IX, tenha sido empregado como mais um caráter taxonômico (Frota-Pessoa, 1954), sua ineficácia neste sentido ficou demonstrada em estudos de morfologia comparativa, quando se verificou que sua variação era pequena quando contrastada com a do edeago (Scudder, 1971). A espermateca foi empregada por Frota-Pessoa (1954) e Dobzhanky e Pavan (1943) como mais um caráter de diagnose, mas sua aplicabilidade é bastante restrita, uma vez que as estruturas da genitália feminina são internas e compostas de tecidos moles, sofrendo, portanto, distorção quando manipulada. Alguns anos atrás, Silva e Sene (1991) não encontraram variação nos dentes marginais e discais das placas do ovipositor bem como na forma da espermateca quando analisaram a variabilidade geográfica e morfológica de *D.serido*.

Portanto, para a identificação de espécies do gênero *Drosophila*, a genitália masculina têm se mostrado a

estrutura mais adequada, sobretudo, o edeago (Nacurr, 1958; Vilela, 1983; Vilela e Pereira, 1985; Vilela e Bachli, 1990, Silva e Sene, 1991).

1.2 - Evolução da genitália

A evolução rápida da genitália masculina é um dos padrões mais gerais de diversificação morfológica em animais (Eberhard, 1985, 1990, 1993, 1996) com fertilização interna; no entanto, as causas desta tendência evolutiva são pouco conhecidas (Arnqvist e Thornhill (1998). Para explicar a evolução da genitália masculina foram propostas algumas hipóteses, tais como: *chave-e-fechadura* (veja revisão em Scudder, 1971; Shapiro e Porter, 1989), *seleção sexual* e *pleiotropia* (Eberhard, 1990, 1993, 1996; Rowe e col., 1994; Arnqvist, 1997; Arnqvist e Thornhill, 1998).

1.2.1 - Hipótese chave-e-fechadura

A hipótese chave-e-fechadura foi proposta inicialmente por Dufour em 1844 (citada em Scudder, 1971 e em Shapiro e Porter, 1989). Ela é bastante difundida entre os biólogos e tem sido, ao longo destes anos, uma explicação tradicional para a evolução da genitália.

De acordo com esta hipótese, as fêmeas evoluíram, sob seleção, que favoreceria aqueles indivíduos que evitavam

perder ovos por tê-los fertilizados por esperma de outras espécies. A genitália feminina elaborada e específica da espécie (fechadura) admitiria apenas a genitália de machos coespecíficos (chave), capacitando as fêmeas a evitar erros na fertilização (Eberhard, 1990, 1993).

Esta hipótese prevê que a genitália masculina é selecionada a fim de se ajustar estritamente à morfologia da genitália feminina. Portanto, a seleção estabilizadora agiria sobre a genitália masculina, otimizando-a e impedindo desvios potenciais, pois isto acarretaria desajustamento com a genitália feminina. Além disso, deveria haver um grau baixo de variação fenotípica dentro das populações, pois o desenvolvimento da genitália pode ter evoluído para ser altamente canalizado. Esperam-se correlações fenotípicas baixas com outros caracteres, e quaisquer variações deveriam ser relativamente independentes do tamanho (Arnqvist e Thornhill, 1998).

1.2.2 - Hipótese da pleiotropia

Mayr (1963) sugeriu que diferenças na morfologia da genitália desempenhariam um papel relativamente pequeno, pelo menos quanto ao mecanismo de isolamento pré-copulatório. Ele propôs que a pleiotropia seria o mecanismo responsável por isso. Assim, as diferenças surgiriam em isolamento, talvez a partir de efeitos

pleiotrópicos de genes atuando em outras características, ao invés de isolamento mecânico. As diferenças genitálicas surgiriam como resultado do isolamento, e nunca funcionariam para causá-lo (Scudder, 1971). De acordo com Falconer (1989) a pleiotropia seria a causa principal de correlação genética entre os diversos caracteres.

Esta hipótese sustenta que a morfologia da genitália masculina não se correlaciona diretamente com quaisquer componentes do valor adaptativo. Estipula que a variação genética deve ser relativamente alta em comparação com outras características uma vez que a variação da genitália é neutra. Espera-se que a variação morfológica em traços da genitália seja fenotipicamente correlacionada com outras características. Além disso, traços genitálicos podem mostrar variabilidade fenotípica comparável, ou mesmo maior que aquele de outros traços similares em tamanho.

1.2.3 - Hipótese da seleção sexual

A teoria evolutiva por seleção natural de Darwin enfrentou um forte problema: a questão dos traços masculinos conspícuos, como a plumagem dos pássaros e a juba do leão. Estes e outros caracteres extravagantes do macho reduziam a sobrevivência, e assim se opunham à

seleção natural. A seleção sexual foi a solução encontrada. Para Darwin, a seleção sexual dependia, não de uma luta pela existência, mas de uma luta entre os machos pela posse das fêmeas; o resultado não seria a morte de um competidor desfavorável, mas pouca ou nenhuma progênie (Darwin, 1859, p. 79).

Fisher (1930) elaborou uma teoria de especiação baseada em seleção sexual "runaway" (desgovernada). Fêmeas com preferências extremas tendem a cruzar com machos possuidores de traços morfológicos extremos (cruzamento preferencial). Portanto, preferências da fêmea e traços morfológicos do macho se tornam correlacionados dentro de populações. A expressão do traço se torna mais extrema de um modo "desgovernado" até que a seleção sexual é equilibrada por pressões opostas de seleção natural. A divergência rápida entre populações na expressão da preferência da fêmea e o caráter sexual secundário do macho podem conduzir à especiação (Lande, 1981; Moller e Cuervo, 1998).

Recentemente um renovado interesse baseado nas idéias de Darwin e Fisher com respeito à seleção sexual e os progressos da teoria evolutiva estimulou hipóteses novas (Eberhard, 1990). O enfoque centraliza-se na genitália masculina. Na medida em que está envolvida em eventos

reprodutivos, a seleção sexual pode ser responsável pela evolução e diversificação da genitália. A exuberância morfológica da genitália masculina é quase tão dramática quanto a dos caracteres que são tradicionalmente discutidos, como a juba do leão, a cauda do pavão e as esporas do galo (Eberhard, 1993).

A hipótese de seleção sexual sustenta que a genitália masculina intromitente pode também evoluir via seleção sexual pós-cruzamento. Neste caso as fêmeas escolhem a paternidade de sua progênie; a este respeito há uma grande variedade de modelos (Eberhard, 1985, 1990, 1993).

Na hipótese de seleção sexual, a seleção natural direcional agiria sobre a variação que está relacionada ao sucesso de fertilização. Assim, traços da genitália exibiriam níveis significantes e relativamente altos de variância genética aditiva em comparação com outras características e, por conseguinte, níveis de variância fenotípica relativamente altos seriam esperados (Arnqvist e Thornhill, 1998). A existência ou não de correlação com outras características fenotípicas dependeria do tipo particular de modelo de seleção sexual.

1.3 - Plasticidade fenotípica

O fenótipo é o produto do genótipo e do ambiente e é também o foco da seleção natural. Já plasticidade fenotípica pode ser compreendida como a capacidade de um dado genótipo em produzir mais de uma forma alternativa em morfologia, fisiologia e comportamento em resposta às condições ambientais (West-Eberhard, 1989), embora existam outras definições (Via e Lande, 1985; Thomas e Barker, 1993; Pigliucci e Schlichting, 1996).

Plasticidade fenotípica está relacionada com o conceito de norma de reação de um genótipo. Normas de reação são comumente representadas como uma linha ou curva sobre um gráfico que exhibe fenótipos contra um fator ambiental. A natureza genética das normas de reação, e como elas evoluem, é controversa e recentemente vem provocando bastante discussão (Turelli e col., 1988; Gottard e Nylin, 1995; Bitner-Mathé e Klaczko, 1999).

A plasticidade fenotípica pode permitir que uma dada espécie enfrente a variação ambiental. Por isto é de importância crucial compreender a plasticidade fenotípica de qualquer traço sob investigação (Noach e col., 1997).

Em *Drosophila* vários trabalhos que tratam de plasticidade estão concentrados em caracteres morfológicos como o tamanho da asa (Noach e col., 1997;

de Moed e col., 1997; Bitner-Mathé e Klaczko, 1999b) e tamanho do tórax (Thomas e Barker, 1993; Partridge e col., 1994). Estes traços, de certo modo, mostram associações com componentes do valor adaptativo.

Até a presente data, nenhum trabalho a respeito de plasticidade foi feito com relação à genitália masculina de *Drosophila*. Uma questão fundamental é saber o quanto e onde o edeago pode variar e, a partir daí, verificar a contrapartida da genitália feminina. Portanto, estudos sobre plasticidade fenotípica do edeago podem ajudar a esclarecer como ele reage não só às variáveis ambientais, mas também à genitália feminina. Ademais, diferentes previsões quanto à plasticidade do edeago podem ser avaliadas, permitindo que as diferentes hipóteses sobre a morfologia da genitália masculina sejam melhor contrastadas. A hipótese chave-e-fechadura prevê pouca plasticidade fenotípica para o órgão, enquanto que a hipótese de pleiotropia admite forte plasticidade. Já para a hipótese de seleção sexual a plasticidade esperada dependeria do modelo de seleção adotado (Arngvist, 1997).

1.4 - O problema

Freqüentemente, estas três hipóteses discutidas acima são difíceis de avaliar empiricamente porque muitas de

suas predições não são mutuamente excludentes (Bradbury e Andersson, 1987). No entanto, as predições que envolvem: as correlações dos caracteres da morfologia da genitália com caracteres morfológicos de outros órgãos; e os graus de variação fenotípica dentro de populações serão examinadas aqui na tentativa de refutar uma ou mais das hipóteses anteriores.

1.5 - Morfometria

D'Arcy W. Thompson publicou em 1917 um tratado sobre crescimento e forma. Embora ele tenha apresentado várias figuras mostrando mudanças na forma, na verdade, nenhum método matemático ou computacional foi utilizado para descrevê-las (Reyment, 1991, 1996). Este trabalho, no entanto, foi, posteriormente, uma das bases para a edificação da morfometria tradicional, cujos idealizadores (Bookstein e col., 1985) empregaram a morfometria baseada em "landmarks" (pontos de referência) juntamente com estatísticas multivariadas, processando os dados com computadores.

Em sentido menos formal, morfometria pode ser entendida como uma área da pesquisa cuja fronteira reside entre a biologia, a estatística e a geometria, mas rigorosamente é definida como "o estudo estatístico da

covariância entre mudanças de forma e fatores causais” (Bookstein, 1991; Monteiro e Reis, 1999)

Bookstein (1978) definiu pontos de referência como pontos especiais, os quais têm caracterizações anatômicas seguras e são consistentes com as regras de homologia. Já Reyment (1991) assinalou que estes pontos tomados não definem a forma de qualquer contorno ou superfície, mas simplesmente fornecem pontos fixos, de referência. Como as medições entre tais pontos geram distâncias, Strauss e Bookstein (1982) propuseram as redes de treliça, um método para caracterizar o tamanho e a forma de um órgão. Ele consiste na identificação de pontos ou marcos anatômicos e construção de quadriláteros contíguos que contêm duas diagonais internas. Este é um método apropriado para abstrair o tamanho e a forma de um órgão qualquer, já que são tomadas medidas em todas as direções (Bookstein e col., 1985).

Uma vez de posse das medidas lineares, várias análises estatísticas multivariadas são possíveis. Rohlf e Marcus (1993) revisaram as que são de interesse a pesquisa do tamanho e forma. Por exemplo, a análise dos componentes principais é um método que reduz a dimensão de uma matriz de covariâncias entre caracteres merísticos ou morfométricos dos organismos em estudo, concentrando a

maior parte da variação da matriz original nos primeiros componentes principais (CP1, CP2 e CP3). Nesta análise o primeiro componente é normalmente interpretado como um componente que representa a variável latente tamanho, desde que ele apresente correlações positivas com cada uma das variáveis medidas. Os demais componentes são interpretados como indicadores da forma do organismo ou do órgão, ao exibirem contraste entre diferentes medidas (Neff e Marcus, 1980; Reis, 1988; Reis e col., 1987; Bitner-Mathé e col., 1995; Monteiro, 1997).

Novos métodos estatísticos projetados para descrever a variação bi e tridimensional na forma entre espécimens abriram possibilidades novas para trabalhar com morfologias complexas. Estes métodos multivariados potencialmente fornecem muito mais medidas integrativas e sintéticas da variação morfológica do que as medidas lineares tradicionais (Arnqvist e Thornhill, 1998). Pode-se destacar sobretudo a morfometria geométrica considerada por Rohlf e Marcus (1993) uma verdadeira revolução. No entanto, a morfometria "tradicional" ainda é uma metodologia poderosa capaz de trazer análises e interpretações novas para problemas biológicos importantes (Bitner-Mathé e Klaczko, 1999a).

1.6 - *Drosophila mediopunctata*, um modelo experimental

Vários aspectos da biologia são similares em diversos organismos, mas é muito mais fácil estudar certos aspectos em alguns deles. Uma maneira proveitosa de testar hipóteses é tentar extendê-las a casos que diferem com relação àqueles pelos quais elas foram originalmente propostas. A expectativa é que algumas serão fortalecidas por confirmação independente, ao passo que outras devem ser modificadas ou descartadas (Eberhard, 1993).

Os estudos micro e macroevolutivos em *Drosophila pseudoobscura* por Dobzhansky e seus associados estabeleceram muitas das questões fundamentais em genética evolutiva e de populações. Eles desenvolveram um paradigma de pesquisa baseado em estudos experimentais do processo Darwiniano (Prout, 1995).

Klaczko (1995), ao discorrer sobre o legado de Dobzhansky, enfatiza que seu programa de pesquisa, empregando *Drosophila mediopunctata* como modelo experimental, é uma continuação deste projeto. Todavia, seu interesse está concentrado em uma espécie neotropical e de um subgênero diferente. Com isto ele tenta descobrir problemas novos e propõe métodos originais de análise baseado numa outra realidade.

Drosophila mediopunctata Dobzhansky e Pavan 1943 pertence ao grupo *tripunctata* do subgênero *Drosophila* (Frota-Pessoa, 1954). Sua distribuição é ampla, tendo sido encontrada em várias partes do Brasil e até em El Salvador (Val, Vilela e Marques, 1981). Klaczko (1995) cita algumas peculiaridades desta espécie com relação a outros grupos. Por exemplo, *D. mediopunctata* tem o tempo de maturação longo, fecundidade baixa e longevidade alta. Outro dado importante é a quantidade de inversões cromossômicas no cromossomo II nesta espécie, que tem lhe permitido examinar clines altitudinais, visando estudos de adaptação e coadaptação (Bitner-Mathé e col., 1995). Há, também, o caráter "sex ratio", que é a produção de progênie com excesso de fêmeas em relação aos machos. Carvalho e col. (1989) demonstraram que este caráter está associado a uma inversão localizada no cromossomo X.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho iniciamos o exame da morfologia da genitália masculina de *Drosophila mediopunctata*, com destaque para o edeago, a partir de indivíduos capturados na Serra do Japi. Portanto, os seguintes objetivos foram traçados:

1. caracterizar a variabilidade morfológica do edeago na população da Serra do Japi;
2. correlacionar a variação morfológica do edeago com a da asa, sobretudo, usando-a como estimativa do tamanho da mosca;
3. associar inversões cromossômicas com a variação morfológica do edeago;
4. testar o efeito da densidade das larvas sobre o edeago.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Coleta de drosofilídeos

A Serra do Japi está situada a 6 Km da cidade de Jundiaí, Estado de São Paulo. Rodrigues e Shepherd (1992) designaram a Serra do Japi como um maciço que se estende de sudoeste para noroeste, entre o Porto Japi, no Rio Tietê, município de Cabreúva (São Paulo) e a Fazenda Japi, localizada no município de Jundiaí, com as coordenadas aproximadas em 23° 11'S e 46° 40'W.

Esta Serra é caracterizada por altitudes que variam entre 700m e 1300m acima do nível do mar. Pinto (1992) descreveu que estas altitudes condicionam temperaturas médias anuais entre 15,7°C e 19,2°C, respectivamente, nas partes mais altas e mais baixas. O mês mais frio é julho, com temperaturas médias oscilando entre 11,8°C e 15,3°C e o mês mais quente é janeiro, com temperaturas médias variando entre 18,4°C e 22,2°C em função da altitude.

A partir de duas coletas realizadas na Serra do Japi obtiveram-se 60 machos em julho de 1994 e 52 machos em maio de 1995 de *Drosophila mediopunctata*. As coletas se concentraram em torno da base ecológica (figura 1), distando cerca de 4 a 6 Km dela. Iscas de banana fermentadas com levedo de padaria foram deixadas em pratos plásticos e examinadas diariamente por cerca de

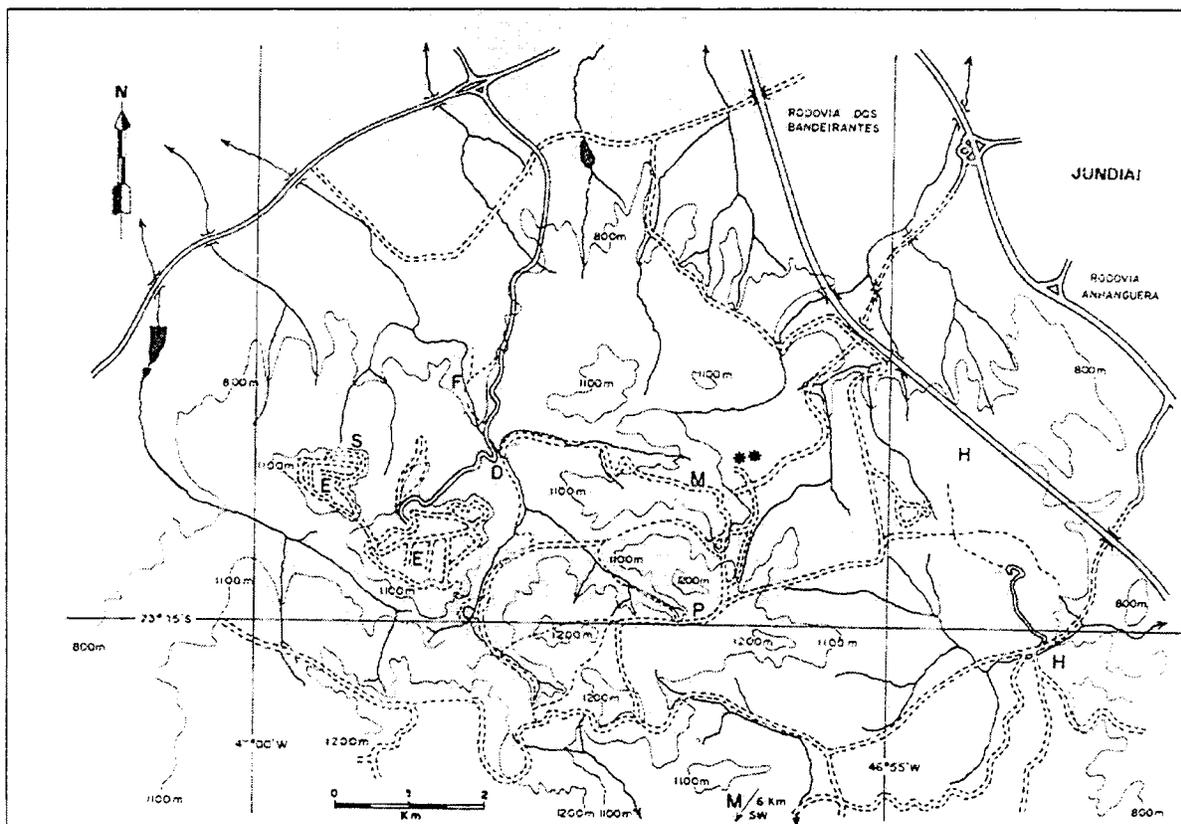


Figura 1. Mapa da região da face norte da Serra do Japi mostrando caminhos e riachos principais, curvas de nível de 800m, 1100m e 1200m. Simbologia empregada: lagos, açudes, riachos, estradas asfaltadas, ===== estradas de terra, ---- caminhos, trilhas; D= represa do DAE; localidades: M= mirante, observatório; H= topos tropicais (cerradão); E= loteamento da Ermida; S= escarpa norte; F= floresta tropical (ou mesófila) base - 750m; M= Parque Morangaba: sítio Bico-de-Papagaio; C= campos altos; P= Paraíso; **Pontos de coleta; extraído e modificado de Brown, 1992).

cinco dias. Os insetos capturados com rede entomológica foram transferidos para frascos com meio de cultura novo.

3.2 - Identificação de *Drosophila mediopunctata* por intermédio da morfologia e cromossomos politênicos

No laboratório, as espécies do gênero *Drosophila* foram separadas uma das outras por meio de chave de identificação (Freire-Maia e Pavan, 1949; Dobzhansky e Pavan, 1943). As fêmeas de *D. mediopunctata* eterizadas foram separadas e depositadas individualmente em frascos contendo meio de cultura fresco. Estas moscas permaneceram em temperatura constante (16,5°C) e, posteriormente, foram utilizadas para outros propósitos. Os machos foram cruzados individualmente com três fêmeas virgens de composição genética conhecida (ITC-229ET).

Os arranjos cromossômicos localizados nos cromossomos II e X dos machos foram determinados pela análise de até oito larvas da F1 (O prof. Louis B. Klaczko foi quem identificou as inversões), assegurando que a probabilidade de classificação incorreta seja menor do que um por cento (Arnold, 1981; Bitner-Mathé e col., 1995). Após cruzamento, estes machos foram sacrificados e depositados em placas de microtitulação contendo 96 poços. Em cada pocinho, portanto, cada macho permaneceu

em uma solução de álcool a 70% até sua posterior análise da asa e genitália. A análise da genitália possibilitou a identificação final da espécie *D. mediopunctata* usadas no trabalho.

As inversões cromossômicas localizadas no cromossomo II foram agrupadas em cinco classes de acordo com Bitner-Mathé e Klaczko (1995), como pode ser visto abaixo:

CLASSE	GENÓTIPO
I	DAPAO/DAPAO
II	DAPAO/DIPBO
III	DAPAO/DPPCO; DAPAO/DSPCO; DAPAO/DVPCO; DAPAO/DTPCO; DAPAO/DTPCI
IV	DIPBO/DIPBO; DIPBO/DPPCO; DIPBO/DSPCO; DIPBO/DVPCO; DSPCO/DSPCO; DSPCO/DVPCO; DPPCO/DTPCI; DPPCO/DPPCO; DPPCO/DVPCO; DPPCO/DSPCO
V	DAPAO/DAPAB; DAPAO/DIPAO; DAPAO/DIPCO; DAPAO/DAPCI; DAPAO/DIPBO; DAPAO/DIPC2; DAPAO/DSPBO; DAPAO/DIPC3; DAPAO/DVPBO; DAPAO/DPPCI; DIPBO/DSPBO; DIPBO/DVPCI; DIPC2/DPPCO; DIPBO/DSPCI; DIPAO/DSPCO; DAPBO/DIPC5; DIPBI/DTPCI; DAPBO/DVPCO; DVPBO/DPPCO; DAPAB/DSPCO; DAPBO/DPPCO; DPPCO/DVPCI; DIPC2/DTPCI; DAPBO/DIPCI; DSPCO/DVPBO;

3.3 - Densidade das larvas

Com a estirpe ITC-229ET testamos a influência da densidade sobre a morfologia do edeago. Fêmeas inseminadas foram deixadas em garrafas vazias, contendo lâminas cobertas com meio de oviposição por 24 horas. Quando as lâminas foram retiradas das garrafas e transferidas para placas de Petri, devidamente identificadas, lá ficando mais 24 horas. Após este período larvas de primeiro estágio foram colhidas e transportadas para pequenos tubos de 40 ml. Em um lote de tubinhos foram depositadas 10 larvas/tubo (baixa densidade) e noutro 100 larvas/tubo (alta densidade e mais restrigente). Os meios de cultura empregados para as duas densidades foram:

alta (meio a 2%)

água destilada 1000ml;

ágar 250g;

açúcar cristal 20g;

levedo (fermento francês)..... 20g;

nipagin (após o cozimento) ... 30g

baixa (meio a 8%)

água destilada 1000ml;

ágar..... 250g;

açúcar cristal 20g;
levedo (fermento francês) 80g;
nipagin, (após o cozimento) ... 30g

As larvas de ambas as densidades foram mantidas em duas incubadoras a 15,5°C. Quando os adultos eclodiram, os machos foram separados em placas de microtitulação para análise posterior de seus edeagos. Até este ponto o experimento foi conduzido por Hermes Fonsêca de Medeiros. No entanto, a montagem, observação, desenho e a digitalização dos edeagos foram concretizadas por mim.

3.4 - Preparação dos edeagos

A ponta do abdômen (peça) de cada mosca isolada individualmente em placas de microtitulação com 96 pocinhos foi extraída e colocada em pequenos tubos individuais contendo hidróxido de potássio a 10%, e o restante dela foi devolvido à placa de microtitulação. No hidróxido de potássio cada peça permaneceu por 5 minutos. A seguir cada uma foi transferida e lavada em álcool a 70% em placas de Petri durante alguns segundos. Após isto, cada peça foi depositada em tubo contendo álcool acético (3 partes de etanol a 50% : 1 parte de ácido acético), lá permanecendo por 15 minutos. Imediatamente, cada peça foi transferida e lavada em álcool a 70% e

colocada em tubo, que leva corante de Gage (0,5 g de fucsina ácida; 25 ml de HCl a 10%; 300 ml de água destilada). Cada peça foi deixada no corante cerca de 12h. Em seguida, o corante foi removido e substituído por etanol a 95% por cinco minutos (Wheeler e Kambysellis, 1966).

Para dissecação empregaram-se estiletes portando microalfinetes e uma lâmina escavada, na qual deitou-se em fenol cada peça a fim de separar o edeago. Com auxílio de uma lupa (aumento de 50 X) e de dois estiletes, os edeagos foram separados dos outros apêndices (veja a técnica em detalhes em Wheeler e Kambysellis, 1966). Cada edeago isolado foi depositado em lâmina contendo uma gota de bálsamo do Canadá. Breuer e Pavan (1950) tomaram bastante cuidado na montagem do edeago, pois além de usarem bálsamo envelhecido, adicionaram calços ao redor do ponto onde se insere a genitália. Em volta do bálsamo cerca de quatro pedacinhos de vidro de lamínula foram deixados, pois isto evitava o esmagamento do órgão e facilitava seu deslocamento. Em seguida, uma lamínula foi depositada e pressionada levemente sobre o bálsamo. Diariamente cada edeago ia sendo colocado em posição lateral (veja a fig.2) ao mexer suavemente a lamínula de um lado para o outro. Quando a peça ficava na posição

lateral correta este material permanecia sobre uma bancada até o bálsamo solidificar-se. Todas as lâminas foram guardadas em caixas para análise posterior.

3.5 - Tomada dos pontos de referência

3.5.1 - Edeago

O contorno de cada edeago foi desenhado, utilizando uma *camara lucida* conectada a um microscópio ótico Zeiss (aumento: 474x, figura 2). As coordenadas cartesianas de nove pontos de referência e vinte e sete pontos de ajuda (auxiliares) sobre o contorno do edeago foram tomados (36 pontos no total), empregando uma mesa digitalizadora ("SummaSketch", SummaGraphics Corporation) diretamente acoplada a um computador pessoal. Vinte e sete distâncias foram tomadas, geradas a partir de medidas de contorno, em linhas retas e oblíquas, estando estas duas últimas envolvidas com três redes de treliça e um triângulo. Tidon-Sklorz (1992) e Tidon-Sklorz e Sene (1995c) empregaram método semelhante para os edeagos de *D. serido*. São as seguintes as medidas tomadas:

V1= 1-9 (medida em linha reta)

V2= 9-15 (medida em linha reta; treliça A)

V3= 15-20 (medida em linha reta; treliça A)

V4= 20-23 (medida em linha reta; treliça B)

- V5= 23-26 (medida em linha reta; treliça C)
- V6= 26-27 (medida em linha reta; treliça C)
- V7= 27-29 (medida em linha reta; treliça C)
- V8= 29-33 (medida em linha reta; treliça B)
- V9= 33-1 (medida em linha reta; triângulo)
- V10= 1-9 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V11= 9-15 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V12= 15-20 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V13= 20-23 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V14= 23-26 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V15= 27-29 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V16= 29-33 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V17= 33-1 (medida de contorno com os pontos auxiliares)
- V18= 27-26 (medida de contorno com os pontos auxiliares, passando continuamente pelos pontos de 27 a 37 e 1 a 26)
- V19= 9-33 (medida em linha reta; treliça A)

- V20= 9-20 (medida diagonal; treliça A)
V21= 15-33 (medida diagonal; treliça A)
V22= 20-33 (medida em linha reta; treliça A e B)
V23= 20-29 (medida diagonal; treliça B)
V24= 23-29 (medida em linha reta; treliças B e C)
V25= 23-33 (medida diagonal; treliça B)
V26= 23-27 (medida diagonal; treliça C)
V27= 26-29 (medida diagonal; treliça C)

3.5.2 - Asa

Bitner-Mathé e col. (1995), Bitner-Mathé & Klaczko (1999a) e Klaczko (1995) descreveram a asa de *D. mediopunctata*, identificando onze medidas e seis marcos anatômicos. Neste trabalho, a asa direita foi cortada e montada em lâmina contendo uma gota de água. Uma lamínula foi depositada sobre a asa e, em seguida, selada com esmalte de unha. Logo após, os marcos anatômicos foram tomados, empregando uma *camara lucida* ligada a um microscópio ótico Zeiss, com aumento final de 72 vezes.

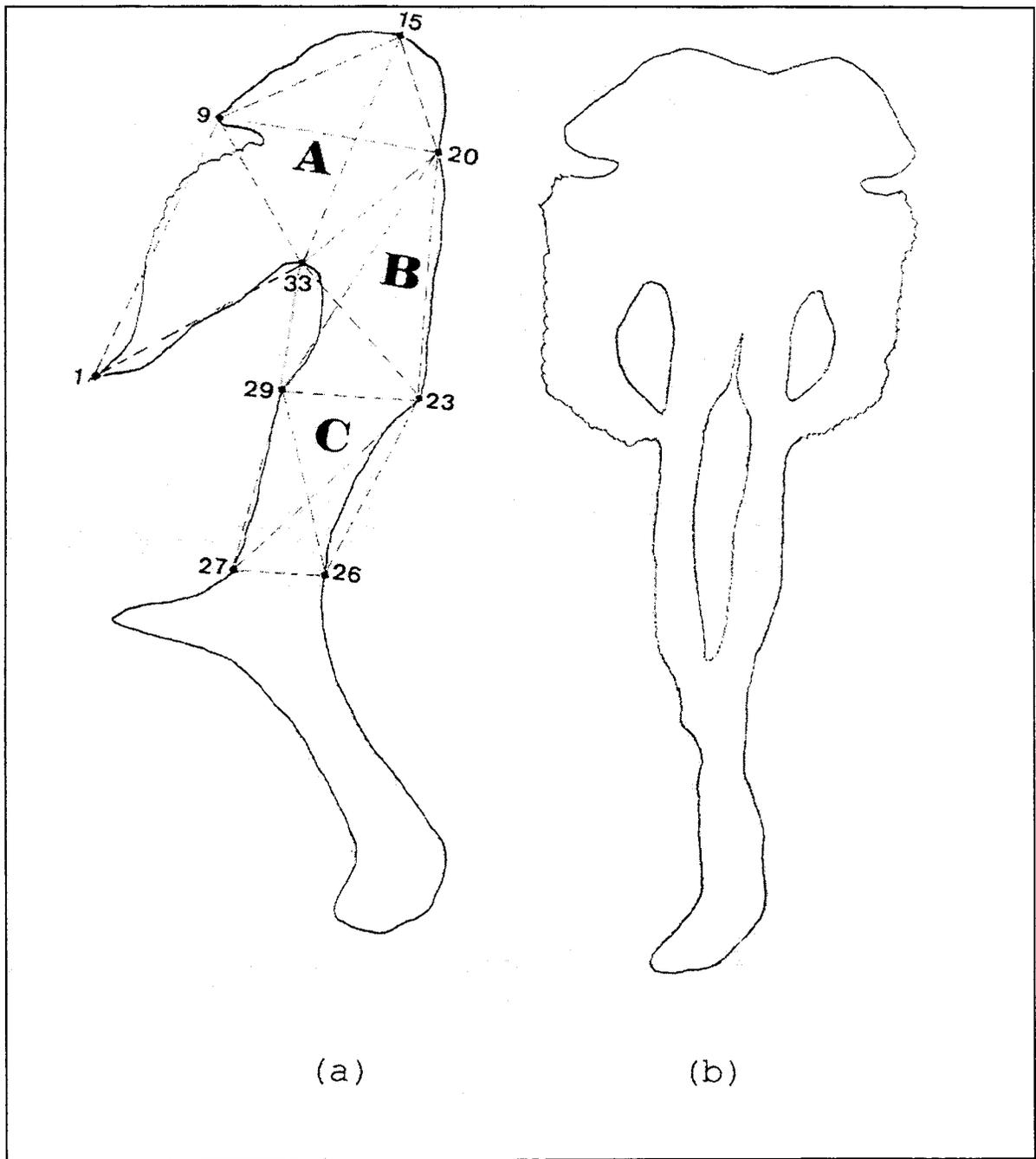


Figura 2. Representação esquemática de dois edeagos de *D. mediopunctata* (aumento de 474x) em posições lateral (a) e dorsal (b), mostrando nove pontos de referência e três regiões (A, B e C).

As coordenadas cartesianas dos marcos anatômicos foram tomadas, empregando uma mesa digitalizadora conectada a um computador pessoal. As seguintes medidas em linha reta foram tomadas (aumento de 72x, veja Figura 3):

D1= A-B

D2= A-E

D3= A-O

D4= B-C

D5= B-D

D6= B-E

D7= B-O

D8= C-D

D9= C-E

D10= D-E

D11= O-E

O corte, a montagem e digitalização das asas de *D. mediopunctata* foram executados por Jorge Habib Jr., sob a supervisão do Prof. Louis Bernard Klaczko.

3.5.3 - "Software" e pacote estatístico

O programa "Digitize" (elaborado por R. E. Strauss, 1988), ao receber os pontos digitalizados para a asa e edeago, organizou uma série de arquivos contendo um conjunto de coordenadas cartesianas. Um outro programa

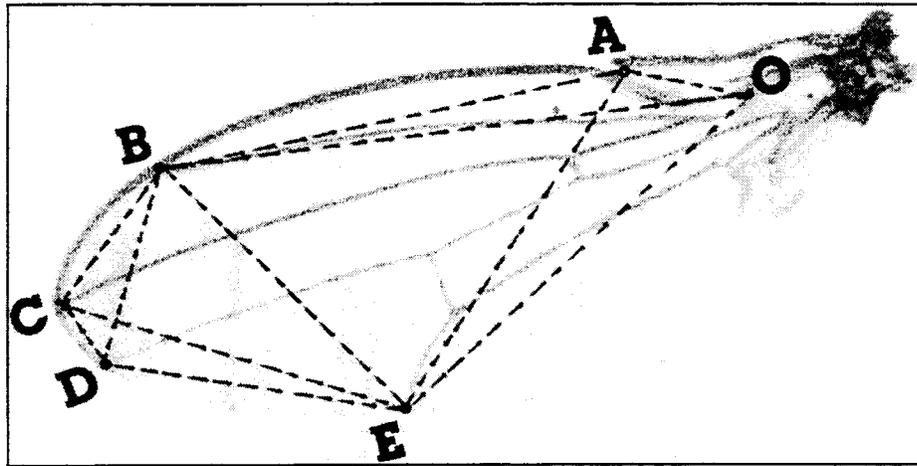


Figura 3. Representação das medidas utilizadas pelo método de treliças para a asa. Medidas desenhadas sobre foto de asa de *D. melanogaster* gentilmente cedida por Roberto Donizete Vieira.

"Distance v. 2.0" (elaborado por R. E. Strauss, 1988) foi empregado com a finalidade de calcular as distâncias entre os pontos de referência.

Os arquivos gerados pelo "Distance" foram transferidos para um editor de texto. Em seguida, estes dados foram enviados para o "Excel", para outras edições. Os dados foram, a seguir, importados, a partir dos arquivos em Excel, pelo Systat (Wilkinson, 1997) no qual foram analisados, com diversas técnicas de análise, inclusive os componentes principais.

3.6 - Análise dos componentes principais

Aos dados aplicamos a análise dos componentes principais (ACP), empregando a matriz de covariância, na qual as variáveis originais foram transformadas em logaritmos. O método dos componentes principais consiste, essencialmente, em uma rotação de eixos de um sistema n-dimensional onde cada dimensão é uma das medidas originais. A rotação é feita de tal modo que seu primeiro eixo, ou o primeiro componente principal coincide com a direção de variação máxima no conjunto de dados originais. O segundo componente principal (CP2) é ortogonal ao CP1 - não sendo portanto correlacionado - e coincide com a direção da segunda maior variação dos

dados, e assim por diante. Podemos visualizar este processo ao imaginarmos que cada animal observado é inicialmente representado por um ponto em um espaço n-dimensional de medidas. Após a rotação, os pontos, embora no mesmo lugar, têm outros valores em um novo sistema de variáveis. Todavia, e mais importante, após a rotação a variância total permanece a mesma, mas as novas variáveis não estão correlacionadas (Klaczko, 1995).

Normalmente em estudos morfológicos há uma correlação positiva entre CP1 e cada uma das variáveis originais. Por esta razão, CP1 é tomado como uma medida de uma variável latente que representa o tamanho total. E na medida que todos os outros componentes são ortogonais ao CP1 - tornando-se independentes do tamanho - representam, portanto, a forma.

4. RESULTADOS

4.1 - Asa

Os dados da asa para ambas as coletas foram agrupados e a análise dos componentes principais foi executada. Os coeficientes de correlação para os três primeiros componentes principais são mostrados na tabela 1. A maioria da variação está concentrada no CP1 (80,6%), seguida do CP2 (9,6%) e do CP3 (5,1%). Juntos explicam 95,2% da variação total. Uma vez que todos os coeficientes de CP1 são positivos - indicando crescimento simultâneo em todas as variáveis com seu aumento - ele pode ser interpretado como a variável latente "tamanho". Assim, o segundo e terceiro componentes principais representam a forma (ambos mostram coeficientes com sinais positivos e negativos). Podemos perceber que para CP2 a maioria dos coeficientes é positiva e significativa, ao passo que aqueles associados às variáveis BC, BD e CD são negativos. Isto sugere que este componente é um contraste entre as medidas da extremidade da asa com as outras. Isto está claramente visível na Figura 4, na qual são mostradas as correlações entre cada uma das variáveis originais da asa com o primeiro e segundo componente principal.

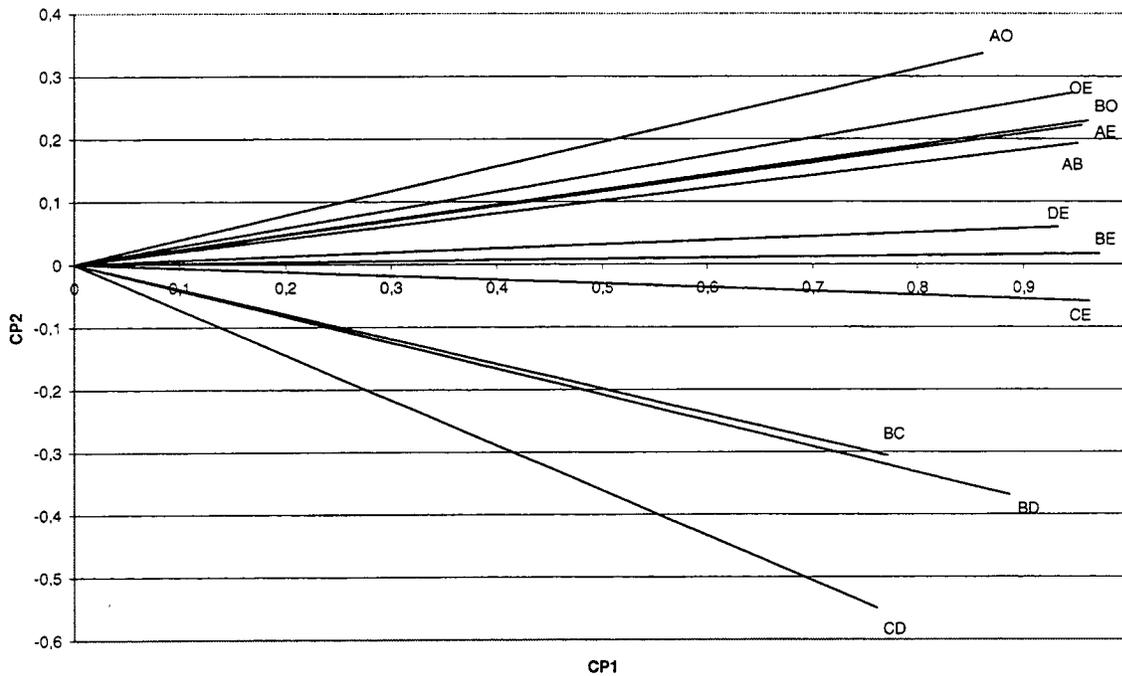


Figura 4. Correlação entre cada uma das características morfológicas da asa de *D. mediopunctata* com o primeiro e segundo componente principal (ordenadas: segundo componente principal; abscissas: primeiro componente principal).

Tabela 1. Correlação entre os três primeiros componentes principais e as onze variáveis originais da asa.

Variáveis	CP1	CP2	CP3
AB	0,952***	0,193*	0,107
AE	0,956***	0,222*	0,035
AO	0,862***	0,336***	0,047
BC	0,771***	-0,306**	-0,537***
BD	0,886***	-0,369***	-0,204*
BE	0,973***	0,017	0,025
BO	0,962***	0,229*	0,095
CD	0,761***	-0,550***	0,337***
CE	0,963***	-0,059	-0,065
DE	0,933***	0,059	-0,158
OE	0,946***	0,273**	0,040

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

4.2 - Edeago

A análise dos componentes principais foi aplicada aos dados agrupados dos edeagos de ambas as coletas. Os coeficientes de correlação das variáveis originais e os primeiros seis componentes principais são mostrados na tabela 2. CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 e CP6 são responsáveis por 24,8%, 19,2%, 13,3%, 10,5%, 9,3% e 7,7%, respectivamente, da variação total - juntos, eles totalizam 86,8%, e os três primeiros, apenas 57,3%.

Tabela 2. Correlação entre os seis primeiros componentes principais e as variáveis originais do edeago.

Variáveis	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
V1	0,172	0,508***	-0,166	0,633***	0,084	0,027
V2	-0,219*	0,337***	0,414***	-0,769***	-0,177	0,076
V3	0,095	0,128	0,032	0,082	0,122	0,890***
V4	0,743***	0,134	0,513***	0,194*	-0,233*	-0,189*
V5	-0,619***	0,677***	-0,255**	0,015	0,059	-0,178
V6	0,280**	0,358***	0,058	0,112	-0,212*	0,418***
V7	-0,464***	0,449***	0,568***	0,252**	0,342***	-0,030
V8	0,732***	0,432***	-0,367***	-0,234**	0,225*	-0,084
V9	0,181	0,752***	0,047	0,097	0,250**	0,012
V10	0,150	0,577***	-0,109	0,536***	-0,014	0,154
V11	-0,277**	0,317*	0,374***	-0,771***	-0,155	0,044
V12	0,128	0,085	-0,007	0,089	0,113	0,868***
V13	0,740***	0,140	0,510***	0,201*	-0,237*	-0,190*
V14	-0,615***	0,681***	-0,249**	0,006	0,059	-0,169
V15	-0,465***	0,446***	0,570***	0,255**	0,343***	-0,033
V16	0,732***	0,425***	-0,354***	-0,220*	0,248**	-0,066
V17	0,175	0,742***	0,042	0,079	0,246**	0,009
V18	0,154	0,934***	0,200*	0,038	0,130	0,076
V19	-0,064	0,317*	-0,133	0,345***	-0,492***	0,303*
V20	-0,084	0,377***	0,207*	-0,474***	-0,258**	0,311*
V21	-0,185	0,327***	0,163	0,181	-0,688***	0,238*
V22	-0,133	0,236*	0,109	0,207*	-0,813***	-0,210*
V23	0,525***	0,525***	-0,288**	0,024	-0,481***	-0,283**
V24	0,066	0,435***	-0,485***	-0,160	-0,407***	0,126
V25	0,773***	0,074	0,467***	-0,054	0,244*	0,070
V26	-0,533***	0,724***	-0,276**	-0,045	0,049	-0,076
V27	-0,424***	0,464***	0,619***	0,218*	0,226*	-0,042

*P<0,05; ** P<0,01;0 ***P<0,001

O segundo componente representa a variável latente tamanho, pois todos os coeficientes são positivos, indicando que há crescimento em todas as variáveis. Os demais componentes representam a forma, com coeficientes positivos e negativos. Isto está visível na Figura 5, que apresenta as correlações entre as variáveis originais e os dois primeiros componentes principais.

4.3 - Asa e Edeago

A tabela 3 mostra correlações entre os seis primeiros componentes do edeago com os três primeiros componentes da asa. Uma correlação positiva alta ($r= 0,767$; $P<0,001$) foi obtida entre o CP2 do edeago com o CP1 da asa, que é um indicador do tamanho. Todavia, as demais correlações entre CP2 do edeago e os demais CPs da asa não foram significativas. A mesma observação pode ser estendida aos demais CPs do edeago (CP1, CP3, CP4, CP5 e CP6) com os dos outros CPs da asa (CP2 e CP3).

Finalmente, é possível comparar os coeficientes de variação das medidas do edeago com os da asa para se ter uma noção da extensão da variabilidade fenotípica naquele órgão. A figura 6 apresenta as distribuições dos coeficientes de variação do edeago e da asa. A Tabela 4 mostra estes coeficientes com suas respectivas médias e

erros-padrões. Verifica-se que o coeficiente de variação do edeago, em média, é maior do que o da asa, indicando, portanto, que a variabilidade fenotípica deste órgão é maior. Isto pode ser confirmado quando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis é aplicado (Qui-quadrado = 14.2; g. l.= 1; P = 0.0002)

A tabela 5 destaca as médias e os desvios-padrões dos componentes principais do edeago e da asa, que foram calculados a partir de duas coletas realizadas na Serra do Japi. Diferenças significativas entre as duas coletas podem ser observadas apenas para CP1 e CP3 do edeago (ambos refletem forma). Nenhuma diferença foi detectada para a asa, quer para seus CPs quer para as variáveis originais (dados não mostrados).

4.4 - Inversões

Como *D. mediopunctata* tem vários cariótipos e alguns deles são bastante raros, formamos cinco classes para o cromossomo II seguindo o que foi proposto por Bitner-Mathé e col. (1995). A análise de variância (veja a tabela 6) aplicada aos primeiros seis CPs do edeago e aos primeiros três da asa (dados apenas da primeira coleta, n = 48), com o propósito de testar a influência do

genótipo, não revelou quaisquer diferenças significativas em função dos cariótipos.

Tabela 3. Correlações entre os primeiros três componentes principais da asa e os primeiros seis componentes principais dos edeagos de *Drosophila mediopunctata*. As probabilidades de cada correlação são dadas abaixo.

	CP1 asa	CP2 asa	CP3 asa
CP1 edeago	0,103	0,021	0,014
	0,279	0,823	0,882
CP2 edeago	0,767	0,115	0,002
	<0,001	0,229	0,983
CP3 edeago	0,120	0,173	-0,002
	0,206	0,068	0,984
CP4 edeago	0,037	-0,051	0,114
	0,697	0,597	0,231
CP5 edeago	-0,074	-0,115	-0,081
	0,439	0,225	0,396
CP6 edeago	-0,135	0,072	0,059
	0,154	0,452	0,535

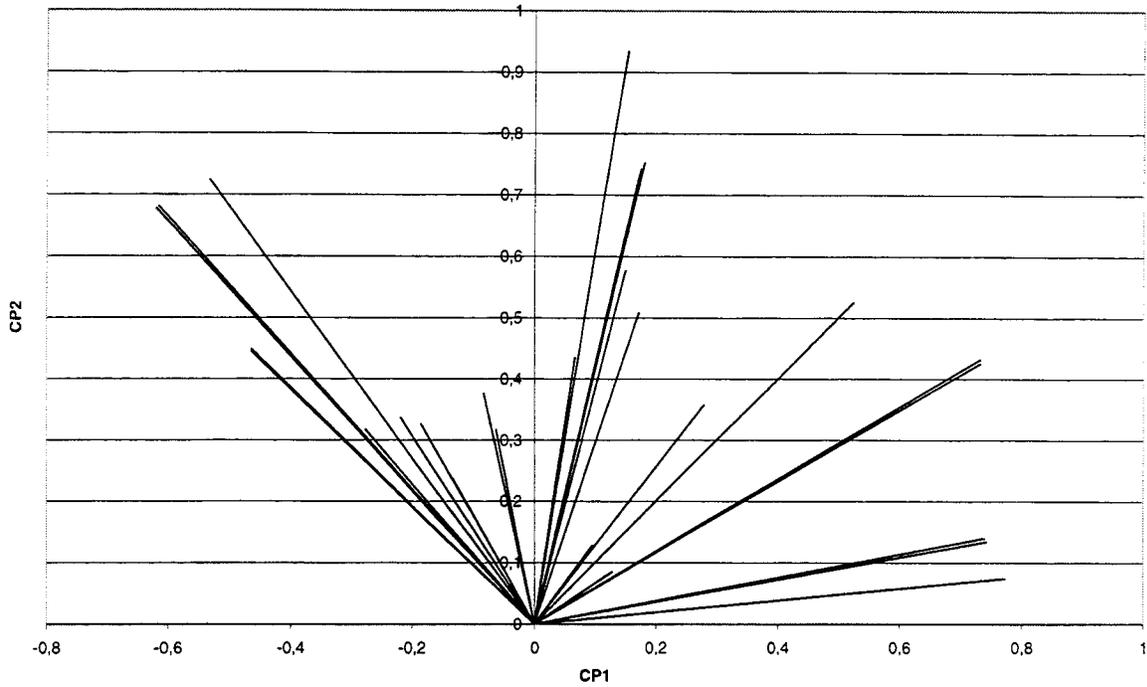


Figura 5. Correlação entre cada uma das características morfológicas do edeago de *D. mediopunctata* com o primeiro e segundo componente principal (ordenadas: segundo componente principal; abscissas: primeiro componente principal).

Tabela 4. Coeficientes de variação (C.V.) expressos em porcentagem das medidas da asa e do edeago

EDEAGO		ASA	
Medida	C.V	Medida	C.V.
V1	8,9	AB	8,1
V2	12,3	AE	8,2
V3	10,1	AD	9,2
V4	12,6	BC	8,4
V5	12,5	BD	7,9
V6	12,4	BE	7,6
V7	10,7	BO	8,0
V8	14,7	CD	11,0
V9	8,4	CE	7,5
V10	8,3	DE	7,5
V11	12,9	OE	8,2
V12	11,2		
V13	12,5		
V14	12,3		
V15	10,7		
V16	15,1		
V17	5,2		
V18	21,4		
V19	10,7		
V20	8,5		
V21	8,2		
V22	11,8		
V23	9,6		
V24	11,3		
V25	13,5		
V26	10,1		
V27	10,4		
Média	11,3	Média	8,3
Erro-padrão	0,6	Erro-padrão	0,3

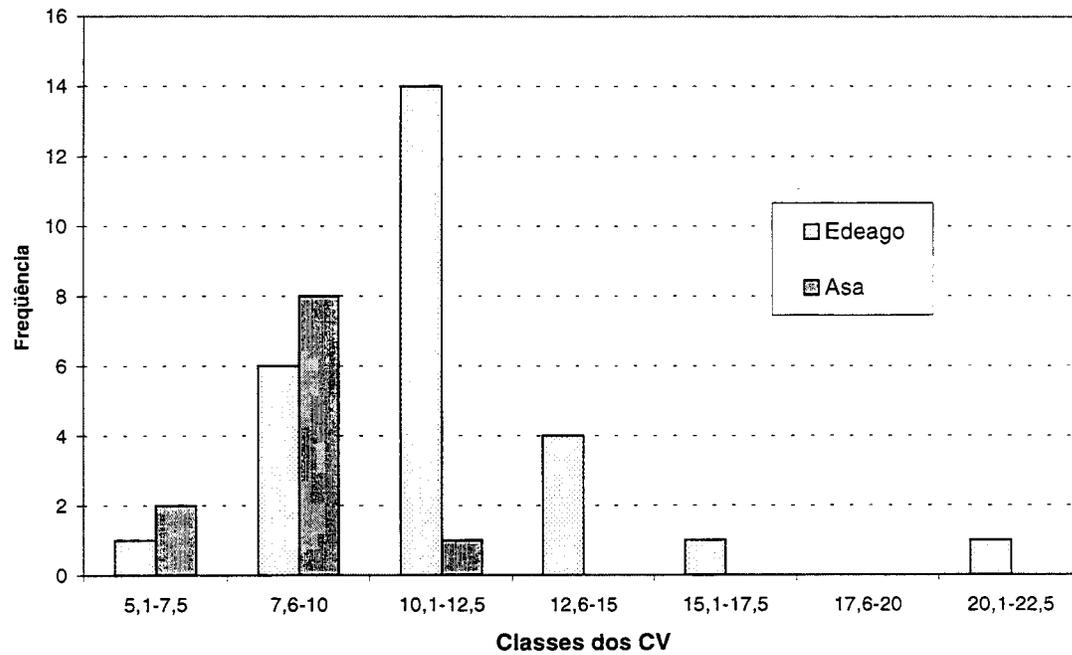


Figura 6. Distribuição dos coeficientes de variação do edeago e da asa de *D. mediopunctata* oriundas da Serra do Japi.

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos componentes principais do edeago e da asa, calculados em cada uma das duas coletas realizadas no Japi. Além disto está colocado o teste t de Student e sua probabilidade. d. p.= desvio padrão; t= teste de Student (graus de liberdade para todos os casos: g.l. = 110).

Variáveis	$\bar{x}_1 \pm \text{d.p.}$	$\bar{x}_2 \pm \text{d.p.}$	t	P
CP1EDEAGO	0,029 ± 0,120	-0,032 ± 0,133	2,60	0,011*
CP2EDEAGO	-0,014 ± 0,119	0,017 ± 0,116	-1,38	0,170
CP3EDEAGO	-0,020 ± 0,098	0,023 ± 0,081	-2,47	0,015*
CP4EDEAGO	-0,007 ± 0,089	0,008 ± 0,074	-0,92	0,358
CP5EDEAGO	-0,005 ± 0,074	0,005 ± 0,087	-0,64	0,523
CP6EDEAGO	0,009 ± 0,076	-0,011 ± 0,070	1,43	0,157
CP1ASA	-0,000 ± 0,110	0,000 ± 0,110	-0,01	0,992
CP2ASA	-0,003 ± 0,039	0,004 ± 0,037	-0,99	0,327
CP3ASA	-0,001 ± 0,031	0,001 ± 0,022	-0,37	0,715

*P<0,05

Tabela 6. Análise de variância dos primeiros seis componentes principais do edeago e dos primeiros três da asa em função do genótipo. (Para todos os casos os graus de liberdade são: g.l. = 4, 43).

COMPONENTE PRINCIPAL	ASA		EDEAGO	
	F	P	F	P
1	0,37	0,829	0,43	0,790
2	0,78	0,546	0,54	0,711
3	1,10	0,368	2,23	0,081
4			1,67	0,175
5			0,15	0,961
6			0,38	0,820

4.5 - Densidade das larvas

A tabela 7 exhibe 27 variáveis originais que foram reduzidas pela análise dos componentes principais a seis CPs. Estes primeiros seis CPs explicam 86,2% da variação total. CP1, CP2, CP3 e CP4 CP5 CP6 contribuíram, respectivamente, com 30,1%, 16,2%, 13,6%, 10,9,%, 9,2% e 6,2% para a variação.

Todos os seis componentes revelam coeficientes positivos e negativos. Mas, o CP2 ao exhibir um quadro com o maior número de variáveis positivas (21 num total de 27) - e das 6 negativas só 2 são significativas - indica

que ele pode novamente ser interpretado como o componente ligado a tamanho.

Na tabela 8 são mostrados as médias e seus respectivos desvios-padrões das variáveis originais. Estes dados foram gerados a partir dos experimentos de densidade baixa (10 larvas/tubo) e alta (100 larvas/tubo).

Quando o teste-t é empregado com o propósito de averiguar se há influência da densidade de larvas sobre a morfologia do edeago, dados significativos podem ser vistos para as seguintes variáveis originais: V2, V11, V18 e V20.

Embora as outras variáveis não mostrem resultados significativos, um fato chama a atenção: as médias da densidade baixa são maiores em 22 dos casos em relação à densidade alta, que exhibe apenas 5 casos favoráveis. Isto parece indicar que os edeagos sofrem influência da densidade. O CP2 altamente significativo demonstra tal fato. Já os demais CPs não demonstram isto.

Tabela 7. Correlação entre os seis primeiros componentes principais e as variáveis originais do edeago. As duas densidades larvais foram agrupadas (n=48).

Variáveis	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
V1	0,168	-0,064	0,204	0,699***	-0,199	0,343*
V2	-0,163	0,667***	0,098	-0,462**	0,161	0,313*
V3	0,119	0,717***	-0,154	0,537***	0,300*	-0,152
V4	0,441**	-0,449**	0,538***	-0,172	0,494***	0,111
V5	-0,625***	0,289*	0,381**	-0,127	-0,460**	-0,088
V6	0,222	-0,008	0,113	-0,319*	0,343*	-0,770***
V7	-0,765***	0,163	0,580***	0,023	0,050	-0,017
V8	0,860***	0,183	0,338**	0,047	-0,276	-0,021
V9	0,162	0,243	0,451**	0,450**	-0,184	0,249
V10	0,296*	0,008	0,162	0,631***	-0,181	0,329*
V11	-0,184	0,691***	0,197	-0,466**	0,095	0,291*
V12	0,187	0,705***	-0,176	0,486***	0,340**	-0,172
V13	0,415**	-0,483**	0,527***	-0,184	0,488***	0,106
V14	-0,616***	0,286	0,389**	-0,116	-0,458**	-0,113
V15	-0,764***	0,164	0,582***	0,027	0,046	-0,017
V16	0,866***	0,190	0,323*	0,011	-0,265	0,008
V17	0,111	0,268	0,506***	0,401**	-0,184	0,278
V18	0,119	0,486***	0,792***	0,191	-0,031	0,207
V19	-0,279	0,187	-0,360*	-0,155	0,387**	0,325*
V20	0,031	0,772***	-0,186	-0,361*	0,281	0,276
V21	-0,343**	-0,042	-0,064	0,093	0,349*	0,120
V22	-0,023	0,231	-0,165	-0,564***	0,167	0,205
V23	0,741***	-0,143	0,226	-0,392**	-0,160	0,087
V24	0,609***	0,454**	-0,233	-0,398**	-0,248	-0,100
V25	0,704***	0,279	0,451**	0,054	0,313*	-0,010
V26	-0,503***	0,360**	0,386**	-0,299*	-0,485***	-0,124
V27	-0,699***	0,193	0,566***	0,067	0,199	-0,184

*P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001

Tabela 8. Média e desvio-padrão das variáveis originais dos edeagos de *D. mediopunctata*. As moscas desenvolveram-se em duas densidades, 10 larvas/tubo (n=20) e 100 larvas/tubo (n=28), \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as médias para as duas densidades, respectivamente, comprimentos expressos em 1/474 mm; d.p.= desvio padrão; t= teste de Student. As últimas seis linhas referem-se aos seis primeiros componentes principais calculados. (Graus de liberdade para todos os casos: g.l. = 46). Os valores em **negrito** representam diferenças significativas ao nível de 1%.

Variáveis	$\bar{x}_1 \pm$ d.p.	$\bar{x}_2 \pm$ d.p.	t	P
V1	42,55 ± 3,91	41,62 ± 3,14	0,92	0,361
V2	33,04 ± 2,35	30,67 ± 3,01	2,93	0,005
V3	22,37 ± 2,49	21,38 ± 2,44	1,38	0,175
V4	33,91 ± 3,85	35,94 ± 3,50	-1,91	0,062
V5	36,80 ± 3,77	35,36 ± 2,86	1,50	0,139
V6	12,50 ± 1,26	13,34 ± 1,71	-1,87	0,068
V7	33,05 ± 4,05	32,51 ± 3,51	0,49	0,624
V8	26,25 ± 2,82	24,62 ± 3,67	1,66	0,102
V9	41,13 ± 2,37	39,75 ± 1,97	2,20	0,033
V10	47,28 ± 3,78	46,61 ± 3,08	0,68	0,499
V11	36,31 ± 2,88	33,55 ± 2,90	3,26	0,002
V12	24,35 ± 2,87	23,24 ± 2,66	1,38	0,173
V13	34,03 ± 3,87	36,23 ± 3,49	-2,06	0,045
V14	37,11 ± 3,82	35,78 ± 2,71	1,41	0,164
V15	33,09 ± 4,05	32,54 ± 3,50	0,51	0,615
V16	29,84 ± 3,07	27,76 ± 4,18	1,88	0,066
V17	27,94 ± 2,20	27,96 ± 1,97	-0,03	0,974
V18	15,23 ± 2,03	13,43 ± 1,96	3,11	0,003
V19	23,63 ± 1,83	23,06 ± 2,39	0,89	0,380
V20	39,25 ± 2,78	35,74 ± 3,11	4,01	0,000
V21	29,74 ± 1,81	31,11 ± 1,86	-2,54	0,015
V22	20,96 ± 2,00	20,62 ± 1,69	0,63	0,534
V23	40,71 ± 3,25	40,67 ± 3,38	0,04	0,969
V24	18,88 ± 2,37	17,62 ± 2,34	1,83	0,074
V25	30,21 ± 2,74	29,02 ± 3,71	1,22	0,230
V26	42,57 ± 3,67	40,90 ± 2,69	1,82	0,075
V27	33,21 ± 3,37	33,19 ± 3,27	0,02	0,981
CP1	0,011 ± 0,101	-0,008 ± 0,139	0,50	0,621
CP2	0,057 ± 0,093	-0,040 ± 0,065	4,26	0,000
CP3	0,008 ± 0,102	-0,006 ± 0,068	0,55	0,585
CP4	-0,003 ± 0,069	0,002 ± 0,079	-0,23	0,818
CP5	-0,020 ± 0,062	0,014 ± 0,070	-1,71	0,093
CP6	0,019 ± 0,056	-0,014 ± 0,052	2,09	0,041

5. DISCUSSÃO

5.1 - A variação da asa

Os resultados de nossa investigação, com relação à morfologia da asa de *Drosophila mediopunctata* na população do Japi, revelam que a variação total pode ser atribuída a duas fontes: tamanho e forma. O tamanho é responsável por 80,6% da variação total, e a forma por 19,4%. As medidas localizadas na extremidade da asa (**BC**, **BD** e **CD**) foram as mais importantes na determinação do segundo e do terceiro componentes principais (variáveis relacionadas à forma).

Estes resultados mostram uma semelhança notável com o trabalho de Bitner-Mathé e col. (1995), que estudando as asas de machos da população do Parque Nacional do Itatiaia de *D. mediopunctata*, verificaram que o tamanho é responsável por 80% da variação total, enquanto a forma responde pelos 20% restantes. Ainda, estes autores descobriram que a variação na extremidade da asa (medidas **BC**, **BD** e **CD**) era responsável por parte importante da variação de forma, ao influenciar o CP2.

Em trabalho recente, Bitner-Mathé e Klaczko (1999a) analisaram as fontes de variação morfológica - tamanho e forma - da asa de fêmeas de *D. mediopunctata* da população do Parque Nacional do Itatiaia. Enquanto tamanho foi

responsável por 75% da variação, forma determinou 25%. Novamente, a variação na extremidade da asa (**BC**, **BD** e **CD**) exerceu forte influência sobre CP2 e CP3.

O que é notável nestes trabalhos, desde as primeiras coletas entre 1985-1988 (Bitner-Mathé e col., 1995; Bitner-Mathé e Klaczko, 1999a) até as de 1994-1995 (o presente trabalho), é que eles mostram um padrão de variação das asas semelhante; mesmo para moscas de áreas geográficas diferentes, como é o caso da Serra do Japi e do Parque Nacional do Itatiaia.

Em um outro grupo de moscas do mesmo gênero (*Drosophila lummei*), Haas e Tolley (1998) descreveram variações na morfologia da asa em três populações geográficas da Eurásia (Suécia, Rússia e Japão), empregando a rede de treliça para quantificar o tamanho e a forma das asas. Este estudo, também, detectou pequenas diferenças na extremidade da asa dentro de uma espécie, através de uma distribuição intercontinental.

Bitner-Mathé e col. (1995) descobriram diferenças entre coletas para tamanho e forma da asa nos machos de *D. mediopunctata* da população do Parque Nacional do Itatiaia. Além disso, tamanho e forma foram afetados pelas inversões do cromossomo II. Deve-se acrescentar

ainda que descobriram interação significativa entre data da coleta e cariótipos.

Nosso estudo não detectou diferenças entre coletas com relação ao tamanho e forma da asa. Do mesmo modo, não houve influência do genótipo (inversão) sobre quaisquer medidas da asa.

Bitner-Mathé e Klaczko (1999a) encontraram diferenças entre coletas para tamanho e forma da asa de fêmeas de *D. mediopunctata* da população do Parque Nacional do Itatiaia, embora o propósito do trabalho fosse estimar a herdabilidade e analisar mudanças temporal e microgeográfica.

Haas e Tolley (1998) citam que seus resultados em *Drosophila lummei*, na Eurásia, corroboraram estudos genéticos nos quais a variação geográfica de um caráter morfológico está relacionada aos polimorfismos cromossômicos entre populações espacialmente separadas.

Uma explicação possível para a discrepância de nossos dados em relação aos trabalhos citados e a aparente uniformidade entre coletas pode estar no fato de que ambas foram efetuadas na mesma época do ano. O tamanho da amostra pode também estar envolvido com este resultado negativo, bem como ser responsável pela não-influência das inversões.

5.2 - A variação do edeago

A variação da morfologia do edeago dos animais da Serra do Japi pode ser decomposta em tamanho e forma, responsáveis, respectivamente, por 19,2% e 80,8% do total. Os primeiros três componentes principais do edeago explicaram apenas 57,3% da variação total. Estes dados contrastam sobremaneira com os da asa, nos quais a contribuição do tamanho foi preponderante (veja acima), e os três primeiros componentes principais explicavam 95,2% da variação total.

Os trabalhos que temos notícia sobre morfometria do edeago em *Drosophila* são os de Tidon-Sklorz (1992) e Tidon-Sklorz e Sene (1995). Os autores detectaram diferenças nítidas entre regiões dos edeagos para três grupos distintos da superespécie *D. serido*. Dados morfométricos indicaram que os três primeiros componentes do edeago em *D. serido* concentram 89% da variação total. O tamanho (CP1) explicou 79% da variação e a forma os 21% restantes.

Talvez, as diferenças entre nossos resultados e os de Tidon-Sklorz (1992) e Tidon-Sklorz e Sene (1995) podem ser explicadas pelo fato de nossa investigação ter se concentrado no nível populacional, enquanto os outros

autores fizeram estudos acima deste nível, analisando espécies.

5.3 - Os tamanhos do edeago e da asa são correlacionados

Nossos dados revelaram que o CP1 da asa e o CP2 do edeago estão positivamente correlacionados. Como a asa é um indicador do tamanho do inseto (Thomas e Barker, 1993; Partridge e col., 1994; de Moed e col., 1997; Norry e col., 1997), podemos afirmar que quanto maior o animal, maior seu edeago.

Outro dado que merece a atenção é a ausência de correlação entre todos os outros CPs do edeago e da asa.

Não é de nosso conhecimento a existência de qualquer trabalho publicado que tenha caracterizado a correlação entre o tamanho do edeago e a asa em *Drosophila*.

5.4 - Inversões cromossômicas e morfologia do edeago

Nós não detectamos associações entre as inversões cromossômicas e a morfologia do edeago. O mesmo se deu com a morfologia da asa (veja acima). O tamanho pequeno da amostra pode ser uma explicação plausível para este resultado negativo.

5.5 - Efeito da densidade das larvas

Em nosso experimento testando o efeito da densidade larval sobre a morfologia do edeago, 86,2% da variação morfológica total desta estrutura foi explicada pelos seis primeiros componentes principais. Novamente observamos que o CP2 pode ser interpretado como tamanho, sendo responsável por apenas 16,2% da variação total, ao passo que a forma foi pela maior parte da variação (83,8%).

Até o presente momento não temos conhecimento de outros trabalhos em *Drosophila* que testaram fatores bióticos e abióticos agindo diretamente sobre a morfologia do edeago. De qualquer modo, as investigações paralelas sobre outros caracteres podem ser pertinentes.

Sang(1949), Lints (1963) e Parsons (1961) mostraram que um aumento na densidade de larva resulta em decréscimo no tamanho do corpo da *Drosophila melanogaster* e um aumento no tempo de desenvolvimento ovo-adulto.

Bosenko e Imasheva (1998) citaram que a mudança na densidade das larvas afeta vários traços da morfologia. Ambos autores destacaram que a densidade das larvas (alta) é um fator biótico estressante, porque resulta em deficiência dos recursos alimentares, conduzindo à fome. Os mesmos autores ainda sustentaram que em populações de

insetos o número de larvas por unidade de meio nutritivo é um dos componentes importantes da competição intraespecífica.

Bitner-Mathé e Klaczko (1999b) estudaram a plasticidade da morfologia da asa de *D. melanogaster* em uma linhagem endocruzada de laboratório que foi cultivada em duas densidades e temperaturas diferentes. Eles observaram que a variação da asa pode ser dividida em dois componentes: um relacionado à variação da forma da asa e outro independente da forma, sendo que a última foi influenciada pela temperatura, ao passo que a primeira foi relacionada com o sexo e densidade.

Embora a literatura revele alguns trabalhos em insetos que focam sobre a conformação da genitália e traços morfológicos gerais (Arnqvist e Thornhill, 1998; Goulson, 1993) ainda é necessário lembrar que o edeago é um dos apêndices da genitália masculina. A natureza de sua plasticidade depende evidentemente não só dos outros apêndices, mas também da contrapartida da interação entre sua ontogenia e o impacto do ambiente. Jolicouer e Mosimann (1960) enfatizaram que a forma tende a fornecer indicações mais fidedignas do que o tamanho com relação à constituição interna dos organismos. Esta argumentação sobre tamanho e forma contrastando com o ambiente é

bastante pertinente com referência ao edeago, que é uma estrutura que age estritamente sobre a genitália feminina.

5.6 - Hipóteses sobre a evolução da genitália masculina

Não é uma tarefa fácil explicar as variações dentro de uma espécie quando as bases genéticas e forças evolutivas são desconhecidas. Eberhard (1985, 1993, 1996), Arnqvist (1997, 1998) e Arnqvist e Thornhill (1998) vem discutindo três hipóteses principais em relação à diversificação e evolução da genitália masculina.

Nossos dados mostram alguns resultados que são relevantes para apoiar ou falsear as três hipóteses principais que seguem adiante:

1. o edeago apresentou padrão de variação morfológica completamente diverso do da asa;
2. o tamanho do edeago mostrou-se positivamente correlacionado com o tamanho da asa;
3. as medidas do edeago exibiram coeficientes de variação mais altos em relação às medidas da asa;
4. o tamanho do edeago sofreu influência da densidade das larvas;

5. nenhum dos componentes principais do edeago ligados à forma mostrou correlação com qualquer componente principal da asa.

5.6.1 - Hipótese chave-e-fechadura

Esta hipótese estabelece que as genitálias masculina e feminina têm apêndices que se ajustam estritamente uma em relação a outra. O desenvolvimento da genitália deve ser altamente canalizado. Arnqvist (1997) relaciona predições e pressupostos que podem testar esta hipótese:

1. qualquer variação morfológica na genitália deve ser relativamente independente de outros caracteres como o tamanho do corpo, em outras palavras, exibiriam correlações fenotípicas baixas;
2. traços da genitália deveriam exibir graus baixos de variação fenotípica dentro de populações;
3. a morfologia da genitália não deveria sofrer grande influência de condições ambientais, sobretudo no tamanho.

A hipótese chave-e-fechadura não pode ser aplicada em nossos dados. Isto pode ser visto ao confrontarmos as previsões (1), (2) e (3) com: a) a correlação positiva alta do tamanho do edeago com o tamanho da asa; b) coeficientes de variação mais alto para o edeago que para

a asa; c) a densidade das larvas exerce influência sobre o tamanho do edeago.

5.6.2 - Hipótese da pleiotropia

Esta hipótese propõe que a variação nas genitálias dos machos e fêmeas é essencialmente neutra e prevê (Arnqvist, 1997):

1. a variação morfológica na genitália deve ser fenotipicamente correlacionados com outros traços;
2. traços da genitália deveriam exibir variabilidade fenotípica comparável, ou ainda maior, do que outros traços similares calibrados.
3. forte plasticidade fenotípica

No presente trabalho obtivemos correlação positiva alta entre o tamanho do edeago (CP2) com o tamanho da asa (CP1). Este achado depõe a favor da hipótese da pleiotropia, na medida em que o tamanho do edeago está correlacionado com cada uma de suas medidas, e da mesma maneira com a asa, satisfazendo portanto o item (1). No entanto, o tamanho do edeago é responsável por uma parte pequena de sua variação (19,2%) e não se detectou para os outros componentes principais qualquer correlação com a asa, o que vai contra a predição da hipótese.

A variação observada nos edeagos foi maior que na asa, em acordo com a previsão (2). No entanto, os padrões

de variação são totalmente distintos, o que não parece se coadunar com a hipótese de pleiotropia.

Apenas o tamanho (CP2) entre os seis componentes principais sofreu uma influência detectável da variação da densidade larval. O que equivale a dizer que há plasticidade fenotípica, mas não muito forte, ou generalizada.

Nossos dados, portanto, não nos permitem descartar a hipótese da pleiotropia, ainda que não pareçam se ajustar exatamente ao que ela prevê.

5.6.3 - Hipótese da seleção sexual

Esta hipótese sustenta que a variação nos traços da genitália intromitente seria relacionada ao sucesso de fertilização do macho. Arnqvist (1997) cita que

1. traços sob seleção sexual exibem variância fenotípica alta;
2. em função do tipo de seleção sexual que esteja atuando, os traços da genitália podem ou não evoluir para ser correlacionados com outros traços morfológicos;
3. dependendo do tipo de seleção sexual que esteja agindo, a expressão fenotípica da genitália pode ou não evoluir para ser dependente da condição ambiental;

Nossos dados estão de acordo diretamente com o item (1), uma vez que o coeficiente de variação do edeago

mostrou-se alto; e, indiretamente, com itens (2) e (3), visto que o tamanho do edeago e o tamanho da asa estão correlacionados, e que a densidade afetou o tamanho dos edeagos. Apesar disto, não podemos afirmar que esta hipótese é a que deve ser escolhida para explicar nossos dados uma vez que ela faz poucas "proibições". Isto é, como há um grande número de modelos de seleção sexual, eles fazem diferentes previsões sobre um mesmo tópico e a hipótese geral não pode ser falsificada. Para testar a hipótese da seleção sexual são necessários experimentos delineados especialmente para este fim testando sua existência.

Por exemplo, Arnqvist e Danielsson (1999) demonstraram que a forma da genitália intromitente do macho é relacionada ao sucesso relativo da paternidade no inseto corredor da água *Gerris lateralis*. Contudo, nenhum efeito foi encontrado em outros traços morfológicos tais como o tamanho do corpo no macho e grau de assimetria em comprimento da pata. Em outro trabalho anterior, Arnqvist e col. (1997) encontraram seleção sexual positiva em favor de macho grande no corredor da água, ao examinar a evolução da genitália animal.

Estruturas da genitália masculina, tal como o processo externo do arco genital do macho, que foi

examinada em duas espécies crípticas, *Drosophila simulans* e *Drosophila mauritiana*, podem também evoluir por seleção sexual devido à preferência da fêmea, implementada através de mecanismos pós-copulatório como o deslocamento de esperma e frequência de reacasamento (Eberhard, 1985; Liu e col., 1996). O processo externo não tem função mecânica conhecida em acasalamento e é bastante reduzido ou inteiramente ausente em alguns membros do subgrupo *melanogaster*. Mas, ele pode ser um ornamento masculino ou dispositivo da corte sexual análogo a várias características sexuais secundárias de outros animais que estão rapidamente evoluindo, como os padrões de plumagem dos pássaros.

Outro aspecto que pode estar atuando no sucesso da paternidade é a duração da cópula que poderia variar em função da estrutura da genitália masculina (Andrés e Rivera, 2000). Este assunto sobre duração da cópula é bastante instigante quando se leva em consideração que em *D. mediopunctata* a cópula é demorada (Klaczko, comun. pessoal)- acima de uma hora.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho descrevemos a morfologia do edeago e da asa de *D. mediopunctata* para duas coletas oriundas da Serra do Japi, empregando a análise dos componentes principais. Além disso, buscamos associações entre as inversões cromossômicas e medidas do edeago e da asa. Examinamos a morfologia do edeago em função da densidade das larvas (alta e baixa). Ademais, discutimos nossos resultados com relação a três hipóteses principais (chave-e-fechadura, pleiotropia e seleção sexual), objetivando corroborá-las ou refutá-las. Assim, podemos concluir que:

1. a variação total da asa pode ser decomposta nos fatores tamanho (PC1) e forma (os demais PCs), os quais foram responsáveis por 80,6% e 19,4%, respectivamente;
2. para o edeago, o segundo componente principal, interpretado como tamanho, foi o responsável por 19,2% da variação total, ao passo que os demais componentes, interpretado como forma, foram responsáveis por 80,8% da variação total;
3. uma correlação positiva alta ($r = 76,7$) entre o segundo componente principal do edeago (tamanho) e o primeiro da asa (tamanho) foi obtida, ao passo que nenhuma das

outras combinações envolvendo os componentes do edeago e da asa exibiu correlação significativa;

4. não foi detectada influência das inversões cromossômicas quer na morfologia da asa, quer na morfologia do edeago;
5. a densidade das larvas exerceu influência significativa sobre o tamanho (PC2) do edeago;
6. com nossos dados é possível refutar a hipótese chave-e-fechadura, mas não as hipóteses de seleção sexual e pleiotropia;
7. o padrão de variação do edeago encontrado não havia sido antecipado explicitamente por nenhuma das hipóteses que explicam a diversificação da genitália masculina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ANDRÉS, J.A. AND A.C. RIVERA. 2000. Copulation duration and fertilization success in a damselfly: an example of cryptic female choice? *Animal Behaviour* **59**: 695-703.
- ARNOLD, J. 1981. Statistics of natural populations. I: Estimating an allele probability in cryptic fathers with a fixed number of offspring. *Biometrics* **37**: 495-504.
- ARNQVIST, G. 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol. Journ. Linn. Soc.* **60**: 365-379.
- ARNQVIST, G. 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature* **393**: 784-786.
- ARNQVIST, G. AND I. DANIELSSON. 1999. Copulatory behavior, genital morphology, and male fertilization success in water striders. *Evolution*, **53**(1): 147-156.
- ARNQVIST, G. AND R. THORNHILL. 1998. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider. *Genet. Res. Camb.* **71**: 193-212.

- ARNQVIST, G., THORNHILL, R. AND L. ROWE. 1997. Evolution of animal genitalia: morphological correlates of fitness components in a water strider. *Jour. Evol. Biology* **10**: 613-640.
- BITNER-MATHÉ, B.C AND L.B. KLACZKO. 1999a. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal, microgeographical variation. *Genetica* **105**(1): 35-42.
- BITNER-MATHÉ, B.C AND L.B. KLACZKO. 1999b. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* **105**: 203-210.
- BITNER-MATHÉ, B.C AND L.B. KLACZKO. 1999c. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity* **83**: 688-696.
- BITNER-MATHÉ, B.C., PEIXOTO, A.A. AND L.B. KLACZKO. 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* **75**: 54-61.
- BOOKSTEIN, F.L. 1978. The measurement of biological shape and shape change. *Lecture notes in biomathematics*, vol. 24, Springer-Verlag, New York, 191 pp.

- BOOKSTEIN, F.L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology*. Cambridge University Press: New York.
- BOOKSTEIN, F.L., CHERNOFF, B., ELDER, R.L., HUMPHRIES, J.M., SMITH, G.R. AND R. E. STRAUSS. 1985. *Morphometrics in Evolutionary Biology*. Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA.
- BOSENKO, D. AND A.G. IMASHEVA. 1998. Effect of larval density on the phenotypic and genetic variation of morphological traits in *Drosophila melanogaster*. *Russian J. of Genetics* **34**(6): 620-623.
- BRADBURY, J.W. AND M.B. ANDERSON. 1987. *Sexual selection: testing the alternatives*. Wiley, New York.
- BREUER, M.E. E C. PAVAN. 1950. Genitália masculina de *Drosophila* (Diptera): grupo *Annulimana*. *Rev. Bras. Biol.* **10**(4), 469-488.
- BREUER, M.E. E C. PAVAN. 1954. Genitália masculina de *Drosophila* do grupo *Dreyfusi* (Diptera). *Rev. Bras. Biol.* **14**(4), 465-475.
- BROWN, K.S.Jr. 1992. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, hábitats, recursos alimentares e variação temporal. In: História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal

- no sudeste do Brasil(ed.L.P.C. Morellato), Ed. da UNICAMP, FAPESP, Campinas.
- CARVALHO, A.B. Peixoto, A.A. AND L.B. Klaczko. 1989. "Sex-ratio" in *Drosophila mediopunctata*. *Heredity* **62**: 425-428.
- COYNE, J.A. 1992. Genetics and speciation. *Nature* **355**(6): 511-515.
- DARWIN, C. 1859. *A origem das espécies*. Trad. de Aulyde Soares. Ed. Univ. Brasília/Melhoramentos.
- de MOED, G.H., G. de JONG AND W. SCHARLOO. 1997. The phenotypic plasticity of wing size in *Drosophila melanogaster*: the cellular basis of its genetic variation. *Heredity* **79**: 260-267.
- DOBZHANSKY, TH. AND C. PAVAN. 1943. Studies on Brazilian Species of *Drosophila*. *Bol. Fac. Fil. Ci. Let. Univ. São Paulo, XXXVI, Biologia Geral* (4): 7-72, 7 pls.
- EBERHARD, W.G. 1985. *Sexual selection and animal genitalia*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- EBERHARD, W.G. 1990. Animal Genitalia and Female Choice. *Amer. Sci.* **78**: 134-141.
- EBERHARD, W.G. 1993. Evaluating models of sexual selection: genitalia as a test case. *Am. Nat.* **142**: 564-571.

- EBERHARD, W.G. 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.
- FALCONER, D.S. 1989. *Introduction to quantitative genetics*, 3rd ed., Longman, Harlow, Essex.
- FISHER, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford Univ. Press, Oxford
- FREIRE-MAIA, N. E C. PAVAN. 1949. Introdução ao estudo da *Drosófila*. *Cultus* 1(5): 1-71.
- FROTA-PESSOA, O. 1954. Revision of the *Tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). Vol. X, art. VI, *Separata dos Arquivos do Museu Paranaense, Curitiba*.
- FUTUYMA, D.G. 1986. *Evolutionary biology*. Sinauer, 2nd. Ed., Massachusetts.
- GOTTHARD, K. AND S. NYLIN. 1995. Adaptive plasticity and plasticity as na adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos* 74: 3-17.
- GOULSON, D. 1993. Variation in the genitalia of the butterfly *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Satyrinae). *Zool. J. Linnean Soc.* 107: 65-71
- HAAS, H.L. AND K.A. TOLLEY. 1998. Geographic variation on of wing morphology in three Eurasian populations of

- the fruit fly, *Drosophila lummei*. *J. Zool. Lond.* **245**: 197-203.
- JOLICOUER, P. AND J.E. MOSIMANN. 1960. Size and shape variation in the Painted Turtle, a principal component analysis. *Growth* **24**: 339-354.
- KLACZKO, L.B. 1995. Population genetics of *D. mediopunctata*. In: L. I. Levine, *Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*, pp. 140-153. Columbia Univ. Press. New York.
- LANDE, R. 1981. Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 3721-3725.
- LEWONTIN, R.C. 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia Univ. Press, New York.
- LINTS, F.A. 1963. Size in Relation to Development-time and Egg-density in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **197**: 1128-1130.
- LIU, J., MERCER, J.M., STAM, L.F., GIBSON, G.C., ZENG Z.-B. AND C.C. LAURIE. 1996. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics* **142**: 1129-1145.

- MAYR, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- McLELLAN, T. AND J.A. ENDLER. 1998. The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects. *Syst. Biol.* **47**(2): 264-281.
- MOLLER, A.P. AND J.J. CUERVO. 1998. Speciation and feather ornamentation in birds. *Evolution* **52**(3): 859-869.
- MONTEIRO, L.R. 1997. Allometric growth and functional integration in the skull of the black caiman *Melanosuchus niger* (Crocodylia: Alligatoridae). A Jackknife approach. *Rev. Bras. Biol.* **57**(1): 31-37.
- MONTEIRO, L.R. AND S.F. REIS. 1999. *Princípios de morfometria Geométrica*. Holos, Editora, Ribeirão Preto, SP.
- NACRUR, J. 1958. Genitália masculina de *Drosophila* do grupo *mesophragmatica* (Diptera). *Rev. Bras. Bio.* **18**(3), 243- 249.
- NEFF, N.A. AND L.F. MARCUS. 1980. A survey of multivariate methods for systematics. Privately published, N. Y.

- NOACH, E.J.K., de JONG, G. AND W. SCHARLOO. 1997. Phenotypic plasticity of wings in selection lines. *Heredity* **79**: 1-9.
- NORRY, F.M., VILARDI, J.C. AND E. HASSON. 1997. Correlations among size-related traits are affected by chromosome inversions in an adaptative polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* **79**: 585-590.
- NYLIN, S. AND K. GOTTHARD. 1998. Plasticity in life-history traits. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 63-83.
- PARSONS, P.A. 1961. Fly size, emergence time and sternopleural chaeta number in *Drosophila*. *Heredity* **16**: 455-473.
- PARTRIDGE, L., BARRIE, B., FOWLER, K. AND V. FRENCH. 1994. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* **48**(4): 1269-1276.
- PIGLIUCCI, M. AND C.R. SCHLICHTING. 1996. Reaction norms of *Arabidopsis*. IV. Relationships between plasticity and fitness. *Heredity* **76**: 427-436.
- PINTO, H.S. Clima da Serra do Japi. In: História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil (ed. L.P.C. Morellato), Ed. da UNICAMP, FAPESP, Campinas.

- PROUT, T. 1995. Four Decades of Inversion Polymorphisms and Dobzhansky's Balancing Selection. In: L. I. Levine, *Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*, pp. 49-55, Columbia Univ. Press. New York
- REIS, S. F., CUNHA, R.A., GARAVELLO, J.C. AND A.S. ABE. 1987. Discriminação pela forma em relação ao tamanho: um exemplo com peixes do gênero *Leporinus*. *Ciência e Cultura* **39**(8): 757-761.
- REIS, S.F. 1988. Morfologia e estatística multivariada em *Biologia Evolutiva*. *Rev. Bras. Zool.* **5**(4): 571-580.
- REYMENT, R. A. 1991. *Multidimensional palaeobiology*. Pergamon Press.
- REYMENT, R. A. 1996. An idiosyncratic history of early morphometric. In: Marcus, L., Corti, M., Loy, A., Naylor, G., Slice, D. E. (eds.), *Advances in Morphometrics*. NATO ASI Series A: Life Sciences, vol. 284. Plenum Publishing Corp., New York.
- RODRIGUES, R. R. AND G. J. SHEPHERD. 1992. Análise da variação estrutural e fisionômica da vegetação e características edáficas, num gradiente altitudinal na Serra do Japi. In: *História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal*

- no sudeste do Brasil (ed. Morellato, L.P.C.), Ed. da UNICAMP/FAPESP, Campinas.
- ROHLF, F.J. AND L.F. MARCUS. 1993. A revolution in morphometrics. *Tree* **8**: 129-132.
- ROWE, L., ARNQVIST, G. SIH, A. AND J. J. KRUPA. 1994. Sexual conflict and the evolutionary ecology of mating patterns: water striders as a model system. *Tree* **9**(8): 289-293.
- SANG, J. H. 1949. The ecological determinants of population growth in a *Drosophila* culture. *Phys. Zoöl.* **22**(3): 183-223.
- SCUDDER, G. G. E. 1971. Comparative morphology of insect genitalia. *Annu. Rev. Ent.* **16**: 379-406.
- SHAPIRO, A, M. AND A. H. PORTER. 1989. The lock-and-key hypothesis evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Ann. Rev. Entomol.* **34**: 231-245.
- SILVA, A. F. G. AND F. M. SENE. 1991. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Ent.* **35**: 455-468.
- STRAUSS, R. E. AND F. L. BOOKSTEIN. 1982. The truss: body form reconstructions in morphometrics. *Syst. Zool.* **31**: 113-135.

- THOMAS, R. H. AND J. S. F.BARKER. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 598-608.
- THOMPSON, D. W. 1917. *On Growth and Form*. Cambridge University Press.
- TIDON-SKLORZ, R. 1992. Identificação da fauna de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) da Cadeia do Espinhaço, e análise morfométrica das populações da espécie politípica *D. serido*. São Paulo. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Univ. de São Paulo.
- TIDON-SKLORZ, R. and F.M. SENE. 1995. Evolution of the Buzzatii cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evol. Biol.* **8 y 9**: 71-85.
- TURELLI, M. 1988. Phenotypic evolution, constant covariances, and the maintenance of additive variance. *Evolution* **42**: 1342-1347.
- VAL, F.C., VILELA, C.R. AND M.D. MARQUES. 1981. *Drosophilidae* of neotropical region. In: M. Ashburner, Carson, H. C., and J. N. Thompson, Jr. (eds), *The genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3a. London: Academic Press.

- VILELA, C.R. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revta Bras. Ent.* **27**(1): 1-114.
- VILELA, C.R. AND G. BACHLI. 1990. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt. Scheiz. Ent. Ges.* **63**: 1-332 (Supp.).
- VILELA, R.C. AND M.A.Q.P. PEREIRA. 1985. On the male genitalia of five species of the *Tripunctata* group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Ent.* **29**(3/4): 453-461.
- WEST-EBERHARD, M.J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Syst.* **20**: 249-278.
- WHEELER, M.R. AND M.P. KAMBYSELLIS, . 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. *Univ. Texas Publs.* **6615**: 533-565.
- WILKINSON, L. 1997. *Systat for windows*, version 7. SPSS Inc, Chicago.