

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/53079

IB/ 81903

INSTITUTO DE BIOLOGIA





UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**VARIABILIDADE GENÉTICA E INTERAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE PARA
TAMANHO E FORMA DA ASA EM DUAS ESPÉCIES DE *DROSOPHILA*.**

Roberto Donisete Vieira

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Roberto Donisete Vieira</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação 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)
2002**

UNIDADE TF/81903
Nº CHAMADA TI/UNICAMP
V673v
V _____ EX _____
TOMBO 53079
PROC 16-124703
C _____ D _____ X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 09/04/03
Nº CPD _____

CN00101046-E

16-124703

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

V673v

Vieira, Roberto Donisete

Variabilidade genética e interação genótipo-ambiente para
tamanho e forma da asa em duas espécies de *drosophila* /
Roberto Donisete Vieira. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

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

1.Drosophila. 2.Asas. 3.Temperatura. I.Klaczko, Louis Bernard
II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Campinas (SP), 22 de novembro de 2002

BANCA EXAMINADORA

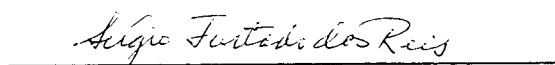
Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko:
(Orientador)

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Rosana Tidon-Sklorz:

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis:

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Ana Maria L. Azeredo-Espin:

A horizontal line for a signature.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko, por sua orientação sempre cordial, atenciosa, paciente, rigorosa e segura que me norteou e possibilitou superar muitas dificuldades e limitações ao longo destes anos de trabalho, constituindo para mim um grande legado de aprimoramento pessoal, cultural e profissional.

Aos meus fraternos colegas de laboratório: Galia, Luciana, Luciene, Carlos Alberto, Hermes, Horácio, Felipe e Marcos, pela inestimável colaboração e incentivo que foram essenciais em diferentes etapas de realização deste trabalho, e também pela simpatia e humor que sempre permearam nossas atividades diárias.

Aos funcionários do laboratório: Wilma Nascimento de Souza, Aparecida Ramos Libânio e Láercio Santana, pela cordial e afetiva convivência e pela presteza e qualidade do suporte que proporcionaram à execução dos meus experimentos.

Às professoras: Dra. Blanche Bitner-Mathé, Dra. Rosana Tidon e Dra. Vera Nisaka Solferini, pela cordialidade e atenção que me dispensaram por ocasião da pré-banca, apresentando valiosas e oportunas sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento desta dissertação.

Às seguintes Instituições: 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 a este laboratório, onde transcorreu meu trabalho e grande parte de minha formação.

“...the organism is not specified by its genes, but is a unique outcome of an ontogenetic process that is contingent on the sequence of environments in which it occurs.”.....

Richard Lewontin (2000)

ÍNDICE

1. Introdução

1.1. Interação genótipo-ambiente.....	02
1.2. Herdabilidade.....	04
1.3. Correlações fenotípicas.....	06
1.4. Temperatura.....	08
1.5. Morfometria da asa de <i>Drosophila</i>	09
1.6. <i>Drosophila</i> como modelo experimental.....	11
1.7. Objetivos.....	12

2. Material e Métodos

2.1. Desenhos experimentais	
2.1.1. Experimentos com <i>D. melanogaster</i>	14
2.1.2. Experimento com <i>D. mediopunctata</i>	20
2.2. Montagem e digitalização do material.....	21
2.3. Análise morfométrica da asa pelo Método da Elipse.....	22
2.4. Estimativas das herdabilidades e das correlações fenotípicas.....	25
2.5. Análise da interação genótipo-ambiente.....	26

3. Resultados

3.1. Experimentos com <i>D. melanogaster</i>	
3.1.1. Estatísticas descritivas.....	27
3.1.2. Estimativas das herdabilidades.....	29
3.1.3. Análise da interação genótipo-ambiente.....	31
3.1.4. Correlações fenotípicas.....	42
3.2. Experimento com <i>D. mediopunctata</i>	
3.2.1. Estatísticas descritivas.....	44
3.2.2. Herdabilidade e interação com coleta.....	45
3.2.3. Correlações fenotípicas.....	48
3.3. Resultados comparados	
3.3.1. Elipses representativas dos dados experimentais.....	50
3.3.2. Comparação entre valores das correlações fenotípicas.....	54

4. Discussão

4.1. Estudos morfométricos da asa de <i>Drosophila</i> com o método da elipse.....	57
4.2. Experimento com <i>D. melanogaster</i>	
4.2.1. Dados morfométricos: fase 1.....	57
4.2.2. Dados morfométricos: fase 2.....	59
4.2.3. Herdabilidade e interação genótipo-ambiente.....	60
4.2.4. Correlações fenotípicas.....	62
4.3. Experimento com <i>D. mediopunctata</i>	
4.3.1. Dados morfométricos.....	63
4.3.2. Herdabilidade e interação com coleta.....	64
4.3.3. Correlações fenotípicas.....	65
4.4. Comparação entre os resultados das duas espécies.....	66
5. Conclusão geral.....	68
6. Referências bibliográficas.....	70
7. Anexo 1.....	76

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo investigar a plasticidade, a variabilidade genética, a interação genótipo-ambiente e as correlações fenotípicas em traços morfológicos da asa das espécies *D. melanogaster* e *D. mediopunctata*. Os dados foram obtidos pela aplicação do método da elipse (Klaczko & Bitner-Mathé, 1990; Klaczko, 1995) às imagens digitalizadas das asas, considerando-se na análise os seguintes parâmetros ou traços: tamanho (SI), forma (SH) e os ângulos θ , formados entre o eixo maior de uma elipse ajustada a cada asa e os segmentos que unem o centro desta elipse até os pontos denominados A, B, C, D, E e J, marcados nas extremidades ou junções das veias das asas.

O experimento com *D. melanogaster* foi desenvolvido em 2 fases distintas. Na fase 1, o material analisado proveio de moscas fêmeas coletadas em ambiente urbano (Recife, PE) e de sua prole fêmea F1 criada em 2 temperaturas constantes: 16,5°C e 25°C. Na fase 2, o material analisado foi obtido de moscas fêmeas parentais descendentes da fase 1 e de sua prole fêmea F1 criada nas mesmas condições da fase anterior. O material de *D. mediopunctata* foi extraído de moscas fêmeas coletadas na Mata de Sta. Genebra (Campinas, SP) e de sua prole fêmea F1 criada na temperatura fixa de 16,5°C.

Os resultados encontrados para *D. melanogaster* mostraram a existência de variabilidade genética para SI e SH e ângulos θ , a presença de interação genótipo-ambiente para SH, em condições controladas, plasticidade fenotípica para SI e SH e correlações fenotípicas muito significativas entre diversos traços, especialmente entre SH e ângulos θ_B , θ_D e θ_E . Para *D. mediopunctata*, os resultados revelaram variação fenotípica para os diversos traços, exceto SH, variabilidade genética elevada para SH e todos os ângulos θ e correlações fenotípicas elevadas. De modo geral, os dados obtidos com o método da elipse exibiram grande concordância com resultados de outros trabalhos com *Drosophila*, nos quais diferentes métodos da morfometria tradicional e geométrica foram aplicados no estudo da asa.

ABSTRACT

The objective of the present work is to investigate the plasticity, the genetic variability, the genotype-environment interactions and the phenotypic correlations in morphologic wing traits of the species *D. melanogaster* and *D. mediopunctata*. The data were obtained by the application of the ellipse method (Klaczko & Bitner-Mathé, 1990; Klaczko, 1995) on the digitized images of the wings, considering the following parameters or traits: size (SI), shape (SH) and the angles θ , formed between the biggest axis of an ellipse fitted to each wing and the segments that connect the center of this ellipse to points called A, B, C, D, E and J, marked at the extremities or junctions of wing veins.

The experiment with *D. melanogaster* was developed in 2 distinct phases. In phase 1, the analyzed material came from female flies collected in an urban environment (Recife, PE) and from the female offspring raised at 2 fixed temperatures: 16,5°C and 25°C. In phase 2, the material was obtained from female flies descendant of phase 1 and of their female offspring raised in the same conditions as the previous phase. The material of *D. mediopunctata* was extracted from female flies collected in Sta. Genebra woodland (Campinas, SP) and of their female offspring raised at 16,5°C.

The results found with *D. melanogaster* showed: the existence of genetic variability of SI and SH, the presence of genotype-environment interaction of SH in controlled conditions, great phenotypic variation for SI and SH, very significant phenotypic correlations between diverse traits, especially between SH and angles θ_B , θ_D and θ_E . The results with *D. mediopunctata* also disclosed phenotypic variation of different traits, except SH; genetic variability of SH and angles θ and significant phenotypic correlations. In general, the data obtained with the method of the ellipse showed great agreement with results of other works with *Drosophila* in which different methodologies were applied in the study of the wing.

1. INTRODUÇÃO

É amplamente aceito que a variabilidade fenotípica resulta de duas tendências antagônicas: de um lado, as fontes de variação, incluindo mutações genéticas, efeitos ambientais e erros de desenvolvimento; do outro lado, um conjunto de processos regulatórios e de tamponamento que incluem canalização, plasticidade e estabilidade desenvolvimental ou homeostase fisiológica, os quais têm recebido muita atenção visando compreender sua bases genéticas e implicações evolutivas (Debat & David, 2001). Dentro desta perspectiva e tendo em vista que a grande variabilidade observada nos organismos refere-se a traços quantitativos, diferentes programas de pesquisa têm focalizado duas questões centrais dentro da Biologia.

A primeira, tida como um paradoxo, refere-se ao fato de que as populações naturais exibem abundante variação poligênica apesar de estarem sujeitas à seleção estabilizadora que deveria eliminar esta variação (Barton & Turelli, 1989). Entretanto, os mecanismos responsáveis pela variação genética em traços quantitativos e pela sua manutenção em populações naturais ainda são alvo de extensos debates teóricos (Via & Lande, 1987; Barton & Turelli, 1989; Bulmer, 1989; Gillespie & Turelli, 1989; Zhivotovsky & Gavrillets, 1992, Roff, 1997). Para tentar elucidar esta questão, diversos modelos foram propostos, entre os quais destacam-se: balanço entre mutação-seleção estabilizadora, seleção dependente de frequência, vantagem do heterozigoto, interação genótipo-ambiente, antagonismo pleiotrópico (conforme revisão de Roff, 1997).

A segunda questão busca entender a relação entre a variabilidade fenotípica dos organismos e a variabilidade dos ambientes em que eles vivem, através dos estudos sobre plasticidade fenotípica em traços quantitativos (Zhivotovsky *et al.*, 1996). A plasticidade fenotípica é conceituada como a capacidade de um único genótipo produzir fenótipos alternativos em resposta às condições ambientais (West-Eberhard, 1989; Via, 1994) ou como a mudança na expressão fenotípica de um genótipo como função do ambiente (Scheiner, 1993).

O conjunto de fenótipos produzidos em diferentes ambientes é denominado norma de reação de um genótipo (Via, 1994). Em invertebrados, um exemplo clássico é o estudo de Gupta & Lewontin (1982) sobre o número de cerdas em populações de *D. pseudoobscura*.

1.1. Interação genótipo-ambiente

Quando os efeitos do genótipo e do ambiente não são aditivos na expressão de um determinado traço, mas diferem de acordo com o ambiente onde o genótipo é expresso, tem-se a interação genótipo-ambiente (Hartl, 2000), que também pode ser entendida como uma variação genética na plasticidade fenotípica (Via, 1994), podendo causar: diferentes respostas à seleção, dependendo do ambiente da geração parental e o da sua prole; resposta reversa à seleção direcional; mudanças nas correlações genéticas e fenotípicas entre os traços através dos ambientes e homeostase genética (Zhivotovsky *et al.*, 1996).

Baseados na importância da interação genótipo-ambiente, que é comumente observada em traços quantitativos, incluindo aqueles ligados à aptidão, Gillespie & Turelli (1989) elaboraram um conjunto de modelos no qual se afirma que diferentes ambientes frequentemente favorecerão diferentes fenótipos e que isto também pode promover a manutenção da variabilidade genética. A proposição destes modelos propiciou novas discussões teóricas, visto que alguns de seus pressupostos e conclusões contrapõem-se aos estudos de Via & Lande (1987) sobre os efeitos da interação genótipo-ambiente na evolução da variabilidade genética em ambientes heterogêneos. Estes últimos autores argumentam que a variabilidade genética é mantida pelo balanço entre mutação pleiotrópica, recombinação e a força da seleção estabilizadora agindo em todos os ambientes, enquanto que a interação genótipo-ambiente teria importância apenas em condições muito restritas.

Todavia, o modelo de Gillespie & Turelli (1989) recebeu novos suportes teóricos a partir do trabalho de Zhivotovsky & Gavrilets (1992) no qual se afirma que um polimorfismo pode ser

protegido se o ambiente é heterogêneo e se os genótipos diferem em sua sensibilidade às condições ambientais, isto é, caso exista interação genótipo-ambiente.

No plano experimental, o modelo de Gillespie & Turelli (1989) propiciou o desenvolvimento de um campo de pesquisa que tem investigado a importância da interação genótipo-ambiente dentre os mecanismos de manutenção da variabilidade genética e evolução de traços quantitativos, com diversos trabalhos sendo executados com diferentes organismos, como por exemplo: *D. melanogaster* (Fry *et al.*, 1996; Gurganus *et al.* 1998; Wayne & Mackay, 1998; Vieira *et al.*, 2000), os pássaros *Parus caeruleus* (Merila & Fry, 1998) e *Ficedula albicollis* (Qvarnstrom, 1999), a mariposa *Achroia grisella* (Jia *et al.*, 2000), o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Shook & Johnson, 1999), e diferentes espécies de plantas (Booy *et al.*, 2000; Campbell & Waser, 2001). Embora tenham sido encontradas evidências da importância da interação genótipo-ambiente, esta questão permanece em aberto, necessitando, ainda, de novas abordagens experimentais para avaliar sua importância em diferentes modelos nos quais esta interação está sendo considerada.

Além de sua importância nos estudos dos processos adaptativos, a interação genótipo-ambiente acarreta diversas outras implicações do ponto de vista econômico e social. No campo do melhoramento genético vegetal, a presença desta interação representa uma grande dificuldade, porque, comumente, faz com que os melhores genótipos num determinado local não o sejam em outros, dificultando a recomendação de genótipos (cultivares) para todo o conjunto de ambientes testados (Duarte & Vencovsky, 1999).

A ocorrência deste tipo de interação contrapõe-se, também, à idéia do determinismo genético divulgada por algumas correntes de pensamento dentro da Biologia, que vêem uma predeterminação interna rígida do organismo por seus genes, a tal ponto, que a linguagem usada para descrever a bioquímica dos genes implica uma auto-suficiência interna do DNA, como moléculas que se reproduzem a si mesmas e que têm o poder de fazer as substâncias das

quais o organismo é composto, contendo toda a informação necessária para especificar um organismo completo. Entretanto, um genótipo não especifica um único resultado para o desenvolvimento, antes, ele especifica a norma de reação, um modelo com diferentes resultados de desenvolvimento em diferentes ambientes (Lewontin, 2000).

1.2. Herdabilidade

A herdabilidade é uma medida fundamental de um caráter quantitativo que tem atenção constante nos estudos de evolução e nos programas de melhoramento genético, visto que a efetividade da seleção natural ou artificial depende do grau de herdabilidade dos traços selecionados, o que constitui um importante indicador da extensão em que o traço pode evoluir (Hoffmann & Merilä, 1999). A herdabilidade senso estrito (h^2) de um traço é definida como a proporção da variância fenotípica V_P explicada pela variância genética aditiva V_A , ou seja, $h^2 = V_A/V_P$ (Falconer & Mackay, 1996).

Mousseau & Roff (1987) efetuaram um estudo com 1120 estimativas de h^2 coletadas de 140 fontes, representando 75 espécies, as quais não incluíam o gênero *Drosophila*, e encontraram que traços vitais, tais como, longevidade e fecundidade, tenderam a apresentar menores herdabilidades em relação a traços morfológicos, com médias $\pm$ erro-padrão de $0,260 \pm 0,028$ e $0,530 \pm 0,021$, respectivamente. Traços fisiológicos e comportamentais apresentaram valores muito semelhante aos traços vitais com médias de $0,27 \pm 0,040$ e $0,32 \pm 0,050$, respectivamente, indicando que estes traços estão sujeitos a ação de agentes seletivos semelhantes àqueles que influenciam os vitais, embora ainda apresentem considerável variabilidade genética.

Para espécies do gênero *Drosophila*, Roff & Mousseau (1987) analisaram 130 estudos de h^2 , encontrando que as estimativas de h^2 para traços morfológicos variaram de 10% a 60%, com média e desvio padrão de $31,9 \pm 1,45$, enquanto que para traços comportamentais e vitais as estimativas situaram-se entre 0% e 30%, com médias de $17,99 \pm 2,84$ e $11,94 \pm 2,05$,

respectivamente. Estes resultados mostram concordância com aqueles obtidos no estudo anterior com as demais espécies animais, com relação às três categorias de traços estudados, embora as médias apresentem diferenças muito significativas.

Por outro lado, estudos recentes têm investigado se alguns tipos de condições ambientais têm efeito consistente sobre a variação herdável, analisando se esta variação difere entre condições favoráveis e desfavoráveis ou estressantes, que seriam aquelas conduzindo à drástica redução do valor adaptativo (Hoffmann & Merilä, 1999). Comparações envolvendo estimativas de h^2 em espécies de *Drosophila* sugerem que temperaturas extremas tendem a aumentar a herdabilidade do comprimento do tórax e, em menor grau, do comprimento da asa, particularmente quando combinada com condições nutricionais pobres. Estas diferenças tendem a envolver mudanças na variância genética bem como na variância ambiental (Hoffmann & Merila, 1999). Trabalhos conduzidos por Imasheva *et al.* (1998, 1999) e Bubliy & Loeschcke (2001), com *D. melanogaster* em condições de estresse térmico e nutricional mostraram aumento na expressão da variação genética em traços morfológicos.

Todavia, esta questão permanece controversa, pois um aumento de h^2 sob condições desfavoráveis não tem sido observado em todos os estudos, como mostrou trabalho de Hoffmann & Schiffer (1998), que usaram uma combinação de baixa temperatura, etanol e meio nutricional pobre, para medir h^2 de traços morfológicos em *D. melanogaster* e obtiveram redução nos valores de h^2 para traços da asa, em relação aos seus controles, o que pôde ser explicado por aumento na variância ambiental, sob estresse, enquanto o níveis de variância genética aditiva permaneceram relativamente constantes. Resultados semelhantes de h^2 foram obtidos por Bubliy *et al.* (2000), para comprimento de asa e tórax em *D. melanogaster*, sob condições nutricionais pobres.

Geralmente, um dos interesses que se tem é extrapolar os valores de h^2 obtidos no laboratório, para o que está ocorrendo sob condições de campo. Coyne & Beecham (1987)

destacam que medidas de herdabilidade e correlações genéticas na natureza permitem estimar a taxa, a direção e os limites da evolução a curto prazo, e reconstruir modelos históricos de seleção natural e seus alvos num conjunto de traços correlacionados evolutivamente. Entretanto, desde que h^2 representa a razão entre variâncias, se uma ou ambas variâncias diferem entre o campo e laboratório, tal extrapolação é problemática. Esta dificuldade é baseada na idéia de que a quantidade de variação ambiental, ocorrendo sob condições de laboratório, é uma severa subestimativa do que ocorre no campo, porque a variância ambiental está incluída na variância fenotípica total e o aumento de V_p em relação a V_A resultará em redução de h^2 (Weigensberg & Roff, 1996).

Visando investigar esta questão, Weigensberg & Roff (1996) realizaram um estudo que comparou herdabilidades de campo e laboratório para traços morfológicos, comportamentais e vitais em 165 estimativas extraídas de 45 trabalhos feitos com 40 diferentes espécies animais, encontrando níveis comparáveis de h^2 e nenhuma diferença significativa entre campo e laboratório para todos os tipos de traços analisados, indicando que as estimativas de h^2 no laboratório geralmente fornecem uma razoável estimativa da magnitude de h^2 na natureza. Do total de 165 estimativas de h^2 no campo, 139, ou 84%, são significativamente diferentes de zero. Neste mesmo estudo, um conjunto de dados contendo estimativas de h^2 para o mesmo traço e população exibiu alta correlação entre campo e laboratório: $r = 0,635$, $N=22$ e $P < 0,002$, corroborando a idéia de que as estimativas de h^2 no laboratório podem ser um valioso indicador do potencial evolutivo de determinados traços nas populações naturais de animais.

1.3. Correlações fenotípicas

Comumente, os traços dos organismos não são herdados como unidades independentes, mas diversos traços tendem a estar associados entre si. Numa amostra da população, a associação entre dois traços pode ser diretamente observada através da correlação de seus valores fenotípicos, ou seja, a correlação fenotípica, que é determinada por suas correlações

genéticas e ambientais. A causa genética da correlação resulta principalmente de efeitos pleiotrópicos, embora o desequilíbrio de ligação, devido a seleção, deriva genética ou cruzamentos preferencias, podem causar uma correlação genética transitória. O ambiente é a causa da correlação quando dois traços são influenciados pelas mesmas diferenças de condições ambientais (Falconer & Mackay, 1996; Roff, 1997).

Conforme discutido por Falconer & Mackay (1996), em razão das causas genéticas e ambientais combinarem-se para dar a correlação fenotípica, se ambos os traços têm baixa herdabilidade, então a correlação fenotípica é determinada principalmente pela correlação ambiental. Por outro lado, se os dois traços têm altas herdabilidades, então a correlação genética pode ser mais importante. Esta natureza dual da correlação fenotípica faz com que a magnitude e o sinal da correlação genética não possam ser determinados unicamente a partir da correlação fenotípica.

Entretanto, Roff (1997) reafirma a conclusão do trabalho de Roff & Mousseau (1987) sobre correlações fenotípicas e genéticas em *Drosophila* no qual se sugeriu que as correlações fenotípicas podem ser uma razoável estimativa das correlações genéticas quando somente traços morfológicos são considerados, e também cita conclusão neste mesmo sentido proposta por Cheverud (1988) que analisou 41 pares de matrizes de correlações genéticas e fenotípicas oriundas de 23 estudos feitos em diferentes organismos animais, incluindo humanos. A conjectura de Cheverud (1988) foi revisitada e corroborada em experimento com a mosca *Sepsis cynipsea* desenvolvido por Reusch & Blanckenhorn (1998), e num extenso trabalho com mais de 4000 correlações genéticas e fenotípicas representado 27 diferentes espécies de plantas, realizado por Waitt & Levin (1998).

Linch & Walsh (1998) consideram que esta questão permanece em aberto, devido à influência dos fatores ambientais, embora, admitam que a similaridade entre as correlações fenotípicas e genéticas seja particularmente válida para traços morfológicos, nos casos em que

o número efetivo de famílias do experimento é maior que 50. Portanto, pode-se inferir desta discussão que a análise das correlações fenotípicas sobre os traços da asa de *Drosophila* pode contribuir para um melhor entendimento de sua arquitetura genética.

1.4. Temperatura

A temperatura é o fator ambiental mais comumente analisado nos diferentes trabalhos sobre expressão da plasticidade fenotípica em diferentes traços quantitativos. A importância deste fator deve-se ao fato de que 99,9% das espécies do planeta são ectotérmicas, ou seja, elas dependem primariamente de fontes externas para fornecer calor para seus corpos. Dado que mudanças de temperatura são um fenômeno universal, desde as curtas flutuações ao longo dos dias até mudanças climáticas de longo prazo, é fundamental entender o efeito da temperatura sobre ectotérmicos. Muitos estudos têm mostrado que ectotérmicos normalmente tornam-se maiores quando criados em baixa temperatura. Estes resultados foram observados em 83% de 109 estudos em ectotérmicos, incluindo muitos taxa de animais, plantas, protistas e mesmo uma bactéria (Atkinson & Sibly, 1997).

Para *Drosophila*, a temperatura é um importante fator ambiental, e parece ser responsável pela distribuição geográfica da maioria das espécies. Diversas espécies com ampla distribuição, incluindo *D. robusta*, *D. subobscura*, *D. melanogaster* e *D. simulans* exibem variações geográficas com base genética para vários de seus traços (David *et al.*, 1997). Em diversos experimentos, replicatas de populações de moscas mantidas em diferentes temperaturas por longos períodos de tempo sofreram divergência genética no tamanho do corpo, com indivíduos tornando-se maiores em temperaturas mais baixas, como observado em *D. pseudoobscura* (Powell, 1974) e em *D. melanogaster* (Cavicchi *et al.*, 1978).

Clines latitudinais e altitudinais foram observados em diversos estudos sobre traços relacionados ao tamanho do corpo, tais como comprimento de asa e tórax, em *D. melanogaster* (James *et al.*, 1997; van'T Land *et al.*, 1999; Zwaan *et al.* 2000), *D.*

mediopunctata (Bitner-Mathé *et al.*, 1995), *D. subobscura* (Huey *et al.*, 2000), *D. aldrichi* e *D. buzzatii* (Loeschcke *et al.*, 2000), nos quais ficaram evidenciados componentes genéticos determinando estes traços. Isto pode ser demonstrado através da criação de várias populações geográficas em temperaturas constantes no laboratório ou sob condições de campo comparáveis. Estas alterações de tamanho são tomadas como evidência de seleção associada à temperatura (Partridge & Coyne, 1997; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a).

Não só o tamanho, mas a forma da asa também está adaptada à temperatura, e esta tem um efeito diferencial sobre os compartimentos anterior e posterior da asa, como foi demonstrado por Cavicchi *et al.* (1985), em *D. melanogaster*. Também foram observadas variações geográficas na morfologia da asa em populações naturais de *D. melanogaster* (Imasheva *et al.*, 1995; Pezzoli *et al.*, 1997) e *D. lummei* (Haas & Tolley, 1998). Estes estudos sugerem que a forma da asa é também um alvo para a seleção natural.

1.5. Morfometria da asa de *Drosophila*

Os diversos trabalhos que analisam o tamanho ou a forma da asa em diferentes espécies de *Drosophila*, em condições de campo e de laboratório, têm-se baseado quase exclusivamente em distâncias lineares entre pontos de referências no plano da asa, pela aplicação de métodos da morfometria tradicional (Monteiro & Reis, 1999; Roth & Mercer, 2000).

Para as estimativas de tamanho da asa, comumente, somente uma distância linear é tomada, enquanto a forma da asa tem sido estimada a partir de uma combinação de distâncias lineares tomadas entre pontos de referências ("landmarks"), como nos trabalhos de Coyne & Beecham (1987), Imasheva *et al.* (1995), Gibert *et al.* (1997), Pezzoli *et al.* (1997), Haas & Tooley (1998), Orengo & Prevosti (1998), van'T Land *et al.* (1999). Entretanto, esta metodologia apresenta algumas restrições: i) não permite uma interpretação geométrica simples; ii) mudanças na forma da asa podem ser confundidas com mudanças na disposição de

suas veias; iii) não se pode atribuir a variação observada na distância linear entre qualquer par de veias ao deslocamento de uma veia em relação a outra (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a).

Os trabalhos publicados por Klaczko & Bitner-Mathé (1990) e Klaczko (1995) demonstraram que as asas das espécies de *Drosophila* têm formas similares à figura geométrica de uma elipse, independente de seu tamanho, conforme ilustrado na figura 1, fato que os levou a proporem o método da elipse para descrever o tamanho e forma da asa em *Drosophila*. Este método evita as dificuldades dos métodos morfométricos tradicionais, tendo sido aplicado no estudos morfométricos de asas de *D. mediopunctata* (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a) e de *D. melanogaster* (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b).

O método da elipse é um método geométrico simples que permite uma fácil e precisa reconstituição do tamanho e forma da asa e descreve a disposição de suas veias em relação as bordas e ao plano da asa. Este método fornece medidas que são geometricamente independentes. A média geométrica dos dois raios **a** e **b** da elipse: **SI = (ab)^{1/2}** fornece uma medida de tamanho independente da forma da elipse, enquanto a razão **SH= b/a** fornece uma medida da forma da elipse independente do seu tamanho. A disposição das veias no plano da asa é dada pelas medidas dos ângulos: **θ_A, θ_B, θ_C, θ_D, θ_E e θ_J** que correspondem aos ângulos formados entre o eixo maior da elipse e o segmento que une os pontos de referência: A, B, C, D, E e J marcados nas extremidades das veias na borda da asa ou em sua junção até o centro da elipse, conforme indicado na figura 1. Estas distâncias são, em princípio, também independentes do tamanho e forma da elipse (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a,b). Outros detalhes deste método e de sua aplicação estão descritos na seção 2.3 do Material e Métodos.

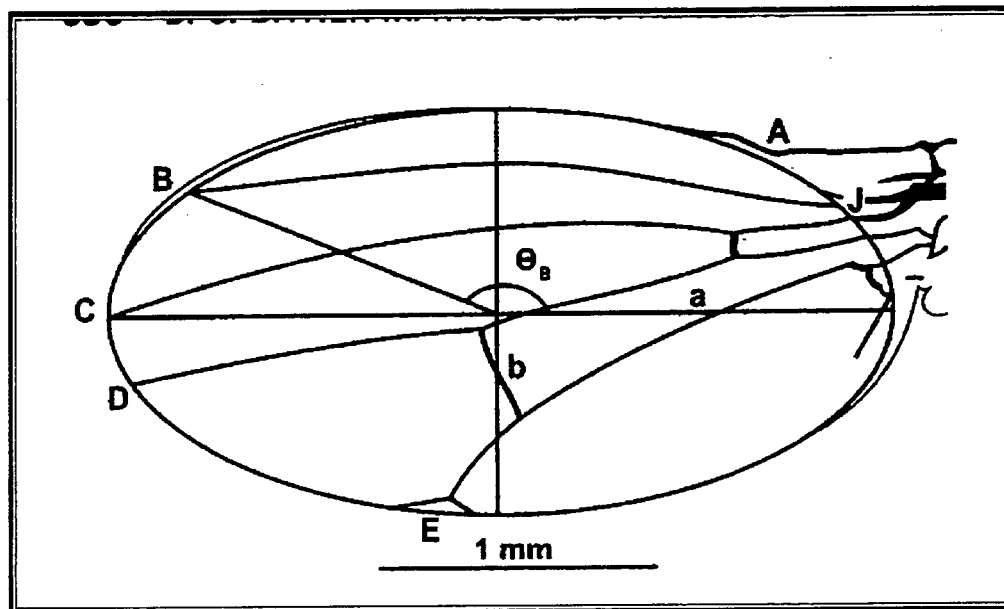


Figura 1. Asa de *Drosophila Melanogaster* e elipse ajustada (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b). Os dois eixos diretores são *a* e *b*. Os pontos A, B, C, D, E e J determinam a extremidade das veias no contorno da asa ou interseção de veias. Para um ponto determinado, por exemplo, **B**, o ângulo θ_B é formado entre a linha que o une até o centro da elipse e o eixo maior da mesma.

1.6. *Drosophila* como modelo experimental

Os trabalhos micro e macroevolutivos em *D. pseudoobscura* desenvolvidos por Dobzhansky e colaboradores estabeleceram muitas das questões fundamentais em Genética Evolutiva (Prout, 1995). Ao discorrer sobre este legado, Klaczko (1995) destaca que seu programa de pesquisa empregando *D. mediopunctata* como modelo experimental é inspirado naquele projeto, embora, seu interesse esteja concentrado em uma espécie neotropical e de um subgênero diferente, visando descobrir problemas novos, bem como, desenvolver novos métodos de análise.

No presente trabalho, os estudos envolveram as espécies *D. mediopunctata* e *D. melanogaster*, em razão das disponibilidades logísticas e dos objetivos adiante delineados. A espécie *Drosophila mediopunctata* Dobzhansky e Pavan 1943 pertence ao grupo *tripunctata* do

subgênero *Drosophila* e apresenta ampla distribuição, tendo sido encontrada em várias partes do Brasil e até em El Salvador (Val *et al.*, 1981). Como particularidades desta espécie em relação a outros drosofilídeos, Klaczko (1995) destaca o tempo de maturação longo, fecundidade baixa e longevidade alta. Outras características importantes desta espécie são a quantidade de inversões no cromossomo II, que possibilita estudos de adaptação e coadaptação (Bitner-Mathé *et al.*, 1995) e a presença de "sex ratio", que é a produção de progênes com excesso de fêmeas em relação aos machos (Carvalho *et al.*, 1989).

A espécie *D. melanogaster*, que constitui um paradigma de estudo dentro da Biologia, é cosmopolita, pertence ao grupo *melanogaster*, subgênero *Sophophora*, tem ampla gama de habitats e de requisitos nutricionais, além de apresentar um ciclo de ovo a adulto de 11 dias, em média, em condições de laboratório, sendo o mais curto período conhecido para qualquer espécie de drosofilídeo (Powell, 1997). Estas particularidades facilitam sua criação e manutenção em laboratório, permitindo obter-se várias gerações em um curto período de tempo, a baixo custo.

1.7. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral investigar a plasticidade fenotípica, a variabilidade genética, a interação genótipo-ambiente e as correlações fenotípicas em traços morfológicos da asa das espécies *D. melanogaster* e *D. mediopunctata*. Para tal abordagem foi aplicado o método da elipse (Klaczko & Bitner-Mathé, 1990; Klaczko, 1995) no material extraído de moscas fêmeas, considerando-se os seguintes parâmetros: SI (tamanho), SH (forma) e ângulos θ_A , θ_B , θ_C , θ_D , θ_E e θ_J , que representam os traços quantitativos sob análise.

No âmbito deste estudo, foram especificados os seguintes objetivos:

1) Para a espécie *D. melanogaster*:

- a) caracterizar a variação morfológica da asa em uma população coletada em ambiente urbano e em sua prole F1 e sua descendência, criadas sob condições controladas no laboratório, tendo como variável ambiental a temperatura;
- b) estimar a herdabilidade dos traços considerados, para a condição ambiental urbana e no laboratório, sob duas temperaturas;
- c) investigar a presença de interação-genótipo ambiente, nas condições do laboratório, usando a temperatura como variável ambiental;
- d) estimar as correlações fenotípicas entre os traços considerados, sob diferentes condições experimentais;

2) Para a espécie *D. mediopunctata*:

- a) caracterizar a variação morfológica da asa para as moscas coletadas na natureza (Mata de Santa Genebra) e em sua prole F1 criada no laboratório sob temperatura constante;
- b) estimar a herdabilidade dos traços analisados para as condições naturais;
- c) investigar a interação entre coleta e o coeficiente de regressão que estima a herdabilidade para cada traço;
- d) estimar as correlações fenotípicas entre os traços analisados, para as moscas coletadas na natureza e em sua prole F1 do laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos deste trabalho foram utilizadas moscas fêmeas das espécies *D. mediopunctata* e *D. melanogaster* coletadas em ambiente de mata e urbano, respectivamente, e de suas proles fêmeas criadas em condições controladas no laboratório, tendo sido empregado um desenho experimental para cada espécie, em face da disponibilidade logística e dos objetivos propostos.

2.1. Desenhos experimentais

2.1.1. Experimentos com *D. melanogaster*

O experimento com *D. melanogaster* foi executado em duas fase distintas e subseqüentes, aqui denominadas fase 1 e fase 2. Na fase 1 foram utilizadas as fêmeas inseminadas coletadas em ambiente urbano e sua prole F1 criada no laboratório. Na fase 2 foram utilizadas as moscas obtidas a partir de linhagens isofêmeas estabelecidas na fase 1. A execução do trabalho em duas fases visou a obtenção de dados de moscas criadas em diferentes condições ambientais e diferentes gerações, oriundas de uma mesma população.

As moscas desta espécie foram coletadas por Hermes F. Medeiros (doutorando em Ecologia desta Universidade), no mês de fevereiro de 1998, na zona urbana do município de Recife (08° 10' 52" S, 34° 54' 47" W) no Estado de Pernambuco. Para coleta foram usadas iscas de bananas fermentadas, colocadas dentro de garrafas deixadas nos locais de coleta, no início da manhã, até o momento que se atraísse um número razoável de moscas em seu interior. Então, a garrafa era fechada com uma tampa feita de algodão e gaze, para permitir uma boa aeração no seu interior, ficando as moscas aí guardadas até sua chegada no laboratório.

Este local de coleta foi escolhido em razão desta espécie ser cosmopolita e habitar preferencialmente ambientes perturbados pela atividade antrópica (Powell, 1997), aliado ao

interesse em estudar-se populações de *Drosophila* diferentes daquelas já abordadas em outros trabalhos sobre genética, ecologia e evolução desta espécie.

2.1.1.a. *D. melanogaster*. fase 1

Logo após a chegada no laboratório, as moscas coletadas em Recife foram separadas por espécie e sexo. Cada fêmea foi colocada para oviposição em um frasco de vidro de 40 ml, numerado, contendo cerca de 10 ml meio de cultura; fundando-se 93 linhagens isofêmeas. A composição do meio de cultura utilizado para esta espécie está descrita no **anexo 1**. Em intervalos regulares de 24 horas, durante 5 dias consecutivos, estas moscas selvagens eram transferidas para novos frascos identificados com o mesmo número do frasco anterior, obtendo-se 4 conjuntos de frascos nas mesmas condições, exceto a temperatura. Este período de 24 horas para oviposição das fêmeas evita os efeitos da densidade decorrente de eventual superpopulação de larvas (Thomas, 1993; Bosenko & Imasheva, 1998; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999c). Dois conjuntos de frascos foram mantidos em temperatura constante de 16,5°C e os outros dois a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas, de modo que as moscas da geração F1 tiveram todo o seu período de desenvolvimento de ovo a adulto, nestas condições.

As temperaturas experimentais utilizadas foram adequadas ao desenvolvimento das moscas desta espécie, visto que diferem em cerca de 4 graus da temperatura de 21°C, que é considerada a temperatura onde se verifica o ótimo fisiológico desta espécie, na qual a viabilidade é máxima (David *et al.*, 1983) e está dentro dos seus limites de tolerância térmica, entre 13°C e 29°C, onde sucessivas gerações podem ser obtidas. Machos criados abaixo ou acima destes limites tornam-se estéreis, o que inviabiliza a manutenção de culturas permanentes fora deste intervalo, embora o completo desenvolvimento de ovo a adulto possa ser obtido entre 12°C e 32°C para esta espécie (David *et al.*, 1997).

Terminado o período de oviposição no último lote de frascos, as fêmeas selvagens foram eterizadas e guardadas em álcool 70%, sob refrigeração, em placas utilizadas para microtitulação, o que permite a correta identificação da mosca de cada linhagem pelo número correspondente de sua posição (poço) na placa.

Em cada linhagem isofêmea que produziu adultos na geração F1, foram coletadas e guardadas duas fêmeas, obedecendo-se ao seguinte procedimento, para evitar-se viés de tamanho no momento da coleta: todas as moscas de cada frasco foram eterizadas e colocadas dispostas em uma única fileira sob lupa, coletando-se as duas primeiras fêmeas vistas no sentido da direita para esquerda do observador. Toda coleta foi executada pela mesma pessoa. As moscas da geração F1 foram guardadas sob as mesmas condições das fêmeas selvagens.

Concluída esta coleta, as moscas restantes da geração F1 de cada estirpe foram transferidas para frascos de 160 ml, contendo cerca de 40ml do meio de cultura, para permitir um aumento no número de indivíduos. Estes frascos foram mantidos em câmara fria, na temperatura de 18°C, sendo transferidos para novos frascos (repiques), em intervalos médios de 10 dias, até o início da fase 2.

A identificação específica das moscas foi confirmada examinando-se machos da geração F1 oriundos destas estirpes. Este procedimento assegura maior precisão na identificação porque as fêmeas de *D. melanogaster* apresentam morfologia muito semelhante a de *D. simulans*, enquanto os machos destas espécies são bem diferenciados pelo formato e tamanho do arco genital, conforme descrito na chave de identificação de espécies de *Drosophila* do Brasil (Freire-Maia & Pavan, 1949).

2.1.1. b. *D. melanogaster*. fase 2

Nesta fase 2, foram utilizadas moscas obtidas a partir das linhagens isofêmeas fundadas na primeira fase do experimento. Foram escolhidas aleatoriamente oito destas linhagens que

vinham sendo mantidas em câmara fria, a 18°C, durante 7 meses (de 30/03 a 03/11/98). Os estoques iniciais desta fase foram obtidos a partir de uma série de cruzamento montados em 2 etapas, que foi iniciado com 10 fêmeas virgens e 10 machos coletados em cada uma das 8 estirpes fundadas na fase 1. Estas moscas foram colocados em frascos de vidro de 160 ml, contendo cerca de 40 ml de meio de cultura e mantidos na temperatura constante de 24°C, com fotoperíodo de 12 horas., até o início dos cruzamentos indicados na tabela 1.

Os cruzamentos entre moscas destas 8 linhagens possibilitam recuperar nos estoques base desta segunda fase, mais de 95% da variabilidade genética da população original, evitando-se um possível efeito de deriva genética devido ao gargalo ou efeito fundador quando do estabelecimento das linhagens isofêmeas, conforme estimativas discutidas por Lande (1980).

As taxas esperadas de perda da heterozigosidade genética, bem como da redução variância genética aditiva em traços métricos são de $1/(2N_e)$ por geração em uma população diplóide de tamanho efetivo $N_e = 4 N_m N_f / (N_m + N_f)$, onde N_m e N_f são os números de machos e de fêmeas adultos. Portanto, a variabilidade genética recuperada pode ser representada por $100 \times [1 - (2N_e)^{-1}]$ (Lande, 1980). A aplicabilidade destas fórmulas pode ser exemplificada pelo trabalho de Voss *et al.* (1990), que estudou a variação morfológica de crânios de roedores do gênero *Zygodontomys*, em amostras de populações capturadas na natureza e sua geração F1 criada em laboratório.

Os esquemas dos cruzamentos executados estão indicados nas tabelas 1 e 2, tendo sido elaborado para possibilitar que o material genético de cada uma das 8 linhagens pudesse recombinar-se com o material das demais, no mínimo uma vez, nos diferentes cruzamentos dentro da geração F2, conforme indicado na tabela 3.

Tabela 1. Esquema da primeira etapa dos cruzamentos: entre 8 linhagens isofêmeas oriundas da fase 1, no experimento com *D. melanogaster* - fase 2

Linhagens parentais:		Geração F1:
Fêmea virgem	macho	
1	4	A
2	5	B
3	6	C
4	7	D
5	8	E
6	1	F
7	2	G
8	3	H

Tabela 2. Esquema da segunda etapa dos cruzamentos: entre os estoques obtidos na geração F1 da tabela 1, acima, no experimento com *D. melanogaster* - fase 2.

Linhagens parentais:		Geração F2
Fêmea virgem	macho	
A	B	Z
B	C	W
C	D	Y
D	E	K
E	F	P
F	G	R
G	H	T
H	A	M

Tabela 3.. Resultados da possibilidade de recombinação das 8 linhagens isofêmeas iniciais na geração F2: Z, W, Y, K, P, R, M, T, no experimento com *D. melanogaster*- fase 2

Linhagem isofêmea inicial	As linhagens iniciais, números entre parênteses, que se combinam com a linhagem da primeira coluna nos cruzamentos da geração F2 (letras)			
1	Z (4, 2, 5)	P (5, 8, 6)	R (6, 7, 2)	M (8, 3, 4)
2	Z (1, 4, 5)	W (5, 3, 6)	R (6, 1, 7)	T (7, 8, 3)
3	W (2, 5, 6)	Y (6, 4, 7)	T (7, 2, 8)	M (8, 1, 4)
4	Z (1, 2, 5)	Y (3, 6, 7)	K (7, 5, 8)	M (8, 3, 1)
5	Z (1, 4, 2)	W (2, 3, 6)	K (4, 7, 8)	P (8, 6, 1)
6	W (2, 5, 3)	Y (3, 4, 7)	P (5, 8, 1)	R (1, 7, 2)
7	Y (3, 6, 4)	K (4, 5, 8)	R (6, 1, 2)	T (2, 8, 3)
8	K (4, 7, 5)	P (5, 6, 1)	T (7, 2, 3)	M (3, 1, 4)

Nos estoques que representam a geração F2 desta série de cruzamentos foram coletados 15 fêmeas virgens e 15 machos, os quais foram combinados aleatoriamente, constituindo 120 casais parentais desta fase. Para determinar este número de casais foi levado em conta a logística disponível, bem como um número de famílias (mãe e 1 filha) que minimizasse o erro padrão do coeficiente de regressão da prole sobre suas mães, nos cálculos de estimativa de herdabilidade (h^2) (Falconer & Mackay, 1996). Neste caso, o erro padrão de h^2 é igual a $2/(N)^{1/2}$, onde **N** é o número de observações pareadas (famílias). Procedimento de cálculo semelhante é indicado por Lynch & Walsh (1998).

Cada casal parental foi colocado em um frasco de vidro de 40 ml, contendo 10 ml de meio de cultura, numerados de 1 a 120. Em intervalos regulares de 24 horas o casal era transferido para um novo frasco, formando-se 2 conjuntos para cada temperatura experimental: 16,5°C e 24°C, onde foram mantidos, em fotoperíodo de 12 horas, até a obtenção da geração F1 desta

fase 2. Para coleta, guarda e conservação das moscas parentais e sua prole F1, foram adotados os mesmos procedimentos da fase 1 deste experimento.

2.1.2. Experimento com *D. mediopunctata*

As moscas da espécie *D. mediopunctata* utilizadas neste experimento são oriundas de duas coletas feitas nos períodos de 9 a 11/08/2000 e 26 a 28/09/2000, pelos alunos de Pós-Graduação do Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de Drosófilas da UNICAMP, na Reserva Municipal Mata de Santa Genebra, localizada no Distrito de Barão Geraldo, município de Campinas (SP) (22° 49' 45" S, 47° 06' 33" W). A Mata de Sta. Genebra está em uma altitude de 670 m e possui relevo levemente ondulado, com uma área aproximada de 250 ha de vegetação caracterizada como floresta latifoliada ou como floresta estacional mesófila semidecídua (Morellato, 1991).

Para a coleta foram utilizadas iscas de bananas fermentadas colocadas dentro de armadilhas distribuídas ao longo de uma trilha no interior da mata. A estrutura, funcionamento e modo de utilização destas armadilhas desenvolvidas para coleta de drosófilas são descritos e discutidos nos trabalhos de Medeiros & Klaczko (2000) e Medeiros (2000). As moscas coletadas eram transportadas ao laboratório, onde eram separadas por sexo e feita sua identificação específica utilizando-se a chave de identificação de Freire-Maia & Pavan (1949). Esta identificação inicial da espécie foi confirmada pela análise dos cromossomos politênicos das larvas da geração F1, feita por Galia Ananina, aluna de Doutorado deste Laboratório.

Cada fêmea de *D. mediopunctata* era separada para oviposição, sendo colocada num frasco de 40 ml, numerado, contendo 10 ml de meio de cultura apropriado para esta espécie, cuja composição está descrita no **anexo 1**. Decorrido um intervalo de 72 horas, cada mosca era transferida para um novo frasco, para evitar-se superpopulação de larvas, e de modo a obter-se

duas réplicas do experimento. Os frascos foram mantidos em temperatura constante de 16,5 °C, em fotoperíodo de 12 horas, até a eclosão dos adultos da geração F1, conforme procedimentos experimentais aplicados a esta espécie por Bitner-Mathé & Klaczko (1999a,c).

Findo o período de oviposição no terceiro conjunto de frascos, as moscas selvagens foram sacrificadas e guardadas em álcool 70%, em placas de microtitulação. Após a eclosão da geração F1, foram coletadas 2 moscas fêmeas de cada uma das linhagens, usando-se o mesmo procedimento aplicado no experimento com *D. melanogaster*, tendo sido guardadas sob as mesmas condições que sua geração parental.

2.2. Montagem e digitalização do material

Os procedimentos adotados nesta etapa foram os mesmos. para todo o material das duas espécies analisadas Na montagem da asa procedeu-se do seguinte modo: em uma pequena gota de água colocada sobre uma lâmina, sob microscópio estereoscópio, a asa direita da mosca era seccionada na região de junção junto ao tórax, e então coberta com uma lamínula que era fixada na lâmina com esmalte, desde que o material estivesse sem dobras ou ondulações. Cada lâmina era identificada com a numeração da mosca da qual foi extraída a asa.

As imagens das asas foram digitalizadas diretamente das lâminas de microscopia, com o uso de uma câmara digital de vídeo marca LG-Honeywell, modelo GC-305N-G, acoplada a uma lupa marca Zeiss, modelo Stemi SV11, com ampliação zoom de 1,6 e janela de imagem na proporção 662 x 527. A câmara de vídeo era controlada pelo programa de vídeo TVTap versão 2.03.007, da Cyrrus Logic, Inc. que gerava um arquivo de imagem para cada asa. Em cada etapa deste procedimento, foi feita a gravação de uma escala micrométrica de referência na mesma ampliação da imagem das asas digitalizadas.

2.3. Análise morfométrica da asa pelo método da elipse

Conforme descrito nos trabalhos de Klaczko (1995) e Bitner-Mathé & Klaczko (1999a,b), o método da elipse aplicado ao estudo morfométrico de asa de *Drosophila* tem por base a equação geral da elipse disposta em um plano definido por um sistema de coordenadas cartesianas: $Ax^2 + By^2 + Cxy + Dx + Ey + F=0$. Executando-se a rotação e a translação dos eixos das coordenadas, de modo que a origem das ordenadas e abcissas coincida com o centro da elipse, o eixo maior coincida com o eixo das abcissas e o eixo menor com o das ordenadas, obtém-se a equação reduzida da elipse: $x^2/a^2 + y^2/b^2 = 1$, onde **a** é o eixo maior da elipse e **b** o eixo menor. A média geométrica dos raios **a** e **b** da elipse: $SI = (a/b)^{1/2}$ fornece uma medida de tamanho independente da forma da elipse, que é igual ao raio do círculo com a mesma área da elipse, enquanto a razão: $SH = b/a$ fornece uma medida da forma da elipse independente do seu tamanho. Este método também fornece posição de qualquer ponto sobre a elipse em relação ao seu eixo maior, pela medida do ângulo θ . Todos os parâmetros utilizados neste método são calculados pelo programa **ASALK**, escrito em **BASIC** por L. B. Klaczko.

Para aplicação do método da elipse, a imagem digitalizada de cada asa foi marcada com 36 pontos, usando-se o programa tpsDig versão 1.18 (Rohlf, 1998) que fornece as coordenadas cartesianas de cada um destes pontos. Estes foram distribuídos da seguinte forma: 30 pontos ao longo do contorno da borda asa, mais 06 pontos denominados: A, B, C, D, E e J, marcados nas extremidades das veias, na borda da asa ou nas interseções entre duas veias, conforme indicado nas **figuras 2a** e **2b**. As coordenadas cartesianas de cada um dos 30 pontos marcados no contorno de cada asa foram ajustados a uma elipse, pelo método dos mínimos quadrados, pelo programa ASALK, a partir dos valores observados de **x** e de **y**, assim o centro e a orientação da elipse foram encontrados.

As coordenadas cartesianas dos seis pontos de referência: A, B, C, D, E e J também foram usadas para determinar a posição destes pontos na elipse, pela medida dos respectivos ângulos θ , formados entre a linha que une cada um deles até o centro da elipse e o eixo maior desta, conforme figura 1, da Introdução. Portanto, as posições de cada um destes seis pontos são determinadas pelos ângulos: θ_A , θ_B , θ_C , θ_D , θ_E e θ_J , em relação ao eixo **a** da elipse (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a,b).

As figuras das elipses representativas dos resultados de cada experimento foram construídas usando-se o programa Microsoft **Excel** 97 SR-2, a partir dos parâmetros fornecidos pelos programas **Gravaeli** e **Polcart**, escritos em Basic, por Louis Bernard Klaczko. O programa Gravaeli calcula os parâmetros da elipse a partir das médias dos valores dos eixos **a** e **b**, enquanto o programa Polcart calcula as coordenadas cartesianas dos pontos A a J, a partir das suas respectivas coordenadas polares médias.

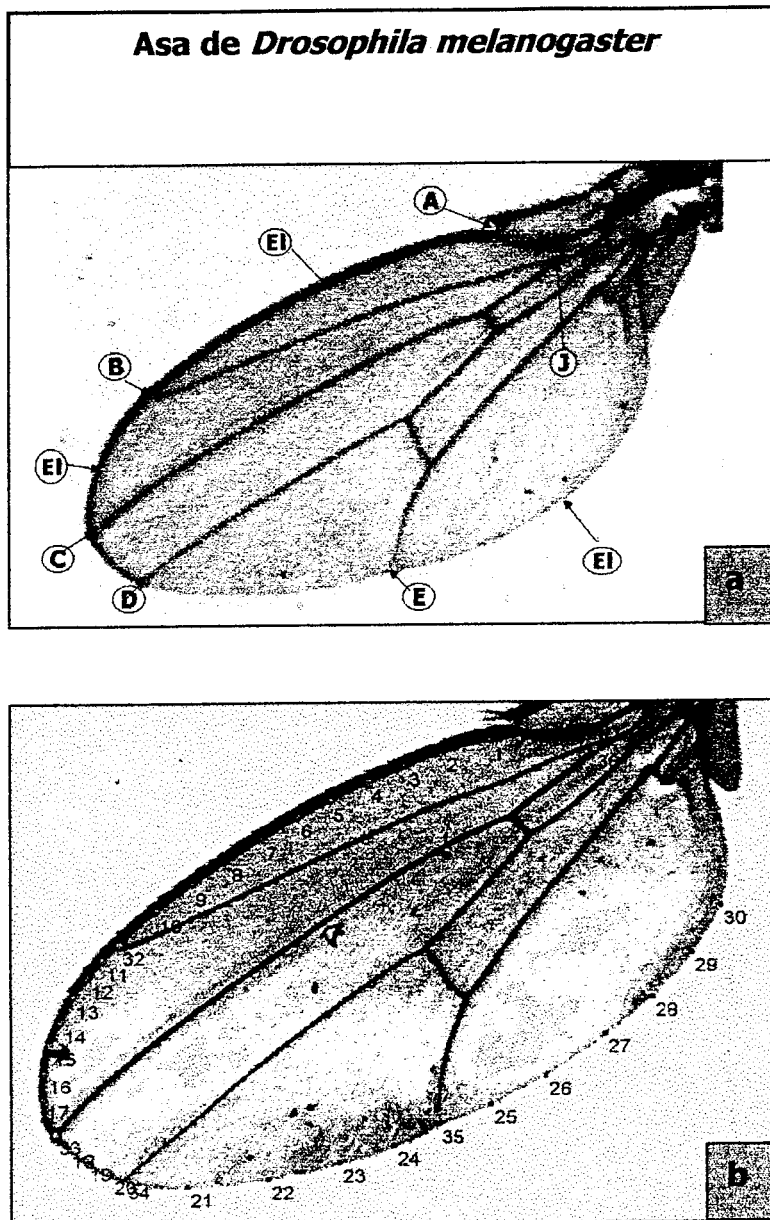


Figura 2. Disposição dos 36 pontos tomados nas asas de *D. mediopunctata* e *D. melanogaster*, sendo 06 pontos indicados por **A, B, C, D, E e J**, na **figura 2.a**, relativos aos ângulos θ e 30 pontos numerados (01 a 30) indicados na **figura 2.b**, dispostos nas bordas das asas, relativos à figura da elipse (**EI**).

2.4. Estimativas das herdabilidades e das correlações fenotípicas

As estimativas de herdabilidade (h^2) dos traços: SI, SH, θ_A , θ_B , θ_C , θ_D , θ_E e θ_J , nas condições de campo e laboratório, para as duas espécies analisadas, foram calculadas usando-se o método de regressão dos dados da prole (1 filha) sobre suas mães, para cada condição experimental. O coeficiente desta regressão (**b**) corresponde a **1/2** de **h^2** , ou seja, **$h^2 = 2b$** (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998).

Este método tem sido amplamente utilizado nos estudos sobre herdabilidade, como demonstra revisão sobre o assunto feita por Weigensberg & Roff (1996). Em trabalhos com *Drosophila*, este método é comumente utilizado, tendo sido aplicado, por exemplo, nos trabalhos de Coyne & Beecham (1987) com *D. melanogaster*, Prout & Barker (1989), com *D. buzzatii*, Orengo & Prevosti (1999), com *D. subobscura*; Bitner-Mathé & Klaczko (1999a), com *D. mediopunctata*. Todavia, estes autores chamam a atenção para o fato de que o método da regressão somente fornece uma estimativa aproximada da herdabilidade na natureza, quando determinadas condições são satisfeitas, tais como: i) a variância genética aditiva do caráter é aproximadamente igual na natureza e no laboratório; ii) existe pouca interação genótipo-ambiente entre campo e laboratório; iii) efeito materno e a variância de dominância são de pouca importância.

As estimativas das correlações fenotípicas (**r_p**) entre os pares de traços ou variáveis analisados: SI, SH, θ_A , θ_B , θ_C , θ_D , θ_E e θ_J foram calculadas conforme método apresentado por Falconer & Mackay (1996), onde uma correlação, qualquer que seja sua natureza, é a razão entre a covariância entre duas variáveis e o produto de seus respectivos desvios-padrão: **$r_p = \text{cov}_p / \sigma_{px} \sigma_{py}$** , cujos detalhes de cálculo e suas aplicações são discutidos por Zar (1996) e Lynch & Walsh (1998). No experimento com *D. melanogaster*, como havia seis valores de

correlação entre os traços, um para cada condição experimental, também foi calculada a média e erro padrão destas seis correlações. Estas médias foram submetidas ao **teste t**, para testar a hipótese nula de ausência de correlação quando a média das seis correlações não é significativamente diferente de zero ($\mu = 0$), com $\alpha = 0,01$ (Zar, 1996). Os cálculos das estimativas de h^2 e r_p acima foram executados pelo programa SYSTAT (Wilkinson, 1997).

2.5. Análise da interação genótipo-ambiente

A existência de interação genótipo-ambiente para cada traço foi investigada aplicando-se o método estatístico da análise de covariância (ANCOVA) com interações aos dados de cada fase experimental, e também para os dados agrupados das duas fases, no experimento com *D. melanogaster*, enquanto que os dados obtidos para *D. mediopunctata* foram analisados aplicando-se uma ANCOVA com interação com a coleta. Este tipo de análise possibilita decompor a variância total do fenótipo nas variâncias determinadas pelo genótipo (fêmea parental), pelo ambiente (temperatura) ou coleta e pelas interações entre fatores (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999c; Sokal & Rohlf, 1995).

Nos experimentos com *D. melanogaster*, como procedimento complementar na investigação da possível existência de interação genótipo-ambiente, foram construídos os gráficos da norma de reação de cada traço, para cada fase do experimento, bem como, para os dados agrupados das duas fases, fazendo-se a regressão dos valores das fêmeas F1 sobre suas fêmeas parentais, nas duas temperaturas do experimento.

Para as análises estatísticas dos dados foi utilizado o programa SYSTAT versão 8.0 (Wilkinson, 1997), enquanto que os gráficos da norma de reação para *D. melanogaster* foram construídos usando-se o programa Microsoft Excel 97 SR-2.

3. RESULTADOS

3.1. Experimentos com *D. melanogaster*

3.1.1. Estatísticas descritivas

O tamanho de amostra das famílias completas usado na análise estatística, ou seja, mãe e 1 filha em cada temperatura, sofreu sensível redução em relação ao do início, nas duas fases deste experimento. A fase 1 foi iniciada com 93 linhagens isofêmeas, sendo que 74 produziram progênie a 16.5°C (redução de 20,5%), enquanto que a 24°C este número foi de 86 (redução de 7,5%), obtendo-se ao final 63 famílias das linhagens que produziram prole simultaneamente nas duas temperaturas. Na fase 2, dos 120 casais iniciais, 90 produziram prole a 16,5°C (redução de 25%) e 101 casais a 24°C produziram prole (redução de 16%), tendo-se o número final de 73 famílias para análise.

Os dados estatísticos descritivos calculados para os traços analisados: tamanho da asa (SI), forma da asa (SH) e as medidas dos ângulos θ_A , θ_B , θ_C , θ_D , θ_E e θ_J , são apresentados nas tabelas 4 e 5, para as fases 1 e 2, respectivamente, bem como o resultado das ANOVAS e teste de Tukey aplicados às médias de cada traço.

Tabela 04.: Estatísticas descritivas dos parâmetros da asa do experimento com *D. melanogaster* fase 1. Fêmeas parentais da cidade e suas filhas F1 do laboratório em 2 temperaturas. Medidas de SI em mm e dos ângulos θ em radianos. N=189.

	Fêmea parental		Fêmea F1 a 16,5°C		Fêmea F1 a 24°C		ANOVAS g.l.=anim.=2;erro=186	
Traço	Média	desv pad.	Média	desv pad.	Média	desv pad.	F	P
SI	0,6133 ^a	0,0328	0,7638 ^b	0,0229	0,70700 ^c	0,0194	551,0804	<0,001
SH	0,4691 ^a	0,0143	0,4510 ^b	0,0138	0,4569 ^c	0,0095	33,1745	<0,001
θ_A	0,6579 ^a	0,0302	0,6697 ^b	0,0257	0,6784 ^b	0,0225	9,6378	<0,001
θ_B	2,5829 ^a	0,0360	2,6629 ^b	0,0256	2,6820 ^c	0,0192	224,5894	<0,001
θ_C	3,1573 ^a	0,0138	3,1498 ^b	0,0131	3,1564 ^a	0,0098	6,8986	0,002
θ_D	3,3461 ^a	0,0163	3,3525 ^b	0,0149	3,3457 ^a	0,0123	4,2576	0,016
θ_E	4,4175 ^a	0,0493	4,3929 ^b	0,0552	4,3675 ^c	0,0459	15,5413	<0,001
θ_J	0,3627 ^a	0,0235	0,3678 ^a	0,0188	0,3801 ^b	0,0165	12,7416	<0,001

Teste Tukey: médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%

Tabela 05.:Estatísticas descritivas dos parâmetros da asa do experimento com *D. melanogaster* fase 2. Fêmea parental e filhas do laboratório em 2 temperaturas. Medidas de SI mm e dos ângulos θ em rad. N=219.

	Fêmea parental a 24°C		Fêmea F1 a 16,5°C		Fêmea F1 a 24°C		ANOVAS g.l.=mod.=2;erro=216	
Traço	média	desv pad.	média	desv pad.	média	desv pad.	F	P
SI	0,7088 ^a	0,0209	0,7919 ^b	0,0237	0,7119 ^a	0,0193	353,5337	<0,001
SH	0,459 ^a	0,011	0,443 ^b	0,012	0,448 ^c	0,011	38,4652	<0,001
θ_A	0,677 ^{a,b}	0,0192	0,685 ^a	0,034	0,669 ^b	0,024	7,1665	<0,001
θ_B	2,682 ^a	0,023	2,679 ^a	0,027	2,694 ^b	0,023	7,6444	<0,001
θ_C	3,158 ^a	0,010	3,145 ^b	0,011	3,155 ^a	0,010	12,6563	<0,001
θ_D	3,347 ^a	0,012	3,348 ^a	0,014	3,342 ^b	0,012	5,5476	0,004
θ_E	4,391 ^a	0,0544	4,354 ^b	0,059	4,360 ^b	0,051	9,3226	<0,001
θ_J	0,379 ^a	0,016	0,380 ^a	0,023	0,374 ^a	0,017	2,9212	0,056

Teste Tukey: médias com o mesma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%.

Nas tabelas **4 e 5** nota-se que o traço SI, apresenta valores médios significativamente diferentes para cada condição experimental, com médias maiores na temperatura mais baixa, como era previsto. A média de SI para as moscas do ambiente urbano é a menor de todas, nas duas fases do experimento. Comparando-se as médias de SI das filhas de mesma temperatura nas duas fases nota-se que houve um aumento no valor médio da primeira para a segunda fase, o que pode ser atribuído ao efeito de diferenciação genética sofrido pelos estoques durante o período em que ficaram no laboratório até o início da segunda fase, conforme considerações que serão apresentadas na Discussão.

As médias de SH também mostram diferenças dentro de cada fase. Entre as duas fases do experimento, nota-se que ocorreu uma redução da fase 1 para a fase 2, quando se comparam os valores das mães entre fases, bem como aqueles de suas filhas do laboratório, em cada temperatura.. As medidas dos ângulos θ não exibem padrão claro de variação em relação à temperatura ou fase experimental.

3.1.2. Estimativas das herdabilidades

As estimativas de herdabilidade para os traços da asa, nas duas fase do experimento, são mostradas nas tabelas 6 e 7. Os cálculos foram feitos para cada temperatura e com os dados agrupados das duas temperaturas.

As tabelas 6 e 7 mostram que houve um grande variação nas estimativas de h^2 entre as duas fases do experimento para cada traço analisado. Na fase 1, somente θ_D apresentou h^2 significativa, em cada temperatura, enquanto os ângulos θ_C , θ_E e θ_A exibem valores significativos para os dados agrupados. Na fase 2, temos SI, θ_B , θ_D e θ_E com valores significativos de h^2 em cada temperatura, embora não os tenham exibido na fase 1, o que pode indicar a importância do componente ambiental para a variabilidade destes traços. O ângulo θ_A , não exibiu h^2 significativo para nenhuma das condições experimentais, indicando que este traço pode apresentar pouca variabilidade genética, enquanto o traço θ_J exibe h^2 significativo

somente na temperatura de 24°C. De modo semelhante, o traço **SH** apresentou valor altamente significativo apenas na fase 2, a 24°C, o que é um indicador da presença de interação genótipo-ambiente.

De modo geral, estes resultados mostram que a mudança das condições ambientais das mães da fase 1 para a fase 2 acarretou sensível mudança nos valores de h^2 , indicando que a variância ambiental é um componente importante da variabilidade de determinados traços da asa.

Tabela 06.. Herdabilidade estimada para traços da asa de *D. melanogaster* fase 1, expressa em porcentagem. Fêmea parental (cidade) x fêmea F1 do laboratório. N=63

traço	Estimativas por temperatura				Estimativa para a média das filhas F1.	
	16,5°C		24°C			
	h ² (%)	Erro padrão	h ² (%)	Erro padrão	h ² (%)	Erro padrão
SI	17,6 ^{ns}	17,8	14,0 ^{ns}	15,1	15,8 ^{ns}	12,4
SH	38,9 ^{ns}	24,3	15,0 ^{ns}	16,9	26,9 ^{ns}	17,3
θ _A	17,8 ^{ns}	21,6	29,6 ^{ns}	18,7	23,7 ^{ns}	15,4
θ _B	23,6 ^{ns}	17,9	-04,5 ^{ns}	13,6	09,6 ^{ns}	13,1
θ _C	40,3 ^{ns}	23,7	28,2 ^{ns}	17,8	34,2*	15,9
θ _D	81,9***	20,8	39,1*	18,7	60,5***	14,7
θ _E	78,8**	26,8	42,8 ^{ns}	23,2	60,8**	18,8
θ _J	34,1 ^{ns}	19,9	38,1*	17,2	36,1*	13,9

ns: não significativo; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Tabela 07. Herdabilidade estimada no laboratório para traços da asa de *D. melanogaster* fase 2, expressa em porcentagem. Fêmea parental x fêmea F1. N=73.

traço	Estimativas por temperatura				Estimativas para a média das filhas F1	
	16,5°C		24°C			
	h ² (%)	Erro padrão	h ² (%)	Erro padrão	h ² (%)	Erro padrão
SI	70,3**	25,6	70,9***	20,3	70,6***	16,8
SH	13,5 ^{ns}	24,7	95,5***	19,4	54,5***	15,8
θ _A	8,7 ^{ns}	41,8	15,7 ^{ns}	29,6	12,2 ^{ns}	27,8
θ _B	58,8*	26,8	91,3***	20,5	75,1***	18,8
θ _C	12,6 ^{ns}	24,9	27,8 ^{ns}	22,3	20,2 ^{ns}	19,2
θ _D	52,4*	26,0	75,4***	21,4	63,9***	17,2
θ _E	66,1**	24,6	60,7**	21,2	63,4***	18,4
θ _J	29,3 ^{ns}	35,4	53,5*	25,4	41,4 ^{ns}	23,8

ns: não significativo; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

3.1.3. Análise da interação genótipo-ambiente

Os resultados das análises de covariância aplicados aos dados em cada fase e agrupados, são mostrados nas tabelas **08**, **09** e **10**, respectivamente, seguidas pelas figuras numeradas de 03 a 10 que mostram as regressões lineares dos valores das fêmeas F1 sobre as fêmeas parentais, para os dados de cada fase experimental, representando a norma de reação destes traços.

As tabelas 08 e 09 mostram que somente SH exibe interação na fase 2, o que se mantém também quando os dados das duas fase são agrupados, conforme tabela 10. Nesta tabela também nota-se que SI e θ_B mostram diferença altamente significativa entre fases e interação entre mães e fase. Observando-se os gráficos da norma de reação, somente SH, na fase 2, mostra nitidamente retas não paralelas, sinalizando a existência de interação.

Tabela 08.: ANCOVAS 2 vias, com interação com temperatura para os traços da asa no experimento com *D. melanogaster* Fase 1. Graus de liberdade iguais para todos os traços, sendo: fêmea parental (mãe) =1; Temp. = 1; Temp.*mãe = 1; erro = 122.

Traços analisados:																
Fonte	SI		SH		θ_A		θ_B		θ_C		θ_D		θ_E		θ_J	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Temp.	0,4097	0,5233	0,7926	0,3750	0,1014	0,7507	1,7256	0,1914	0,1776	0,6742	2,2943	0,1324	0,9632	0,3283	0,0101	0,9201
Mãe	1,8376	0,1777	3,3063	0,0715	2,7520	0,0997	0,7208	0,3975	5,3245	0,0227	18,7041	0,0000	11,7713	0,0008	7,4892	0,0071
Temp.x mãe	0,0236	0,8782	0,6484	0,4223	0,1688	0,6818	1,5579	0,2143	0,1659	0,6844	2,3382	0,1288	1,0284	0,3126	0,0239	0,8773

Tabela 09.: ANCOVAS 2 vias, com interação com temperatura para os traços da asa Experimento com *D. melanogaster* Fase 2. Graus de liberdade iguais para todos os traços, sendo: fêmea parental (mãe) =1; Temp. =1; Temp.* mãe = 1; erro = 142. N=145.

Traços analisados:																
Fonte	SI		SH		θ_A		θ_B		θ_C		θ_D		θ_E		θ_J	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Temp.	0,4994	0,4809	6,4165	0,0124	0,0540	0,8165	0,8659	0,3536	0,1969	0,6578	0,4825	0,4884	0,0311	0,8603	0,4116	0,5221
Mãe	18,6522	0,0000	12,0455	0,0007	0,2270	0,6344	19,7318	0,0000	1,4537	0,2299	14,4039	0,0002	15,2011	0,0001	3,6118	0,0594
Temp.x mãe	0,0003	0,9863	6,8114	0,0100	0,0188	0,8909	0,9289	0,3367	0,2051	0,6513	0,4667	0,4956	0,0280	0,8672	0,3089	0,5792

Tabela 10.: ANCOVAS 3 vias com interação com temperatura e fase para os traços da asa. Experimento com *D. melanogaster*. Dados das duas fases analisados conjuntamente. Graus de liberdade iguais para todos os traços, sendo: fêmea parental (mãe)=1; Temp.=1; Temp.* mãe = 1; mãe * fase = 1; fase % temp. % fase = 1; fase % temp. % mãe % temp. % fase = 1; erro = 264. N=272.

Traços analisados																
Fonte	SI		SH		θ _A		θ _B		θ _C		θ _D		θ _E		θ _J	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Mãe	18,331 8	0,0000	14,133 9	0,0002	1,5857	0,2090	17,5980	0,0000	5,8299	0,0164	32,205 5	0,0000	26,0956	0,0000	9,6356	0,0021
Temp.	0,8659	0,3529	1,4442	0,2305	0,1347	0,7139	0,0055	0,9411	0,0027	0,9582	0,1873	0,6655	0,6968	0,4046	0,2664	0,6062
Fase	7,2902	0,0074	1,9779	0,1608	0,1726	0,6782	10,5616	0,0013	0,3845	0,5357	0,0279	0,8673	0,0177	0,8942	0,0438	0,8342
Mãe % Temp.	0,0056	0,9405	1,7991	0,1809	0,1084	0,7422	0,0122	0,9122	0,0047	0,9455	0,2035	0,6523	0,7245	0,3955	0,3209	0,5715
Mãe % Fase	7,3814	0,0070	1,6192	0,2043	0,1633	0,6865	10,5417	0,0013	0,3878	0,5339	0,0240	0,8769	0,0112	0,9158	0,0444	0,8333
Fase % Temp.	0,0694	0,7925	5,9304	0,0155	0,0029	0,9569	2,2620	0,1338	0,3686	0,5443	2,2500	0,1348	0,3598	0,5491	0,3836	0,5362
Mãe % Temp. % Fase	0,0105	0,9184	5,9665	0,0152	0,0068	0,9341	2,2631	0,1337	0,3655	0,5459	2,2518	0,1346	0,3934	0,5310	0,1624	0,6873

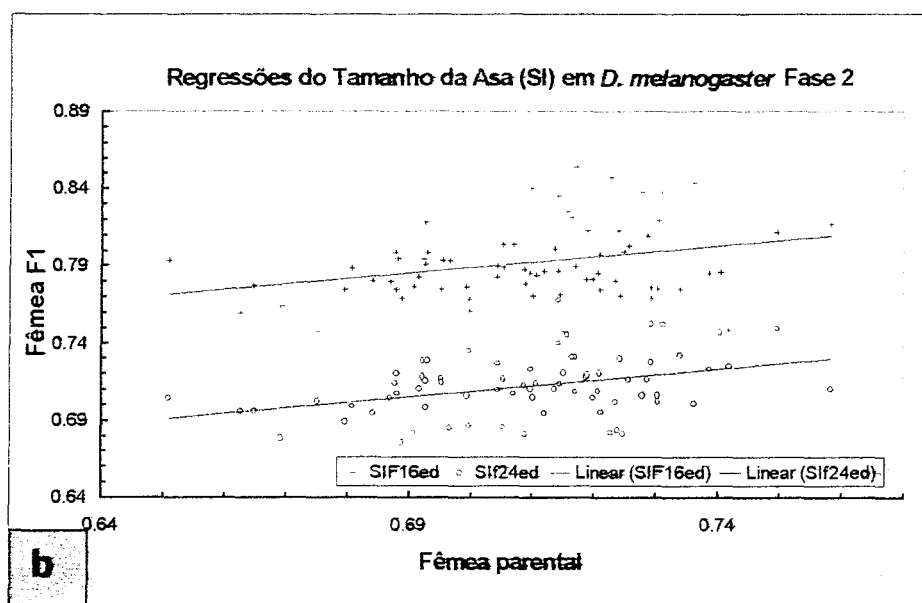
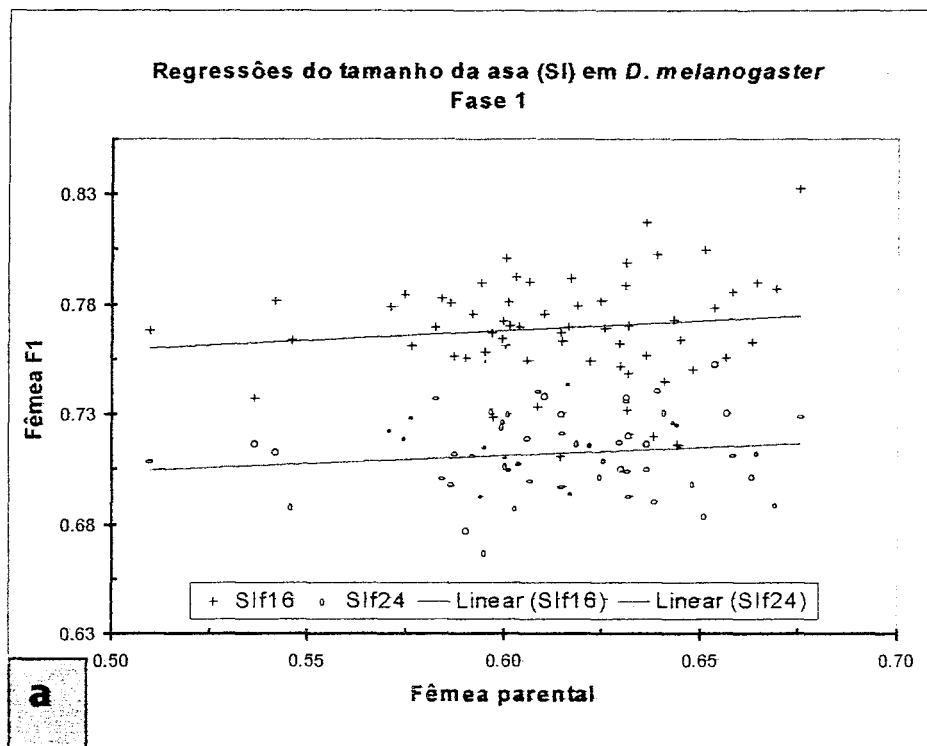


Fig.03. Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(**a**) e Fase 2 (**b**). Regressões do traço tamanho da asa (SI) das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

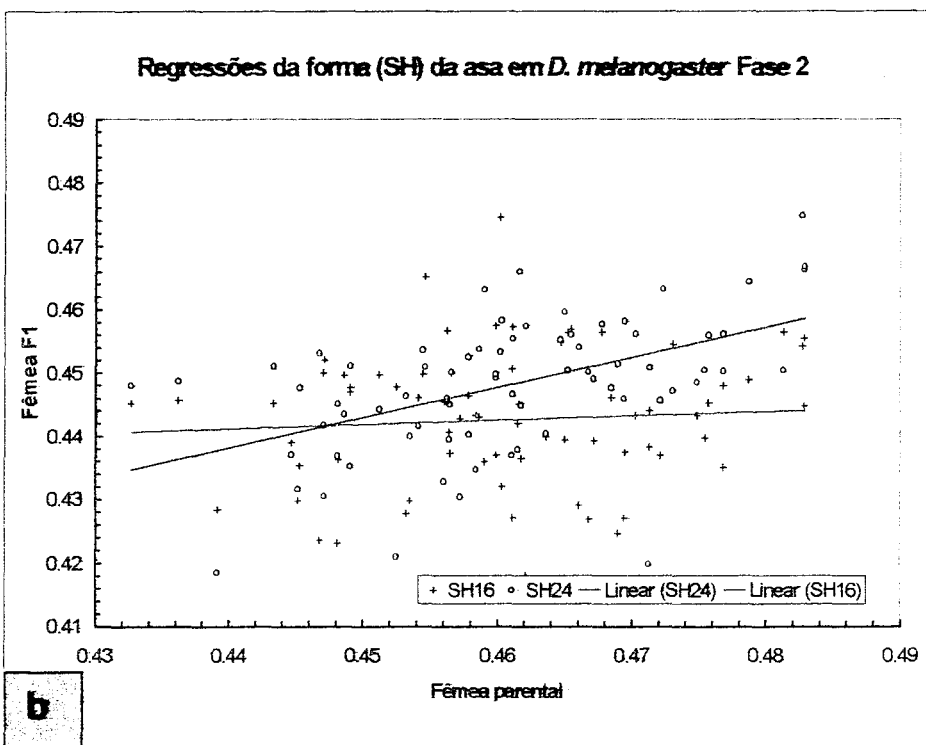
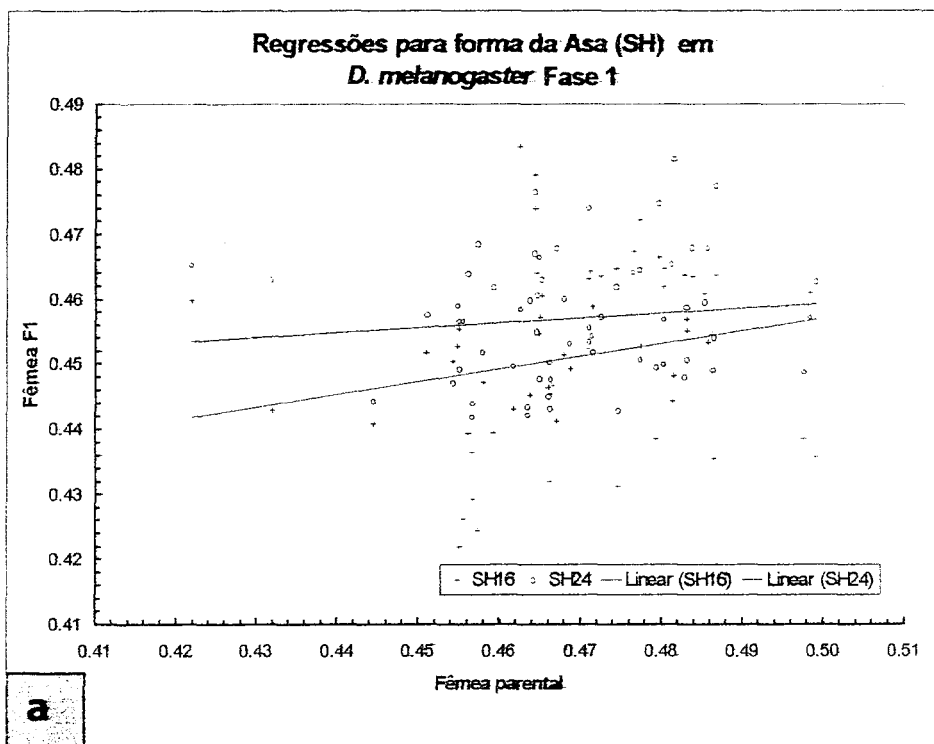


Fig.04. Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(a) e Fase 2 (b). Regressões do traço forma da asa (SH) das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

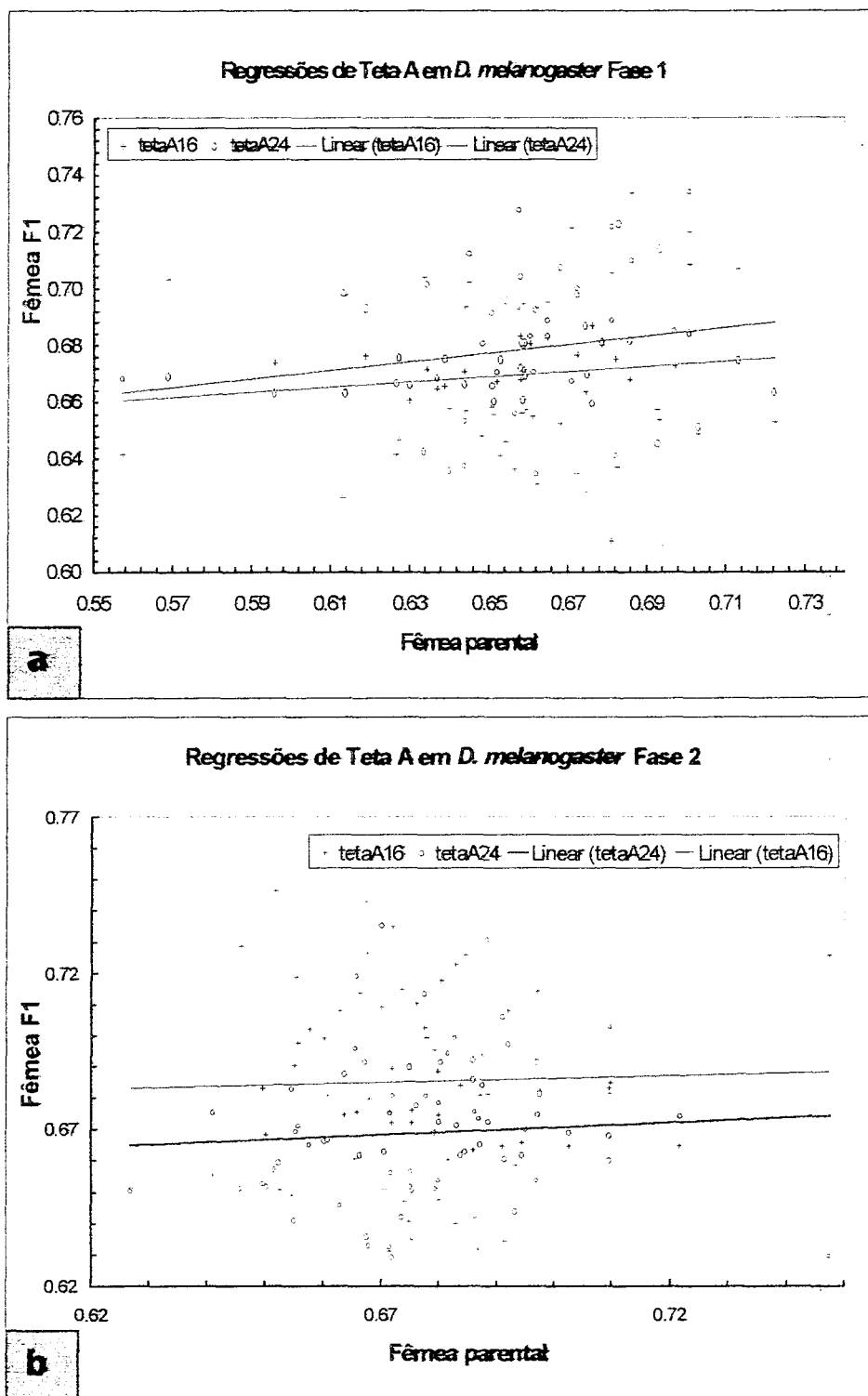


Fig.05 . Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(**a**) e Fase 2 (**b**). Regressões do traço teta A das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

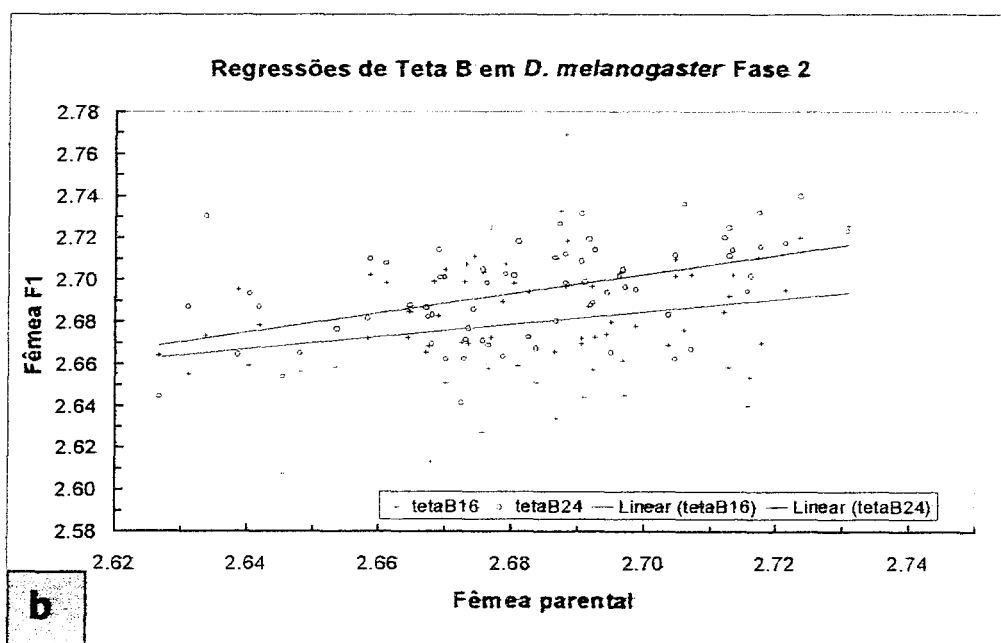
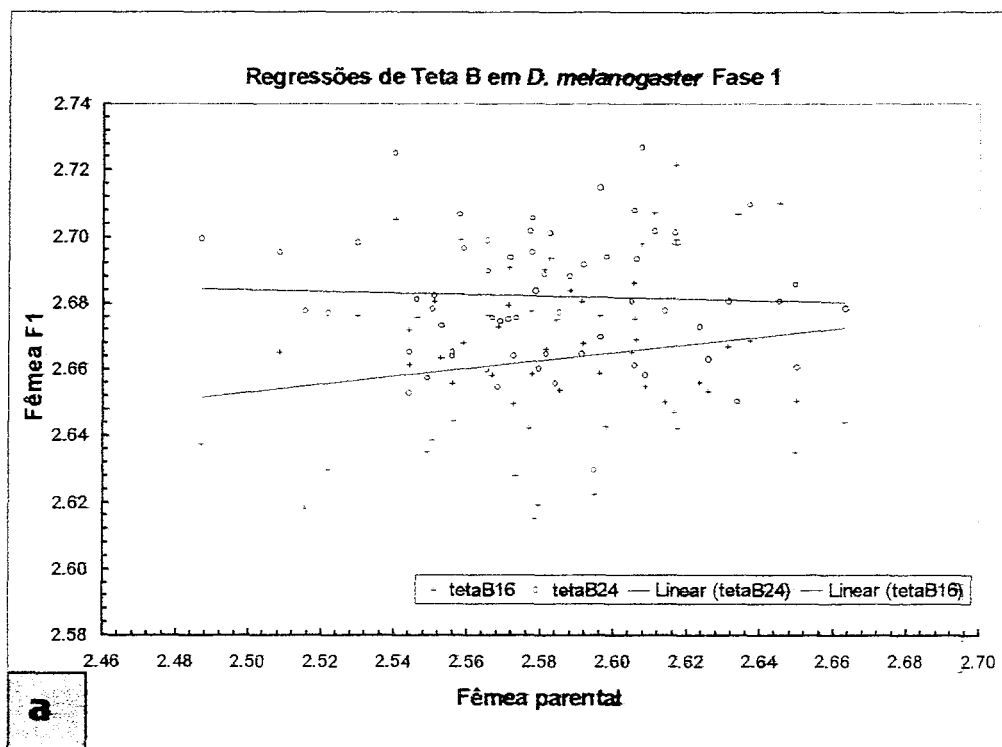


Fig.06. Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(a) e Fase 2 (b). Regressões do traço teta B das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

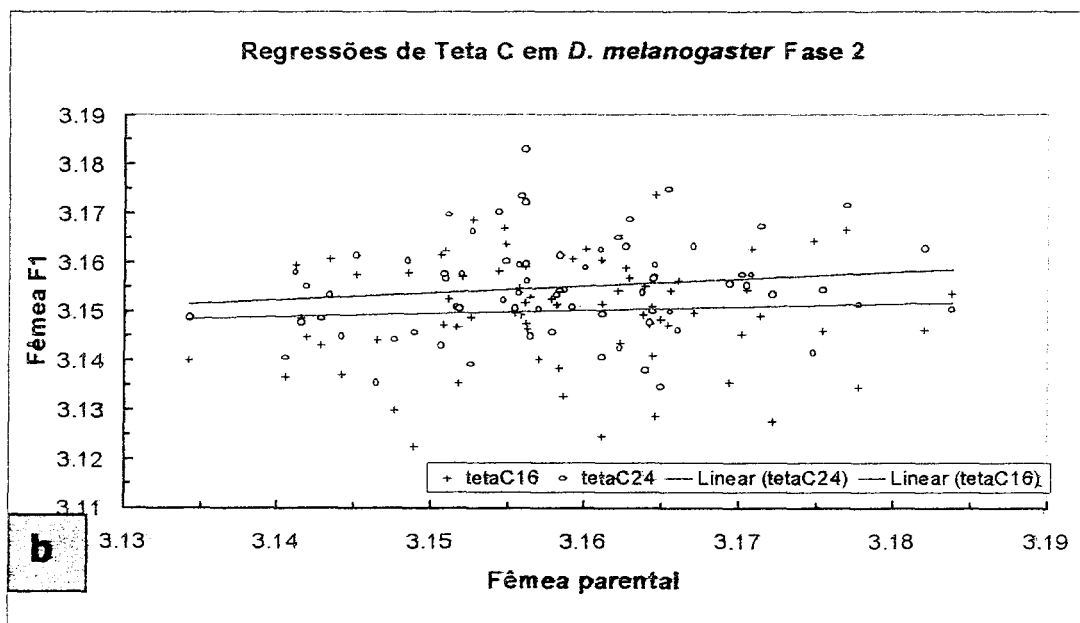
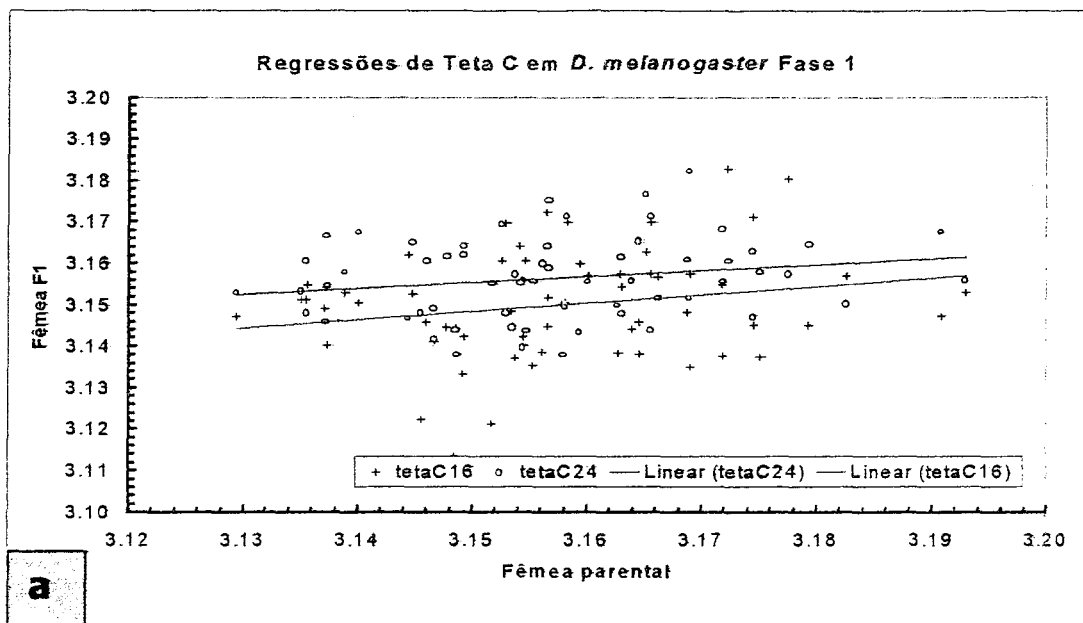


Fig.07 . Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(**a**) e Fase 2 (**b**). Regressões do traço Teta C das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

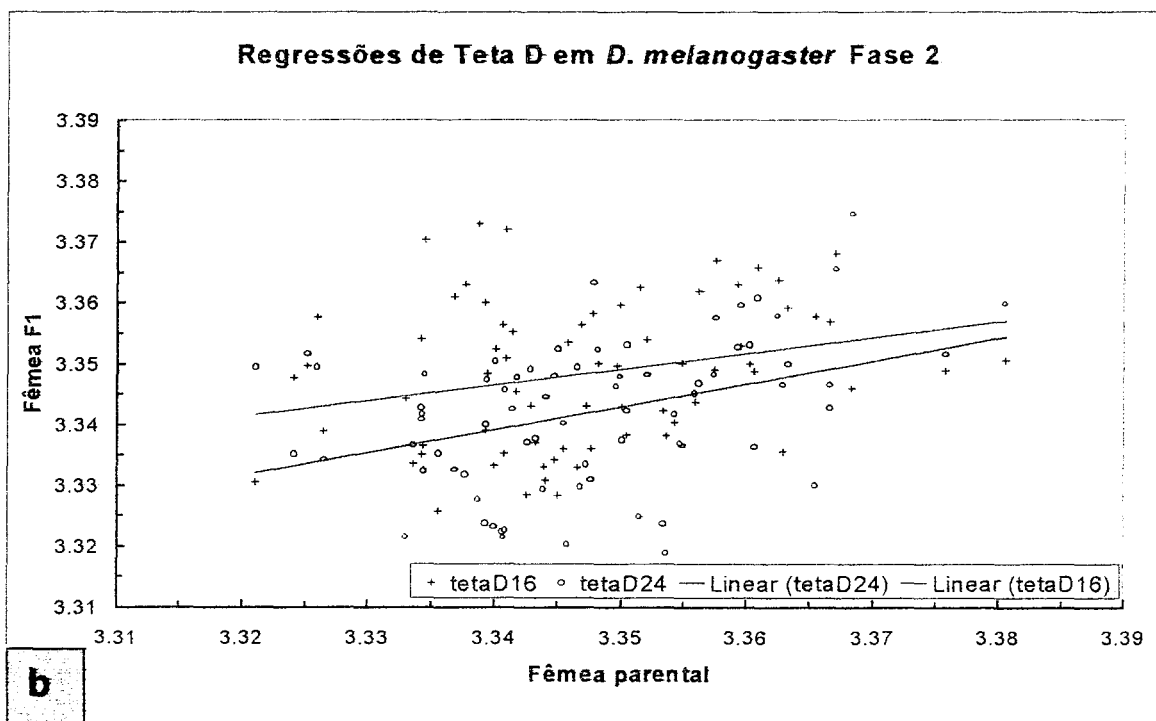
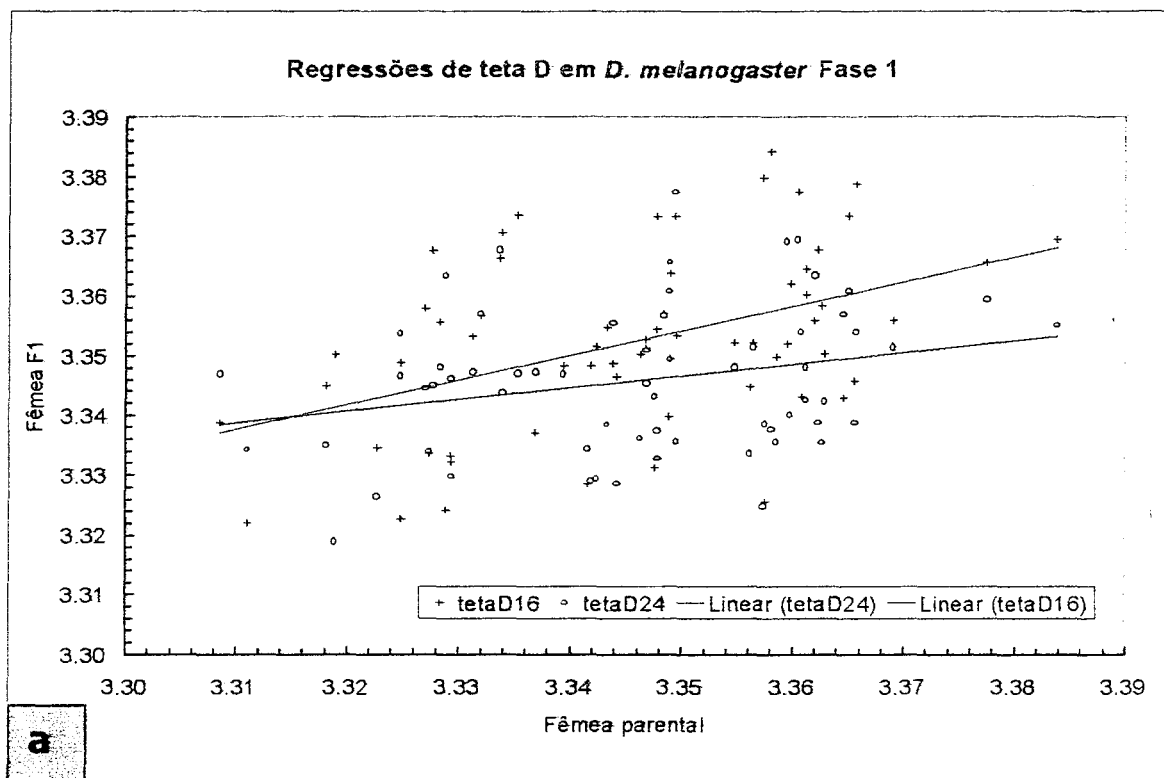


Fig.08. Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(**a**) e Fase 2 (**b**). Regressões do traço Teta D das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

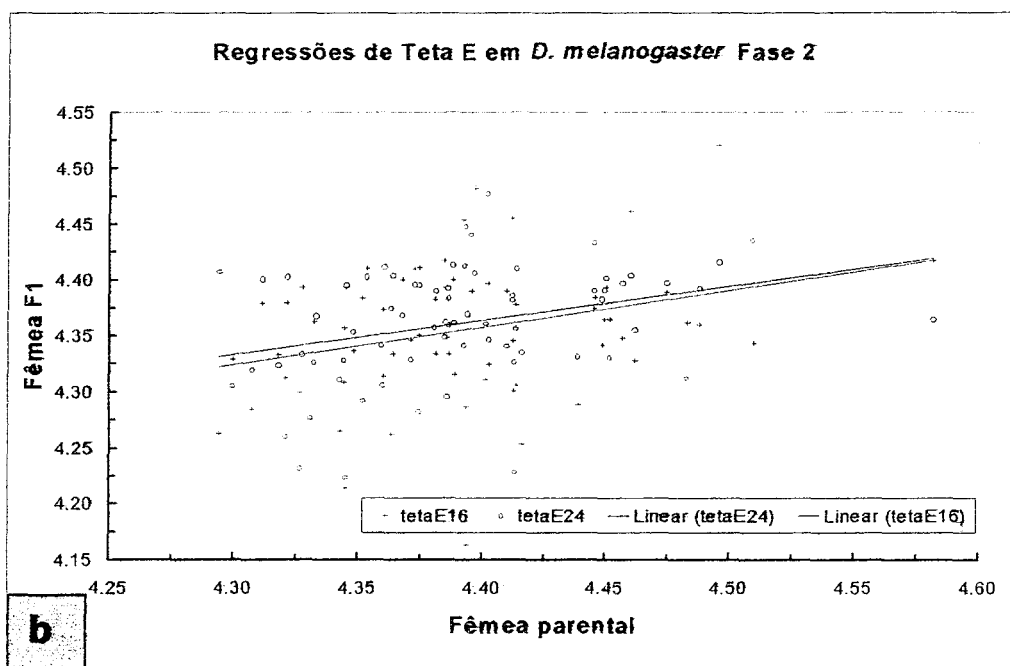
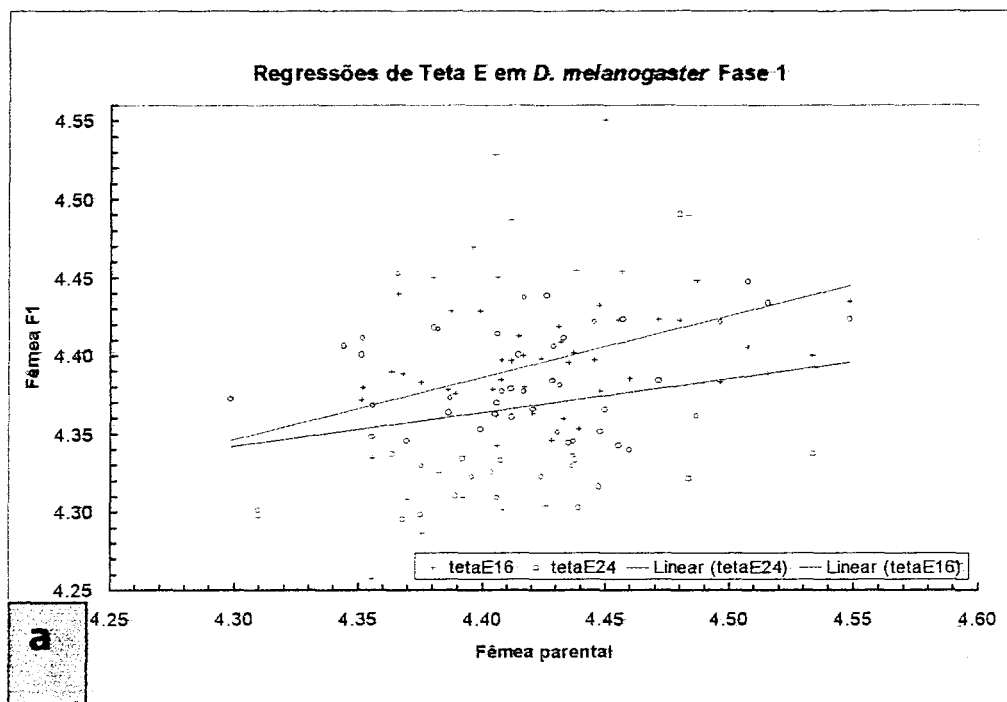


Fig. 09 .Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(**a**) e Fase 2 (**b**). Regressões do traço Teta E das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

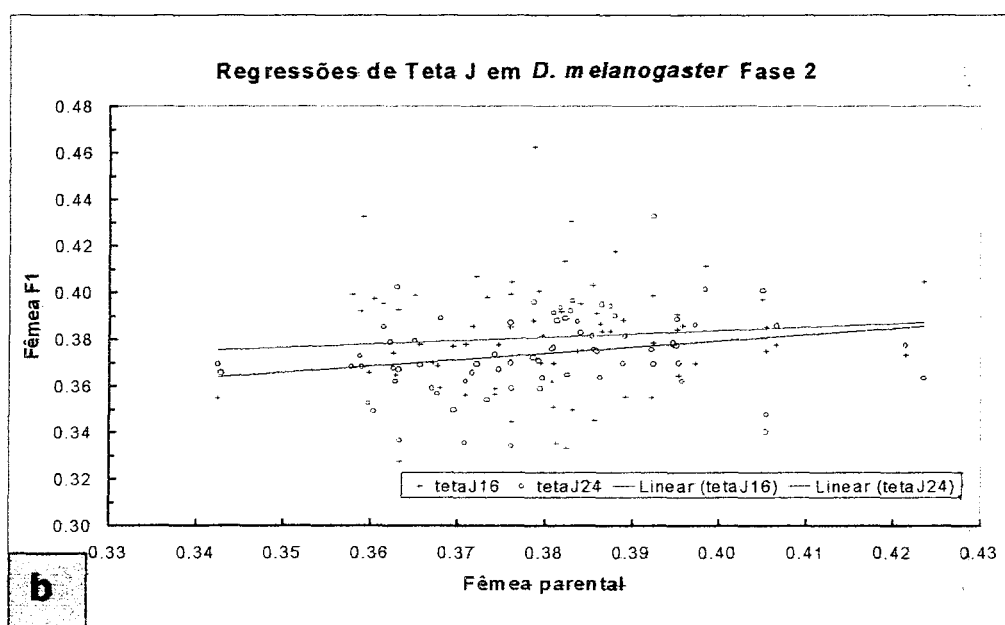
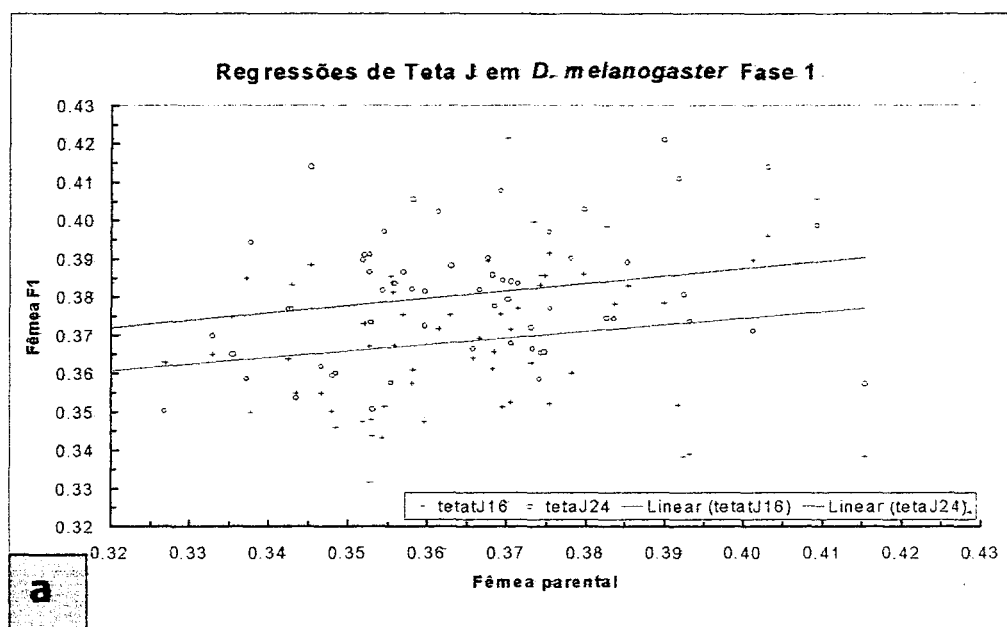


Fig. 10. Experimento com *D. melanogaster* Fase 1(a) e Fase 2 (b). Regressões do traço Teta J das Fêmeas F1 sobre fêmeas parentais.

3.1.4. Correlações fenotípicas

Os valores das correlações fenotípicas (r_p) entre as traços analisados, nas duas fases deste experimento são mostrados na tabela 11, e resultados dos testes t entre a média dos 6 valores de r_p de cada traço, em relação à média zero.

O conjunto de resultados mostra padrões significativos muito elevados das médias de correlações entre os seguintes traços:

- i) positiva entre os ângulos: $\theta_A \times \theta_B$, $\theta_A \times \theta_D$, $\theta_D \times \theta_E$, e negativa entre $\theta_A \times \theta_E$ e $\theta_B \times \theta_E$;
- ii) positiva entre SH e os ângulos θ_D e θ_E ;
- iii) positiva entre SI com θ_A e θ_B .

Tabela 11.. Estimativas das correlações fenotípicas entre os traços da asa no experimento com *D. melanogaster* N= 63 na fase 1 e N= 73 na fase 2, para fêmeas parentais e fêmeas F1.

Traços	Valores das correlações para cada condição experimental						Estatísticas		
	Fase 1: Fêmea parental	Fase 1: Fêmea F1 a 16,5°C	Fase 1: Fêmea F1 a 24°C	Fase 2: Fêmea parental	Fase 2: Fêmea F1 a 16,5°C	Fase 2: Fêmea F1 24°C	Média	erro padrão	Teste t
SI * SH	0,05	0,03	0,03	0,06	-0,28	0,13	0,003	0,6	0,06 ^{ns}
SI * θ_A	0,37	0,37	0,14	0,24	0,37	0,23	0,28	0,04	7,19***
SI * θ_B	0,47	0,18	0,07	0,39	0,35	0,36	0,30	0,06	5,00**
SI * θ_C	-0,02	-0,08	-0,08	-0,02	0,06	0,14	0,00	0,03	0,00 ^{ns}
SI * θ_D	-0,24	-0,15	-0,10	-0,31	-0,25	0,15	-0,15	0,07	-2,23 ^{ns}
SI * θ_E	-0,20	-0,17	-0,26	-0,18	-0,08	0,04	-0,14	0,04	-3,26*
SI * θ_J	0,31	0,29	0,13	0,17	0,32	0,19	0,23	0,03	7,07***
SH * θ_A	-0,07	0,08	-0,09	-0,13	-0,29	-0,16	-0,11	0,05	-2,22 ^{ns}
SH * θ_B	-0,26	-0,39	-0,33	-0,51	-0,59	-0,50	-0,43	0,05	-8,46***
SH * θ_C	-0,06	0,16	0,13	-0,01	0,002	-0,10	0,02	0,04	0,48 ^{ns}
SH * θ_D	0,39	0,54	0,42	0,44	0,34	0,43	0,43	0,03	15,78***
SH * θ_E	0,53	0,56	0,44	0,54	0,37	0,53	0,49	0,03	16,39***
SH * θ_J	-0,01	0,10	-0,16	-0,05	-0,19	0,06	-0,04	0,05	-0,88 ^{ns}
θ_A * θ_B	0,30	0,42	0,18	0,30	0,55	0,21	0,33	0,06	5,80**
θ_A * θ_C	-0,25	0,00	-0,33	0,18	0,03	0,02	-0,06	0,08	-0,74 ^{ns}
θ_A * θ_D	-0,30	-0,16	-0,47	-0,05	-0,31	0,02	-0,21	0,07	-2,84*
θ_A * θ_E	-0,31	-0,35	-0,35	-0,29	-0,62	-0,51	-0,40	0,05	-7,58***
θ_A * θ_J	0,87	0,82	0,75	0,77	0,89	0,75	0,81	0,02	32,22***
θ_B * θ_C	-0,01	0,13	0,06	0,36	0,43	0,39	0,23	0,08	2,93*
θ_B * θ_D	-0,13	-0,22	-0,26	-0,16	-0,17	-0,07	-0,17	0,03	-6,18**
θ_B * θ_E	-0,24	-0,56	-0,45	-0,62	-0,45	-0,46	-0,46	0,05	-8,75***
θ_B * θ_J	0,19	0,38	0,18	0,15	0,37	0,08	0,22	0,05	4,50**
θ_C * θ_D	0,38	0,44	0,48	0,51	0,45	0,38	0,44	0,02	20,51***
θ_C * θ_E	0,24	0,27	0,10	-0,19	0,15	-0,004	0,09	0,07	1,35 ^{ns}
θ_C * θ_J	-0,28	-0,03	-0,13	0,08	-0,02	-0,07	-0,07	0,05	-1,51 ^{ns}
θ_D * θ_E	0,66	0,42	0,47	0,39	0,39	0,37	0,45	0,04	10,15***
θ_D * θ_J	-0,17	-0,12	-0,43	-0,08	-0,24	0,05	-0,16	0,07	-2,49 ^{ns}
θ_E * θ_J	-0,14	-0,26	-0,25	-0,11	-0,52	-0,27	-0,26	0,06	-4,37**

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 - t_{0,05(2),5} = 2,571), t_{0,01(2),5} = 4,032, t_{0,001(2),5} = 6,869

3.2. Experimento com *D. mediopunctata*

3.2.1. Estatísticas descritivas

Os dados estatísticos descritivos para fêmeas parentais e fêmeas F1, em cada coleta são mostrados na tabela 1, juntamente com os valores das ANOVAS e teste Tukey que mostra as diferenças entre as médias. Nota-se que o traço tamanho da asa (SI) mostra diferença entre coletas para as fêmeas parentais e também entre as fêmeas F1 que foram criadas na mesma temperatura. O traço forma da asa (SH) não exibe diferença significativa entre coletas nem entre fêmeas parentais e fêmeas F1. Os ângulos θ exibem não exibem diferenças entre coletas, mas mostram diferenças significativas entre fêmeas parentais e fêmeas F1.

Tabela 12.: Estatísticas descritivas dos traços da asa de *D. mediopunctata* para Fêmea parental e fêmeas F1 do laboratório a 16,5°C. Valores de SI em mm. Ângulos θ em radianos. Tamanhos das amostras (N) para as coletas de Agosto=32 e de Setembro=51.

Traço	Agosto				Setembro				Estatística	
	Fêmea Parental		Fêmea F1		Fêmea Parental		Fêmea F1		Anovas N=166	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	F	P
SI	0,9875 ^a	0,0686	1,1031 ^b	0,0270	0,9597 ^c	0,0531	1,0887 ^b	0,0225	105,691255	0,0000
SH	0,4508 ^a	0,0104	0,4571 ^a	0,0146	0,4512 ^a	0,0118	0,4562 ^a	0,0113	2,904831	0,03649
θ_A	0,529 ^a	0,025	0,542 ^{a,b}	0,018	0,528 ^a	0,032	0,548 ^b	0,022	6,756747	0,00025
θ_B	2,806 ^a	0,026	2,842 ^b	0,017	2,815 ^a	0,019	2,837 ^b	0,018	29,329618	0,00000
θ_C	3,144 ^b	0,015	3,159 ^a	0,012	3,151 ^{b,c}	0,012	3,153 ^{a,c}	0,014	8,086229	0,00000
θ_D	3,318 ^b	0,015	3,332 ^a	0,015	3,320 ^{b,c}	0,013	3,326 ^{a,c}	0,016	5,707595	0,00097
θ_E	4,326 ^b	0,045	4,290 ^a	0,045	4,327 ^b	0,053	4,297 ^a	0,052	5,981833	0,00068
θ_J	0,271 ^{a,c}	0,021	0,280 ^{b,c}	0,015	0,268 ^a	0,020	0,283 ^b	0,015	7,267773	0,00013

Teste Tukey: médias com o mesma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%.

Podemos observar também que as médias das fêmeas F1 criadas no laboratório são maiores que das fêmeas parentais da mata, exceto para θ_E , nas duas coletas, o que indica um efeito ambiental importante sobre a morfologia da asa, relacionado à temperatura mais baixa em que as moscas foram criadas, bem como à disponibilidade de recursos alimentares.

3.2.2. Herdabilidade e interação com coleta

A tabela 13 exibe as estimativas de h^2 , obtidas pela regressão dos valores das filhas do laboratório sobre suas mães coletadas no campo, calculadas para cada coleta e com os dados agrupados das duas coletas. Podemos notar que há valores muito significativos para a coleta de setembro/2002, mas não para a coleta de agosto/2002, o que pode ser interpretado como influência do tamanho da amostra da estimativa. Somente o tamanho da asa (SI) não exibiu herdabilidade significativa em nenhuma estimativa.

Deve-se salientar que os valores maiores que 100% exibidos para θ_C e θ_D na coleta de setembro deve-se ao efeito do método da estimativa, ou seja, herdabilidade igual ao dobro do coeficiente da regressão (**b**), e também que há um erro padrão bastante elevado que está associado a estas estimativas, indicando que não são significativamente maiores que 100%.

O resultado da análise de covariância para cada traço com interação com coleta é exibido na tabela 14, mostrando que ocorreu interação entre fêmea parental e coleta somente para os ângulos θ_B e θ_C , indicado que a herdabilidade destes traços variou entre coletas.

Tabela 13: Herdabilidade estimada para traços da asa de *D. mediopunctata* por coleta e para os dados agrupados. Fêmea parental do campo e filhas (F1) do laboratório a 16,5°C. Valores em porcentagem (%). N=32 para coleta de Agosto e N=51 para coleta de Setembro.

Traço	Agosto		Setembro		Duas coletas	
	h^2	Erro Padrão	h^2	Erro Padrão	h^2	Erro Padrão
SI	-10,8	14,2	09,8 ^{ns}	12,0	04,6 ^{ns}	09,2 ^{ns}
SH	59,3 ^{ns}	50,2	82,7**	24,6	74,9**	23,5
θ_A	25,6 ^{ns}	25,9	62,2***	17,3	51,2***	14,5
θ_B	03,5 ^{ns}	23,8	77,8**	24,8	30,7 ^{ns}	17,4
θ_C	-07,5	30,6	104,8**	32,3	30,9 ^{ns}	23,1
θ_D	23,5 ^{ns}	36,9	103,6**	33,5	63,4*	25,2
θ_E	58,1 ^{ns}	34,9	60,3*	26,6	59,7**	20,9
θ_J	29,7 ^{ns}	25,5	66,3***	18,6	50,0**	15,1

ns: não significativo; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Tabela 14. Valores das Ancovas do experimento com *D. mediopunctata*, com interação com coleta, para os traços analisados. N=83
Graus de liberdade iguais para todos os traços, sendo: Fêmea parental = 1, coleta = 1, Coleta x fêmea parental = 1, erro = 79

Traços	SI		SH		θ_A		θ_B		θ_C		θ_D		θ_E		θ_J	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Fêmea parental	0,0029	0,9568	7,8292	0,0065	7,5793	0,0073	5,6033	0,0204	4,7200	0,0328	6,5129	0,0126	6,7531	0,0112	9,7975	0,0024
Coleta	1,6808	0,1986	0,2199	0,6403	1,1246	0,2922	4,7382	0,0325	6,3555	0,0137	2,6092	0,1102	0,0017	0,9671	1,2200	0,2727
Coleta X Fêmea parental	1,2879	0,2598	0,2120	0,6465	1,3172	0,2546	4,6690	0,0337	6,2936	0,0142	2,5866	0,1117	0,0023	0,9616	1,4221	0,2366

3.2.3. Correlações fenotípicas

Os valores das correlações fenotípicas dos traços analisados para as moscas do campo e suas filhas do laboratório, para cada coleta, bem como as médias destas correlações e respectivos teste **t**, são apresentados nas tabela 15. Destacam-se os seguintes valores altamente significativos:

- i) SH exibe correlação negativa significativa com θ_B , e positiva com θ_D e θ_E ,
- ii) correlações positivas entre $\theta_D \times \theta_E$, $\theta_C \times \theta_D$, $\theta_A \times \theta_J$, $\theta_B \times \theta_C$ e negativa entre: $\theta_B \times \theta_E$.

Tabela 15. Estimativas das correlações fenotípicas entre os traços da asa no experimento com *D.mediopunctata*, analisados por coleta e com dados agrupados. Fêmeas parentais do campo e Filhas F1 do laboratório a 16,5°C. N=31 para coleta de Agosto e N=51 para coleta de Setembro.

Traços	Valores das correlações por coleta				Estatísticas		
	Agosto		Setembro		Média	Erro padrão	Teste t
	Fêmea parental	Fêmea F1	Fêmea Parental	Fêmea F1			
SI * SH	-0,04	0,14	0,13	0,21	0,11	0,05	2,07
SI * θ_A	0,09	0,13	0,50	0,21	0,23	0,09	2,51
SI * θ_B	0,69	0,02	0,44	-0,03	0,28	0,17	1,62
SI * θ_C	0,18	-0,04	0,22	0,29	0,16	0,07	2,28
SI * θ_D	0,20	0,00	-0,07	0,29	0,11	0,08	1,25
SI * θ_E	-0,44	-0,02	-0,34	0,14	-0,17	0,14	-1,22
SI * θ_J	0,04	-0,07	0,37	0,14	0,12	0,09	1,28
SH * θ_A	0,20	0,33	0,18	0,25	0,24	0,03	7,18**
SH * θ_B	-0,09	-0,40	-0,38	-0,46	-0,33	0,08	-4,03*
SH * θ_C	0,32	-0,03	-0,02	0,09	0,09	0,08	1,11
SH * θ_D	0,57	0,42	0,31	0,49	0,45	0,06	8,12**
SH * θ_E	0,50	0,53	0,52	0,54	0,52	0,01	61,19***
SH * θ_J	0,24	0,28	0,17	0,21	0,23	0,02	9,67**
θ_A * θ_B	0,36	0,13	0,23	-0,19	0,13	0,12	1,13
θ_A * θ_C	0,38	0,07	-0,11	-0,13	0,05	0,12	0,44
θ_A * θ_D	0,33	0,18	-0,16	-0,10	0,06	0,12	0,54
θ_A * θ_E	0,03	0,01	-0,38	-0,06	-0,10	0,10	-1,05
θ_A * θ_J	0,87	0,65	0,89	0,78	0,80	0,05	14,59***
θ_B * θ_C	0,49	0,35	0,12	0,44	0,35	0,08	4,27*
θ_B * θ_D	0,31	-0,06	-0,20	0,06	0,03	0,11	0,25
θ_B * θ_E	-0,47	-0,46	-0,56	-0,27	-0,44	0,06	-7,22**
θ_B * θ_J	0,30	0,12	0,10	-0,30	0,06	0,13	0,43
θ_C * θ_D	0,68	0,73	0,61	0,68	0,68	0,02	27,37***
θ_C * θ_E	0,07	0,19	0,09	0,29	0,16	0,05	3,16
θ_C * θ_J	0,41	0,25	-0,14	-0,24	0,07	0,15	0,45
θ_D * θ_E	0,25	0,53	0,47	0,49	0,44	0,06	6,91**
θ_D * θ_J	0,38	0,41	-0,16	-0,16	0,12	0,16	0,73
θ_E * θ_J	0,16	0,25	-0,25	0,00	0,04	0,11	0,36

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001, t_{0,05(2),03}=3,182, t_{0,01(2),03} =5,841, t_{0,001(2),03} =12,924

3.3. Resultados Comparados

Os resultados obtidos para as duas espécies analisadas neste trabalho mostram-se bastante consistentes quando são comparados, usando-se o método da elipse e os valores médios da correlações entre traços.

3.3.1 Elipses representativas dos dados experimentais

Os resultados gráficos do método da elipse estão representados pela **figuras 11, 12 e 13**, seguintes, onde 03 conjuntos de elipses concêntricas foram desenhados a partir dos valores médios dos eixos **a** e **b** e ângulos **θ** medidos nas duas fases do experimento com *D. melanogaster* e no experimento com *D. mediopunctata*.

As figuras estão desenhadas na mesma escala, o que permite visualizar a plasticidade e variabilidade dos traços estudados, bem como comparar as diferenças morfológicas entre as asas nas duas espécies analisadas.

As elipses médias de *D. melanogaster* fase 1 mostram grande plasticidade do tamanho da asa (SI) em relação à temperatura e grande variação de **θ_B** entre fêmeas parentais e fêmeas F1. As elipses médias de *D. melanogaster* fase 2 mostram também a plasticidade do tamanho da asa (SI) em relação à temperatura e variação da forma (SH) entre fêmeas parentais e fêmeas F1 que foram criadas na mesma temperatura de 24°C.

O conjunto de elipses de *D. mediopunctata* exibe a diferença do tamanho da asa entre coletas e entre fêmeas parentais e fêmeas F1 e também a grande diferença observada para **θ_B** entre fêmeas parentais e fêmeas F1, do mesmo modo como verificado para *D. melanogaster* fase 1.

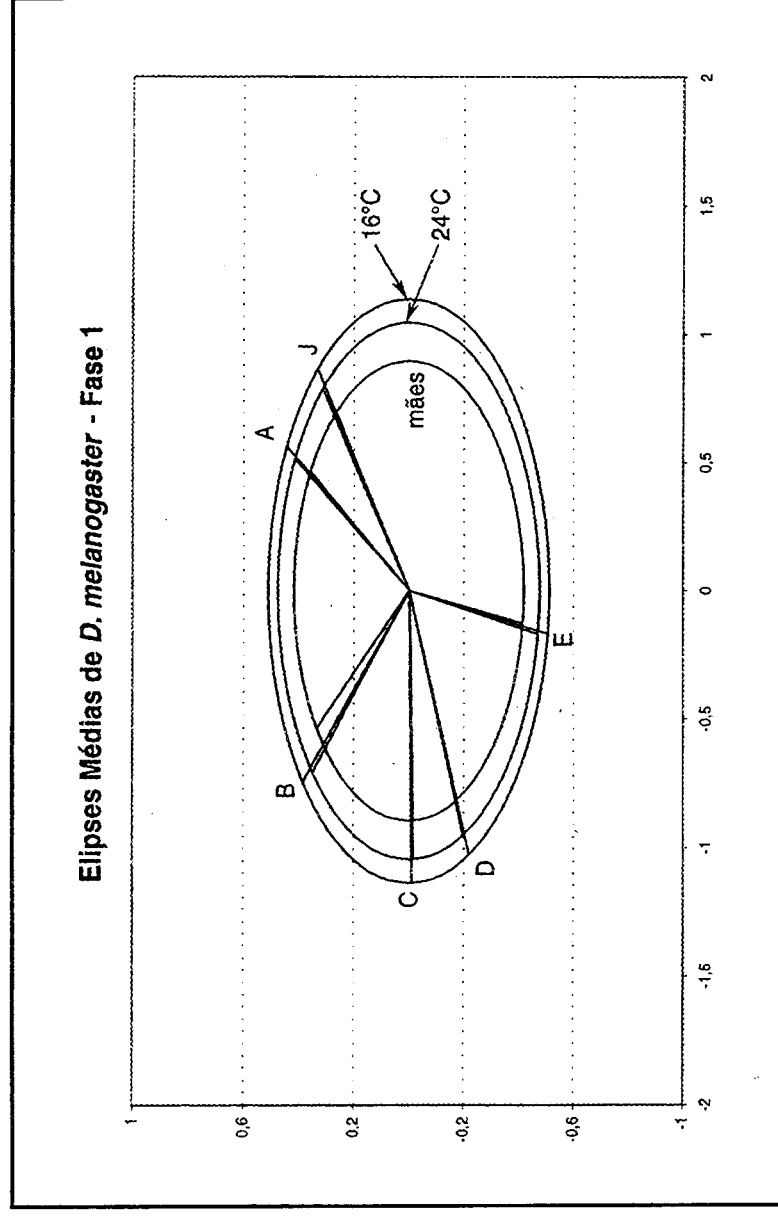


Fig. 11 . Elipses representativas dos resultados obtidos na fase 1 do experimento com *D. melanogaster*.

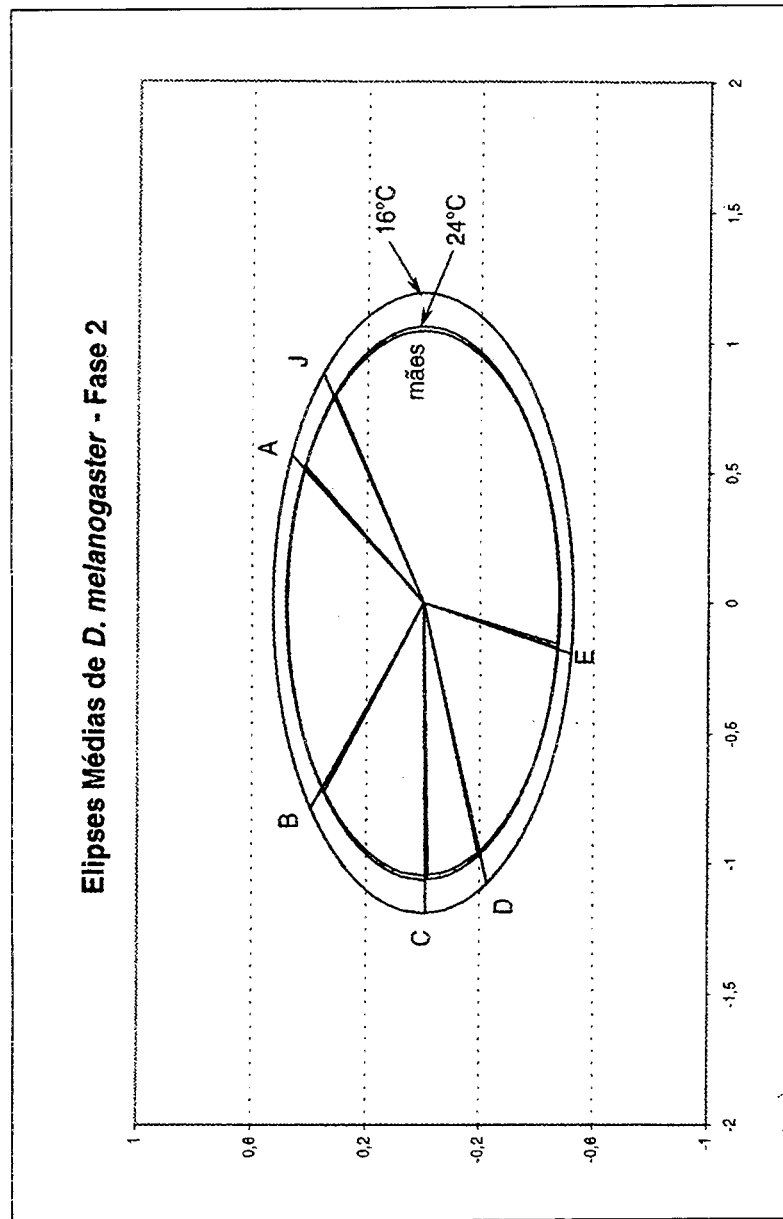


Fig. 12 . Elipses representativas dos resultados obtidos na fase 2 do experimento com *D. melanogaster*.

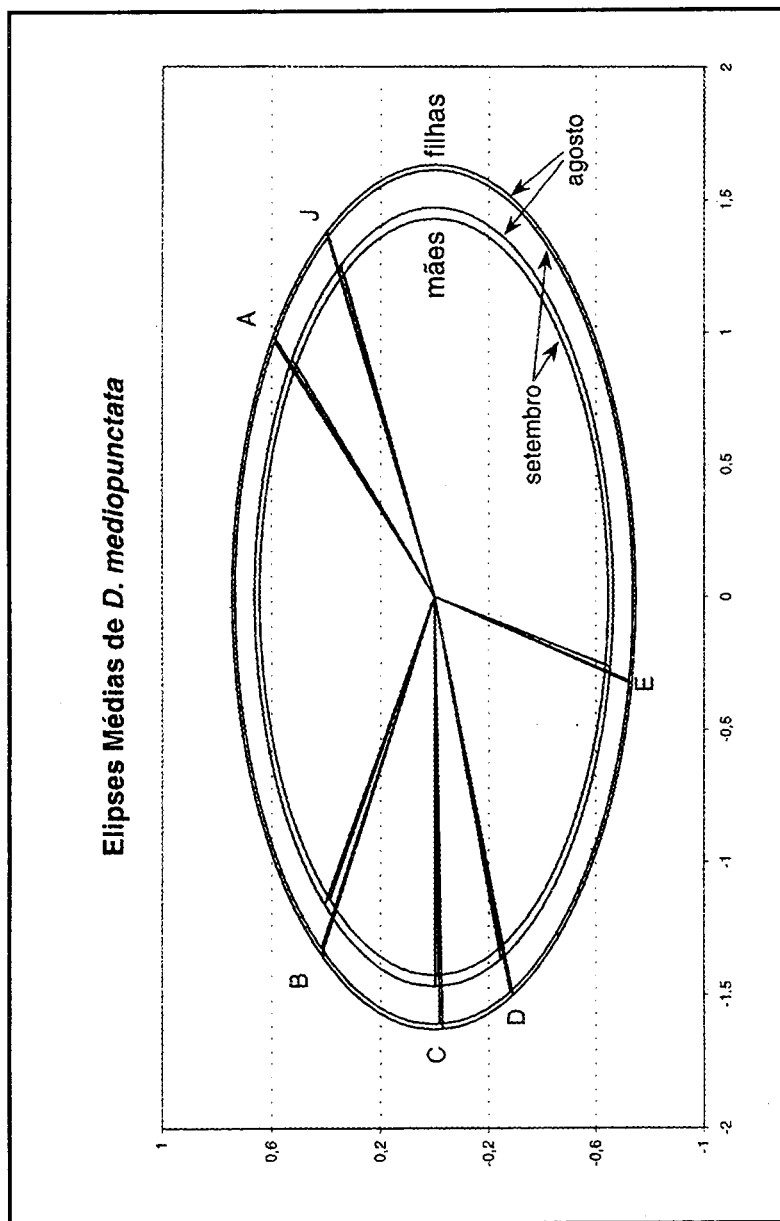


Fig. 13 . Elipses representativas dos resultados obtidos no experimento com *D. mediopunctata*.

3.3.2. Comparação entre valores das correlações fenotípicas

A consistência das estimativas das correlações para os traços da asa pode ser observada na tabela 16 que exibe as médias das correlações calculadas neste trabalho, para as duas espécies, bem como os valores estimados para uma população de *D. mediopunctata* coletada no Morro de Santana, em Porto Alegre (RS) e mostrados no trabalho de Bitner-Mathé & Klaczko (1999a), no qual o método da elipse foi aplicado. Os valores significativos que mostram mais semelhança estão em negrito, destacando-se as correlações entre **SH** com os ângulos θ_B , θ_D , θ_E e entre os ângulos: $\theta_A \times \theta_J$, $\theta_B \times \theta_E$, $\theta_C \times \theta_D$ e $\theta_D \times \theta_E$.

Os valores médios das correlações deste trabalho estão sumariadas na **fig.14.** que mostra a correlação entre as correlações médias observadas para as duas espécies, fazendo-se a regressão dos valores médios de *D. melanogaster* sobre os valores médios de *D. mediopunctata*, na qual obtém-se um coeficiente de correlação muito elevado ($r = 0,879$, $P < 0,001$).

Tabela 16. Comparação entre as correlações médias estimadas no experimentos com *D. melanogaster*, *D. mediopunctata* e os valores da tabela 3 do trabalho de Bitner-Mathé & Klaczko (1999a), com *D. mediopunctata*.

	<i>D. melanogaster</i> Médias da tabela 10		<i>D. mediopunctata</i> Médias da tabela 3.2.3		<i>D. mediopunctata</i> Bitner-Mathe & Klaczko (1999a), Tabela 3.	
	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Campo	Laboratório
Correlações						
SI * SH	0,003	0,6	0,11	0,05	-0,20*	-0,01
SI * θ_A	0,28***	0,04	0,23	0,09	0,22*	0,46***
SI * θ_B	0,30**	0,06	0,28	0,17	0,55***	0,20*
SI * θ_C	0,00	0,03	0,16	0,07	0,22*	0,09
SI * θ_D	-0,15	0,07	0,11	0,08	0,07	0,01
SI * θ_E	-0,14*	0,04	-0,17	0,14	-0,38***	-0,13
SI * θ_J	0,23***	0,03	0,12	0,09	0,04	0,35***
SH * θ_A	-0,11	0,05	0,24**	0,03	0,04	-0,10
SH * θ_B	-0,43***	0,05	-0,33*	0,08	-0,35***	-0,46***
SH * θ_C	0,02	0,04	0,09	0,08	-0,03	-0,04
SH * θ_D	0,43***	0,03	0,45***	0,06	0,20*	0,40***
SH * θ_E	0,49***	0,03	0,52***	0,01	0,44***	0,65***
SH * θ_J	-0,04	0,05	0,23	0,02	0,11	-0,05
θ_A * θ_B	0,33**	0,06	0,13	0,12	0,14	0,22**
θ_A * θ_C	-0,06	0,08	0,05	0,12	-0,16	0,02
θ_A * θ_D	-0,21*	0,07	0,06	0,12	-0,22	-0,02
θ_A * θ_E	-0,40***	0,05	-0,10	0,10	-0,39***	-0,35***
θ_A * θ_J	0,81***	0,02	0,80***	0,05	0,83***	0,76***
θ_B * θ_C	0,23*	0,08	0,35*	0,08	0,52***	0,43***
θ_B * θ_D	-0,17**	0,03	0,03	0,11	0,19	0,03
θ_B * θ_E	-0,46***	0,05	-0,44**	0,06	-0,37***	-0,48***
θ_B * θ_J	0,22**	0,05	0,06	0,13	-0,03	0,11
θ_C * θ_D	0,44***	0,02	0,68***	0,02	0,67***	0,50***
θ_C * θ_E	0,09	0,07	0,16	0,05	0,12	-0,02
θ_C * θ_J	-0,07	0,05	0,07	0,15	-0,26*	-0,04
θ_D * θ_E	0,45***	0,04	0,44**	0,06	0,42***	0,45***
θ_D * θ_J	-0,16	0,07	0,12	0,16	-0,22*	-0,02
θ_E * θ_J	-0,26**	0,06	0,04	0,11	-0,21*	-0,25**

ns: não significativo; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

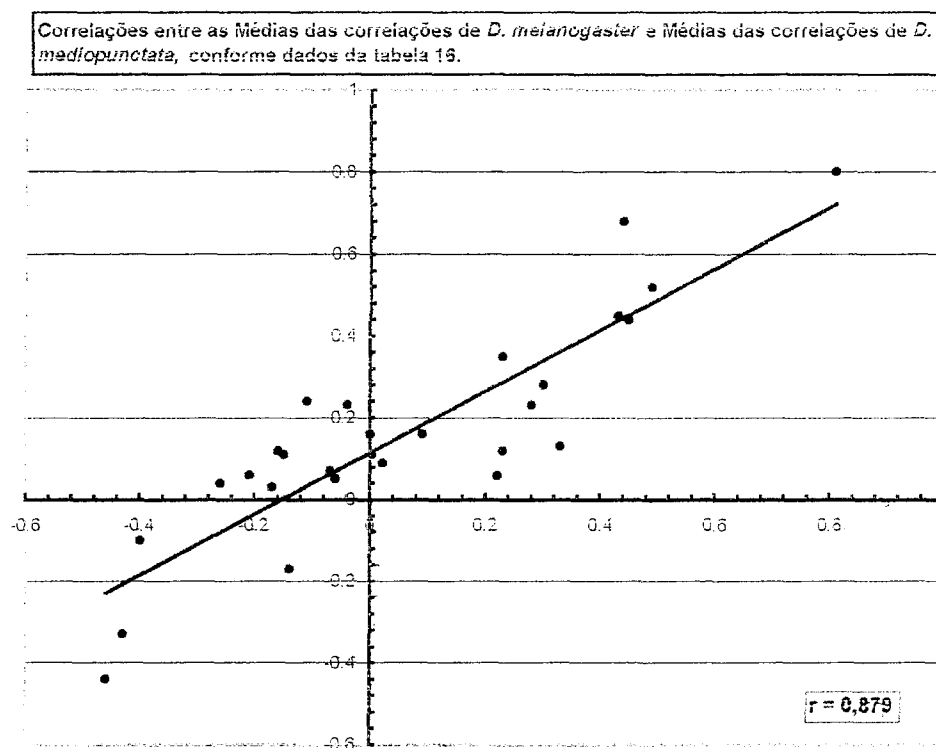


Figura 14 . Regressão dos valores médios das correlações de *D. melanogaster* sobre os valores médios das correlações de *D. mediopunctata*..

4. DISCUSSÃO

4.1. Estudos morfométricos da asa de *Drosophila* com o método da elipse

O presente trabalho representa, em certa medida, uma continuação dos trabalhos realizados por Bitner-Mathé & Klaczko (1999a,b), em que o método da elipse foi aplicado no estudo de traços morfológicos de asas de *Drosophila*. Neste sentido, este estudo pode complementar e corroborar alguns aspectos abordados nestes dois artigos anteriores, devido à semelhança das metodologias utilizadas, mas utilizando moscas oriundas de localidades distintas daquelas inicialmente analisadas. Portanto, as referências básicas para discussão dos resultados obtidos neste trabalho são: i) o estudo do efeito do sexo, temperatura e densidade sobre a morfologia da asa de uma linhagem de laboratório em *D. melanogaster* (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b); ii) o estudo de herdabilidade e correlações fenotípicas e genéticas para morfologia da asa em *D. mediopunctata*, de moscas coletadas no campo e sua prole fêmea do laboratório (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a).

4.2. Experimento com *Drosophila melanogaster*

O tamanho de amostra utilizado nas duas fases deste experimento sofreu redução em relação ao tamanho inicialmente previsto no desenho experimental, o que pode ter sido causado pela menor viabilidade ou produção de ovos das moscas criadas a 16,5°C, na qual a média das moscas que não produziram prole nas duas fases foi de 22,5%, , embora esta temperatura não seja considerada de estresse para moscas desta espécie (David *et al.*, 1983, 1997). Outra causa desta redução deveu-se a que nem todas as fêmeas parentais produziram prole nas duas temperaturas experimentais, impossibilitando a formação de famílias completas para análise.

4.2.1. Dados morfométricos: fase 1

A primeira fase deste experimento, empregando moscas fêmeas coletadas na área urbana e de suas filhas F1 criadas em duas temperaturas no laboratório revela que o traço tamanho da asa (SI) exibiu grande plasticidade em relação à temperatura, como pode-se observar na

tabela 04, onde a média da geração F1 criada a 16,5°C é maior do que a média das moscas criadas a 24°C, bem como das fêmeas parentais, em concordância com resultados descritos em trabalhos sobre tamanho de asa e tórax em *Drosophila*, criadas em diferentes temperaturas (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b; French *et al.*, 1998; David *et al.*, 1997; Nunney & Cheung, 1997; Partridge *et al.* 1994; Thomas, 1993).

O fato das moscas criadas a 24°C apresentarem média de tamanho maior do que a de sua geração parental indica que além da temperatura em que estas se desenvolveram, outros fatores, especialmente efeitos nutricionais devido à restrição de recursos alimentares ou superpopulação de larvas podem produzir moscas menores (Moreteau *et al.*, 1995), como demonstrado em trabalhos nos quais a densidade de larvas foi controlada, tais como, o de Bitner-Mathé & Klaczko (1999b) com *D. melanogaster* e o trabalho de Thomas (1993) com *D. buzzatii*.

A forma da asa (SH) exibiu médias estatisticamente diferentes nas diferentes condições ambientais, conforme teste de Tukey, mas menores que a média da geração parental, em sentido inverso ao observado para o tamanho da asa, mas, indicando sua plasticidade em relação à temperatura. Estes resultados mostram bastante semelhança com aqueles obtidos por Bitner-Mathé & Klaczko (1999b) com *D. melanogaster* criadas em duas diferentes temperaturas (16,5°C e 25°C) e duas diferentes densidades (10 e 100 larvas por frasco com 10 ml de meio de cultura), com os seguintes resultados de SH para as moscas fêmeas: $0,463 \pm 0,002$ (10 larvas a 16,5°C), $0,465 \pm 0,002$ (100 larvas a 16,5°C), $0,456 \pm 0,002$ (10 larvas a 25°C) e $0,467 \pm 0,002$ (100 larvas a 25°C).

Também as médias obtidas para os ângulos $\rceil$ exibiram variação entre as condições experimentais, indicando que a disposição das veias no plano da asa é bastante variável ou plástica, embora não seja possível inferir um padrão claro desta variação, visto que as médias de cada ângulo apresenta uma variação distinta das médias dos demais ângulos, o que

também foi observado nos resultados da fase 2, bem como no trabalho de Bitner-Mathé & Klaczko (1999b).

4.2.2. Dados morfométricos: fase 2

De modo semelhante ao que se encontrou na fase 1, a **tabela 5** mostra que o tamanho da asa mostrou muita plasticidade com relação à temperatura, como indicado pelas médias das filhas a 16,5°C e 24°C, com média maior na temperatura mais baixa.

Comparando-se os valores de SI nas duas fases, nota-se que as fêmeas parentais da fase 2 são maiores que as parentais fase 1. Este resultado era esperado, visto que na fase 1 elas vinham do ambiente urbano e se desenvolveram em condições, provavelmente, menos favoráveis que as do laboratório. Entretanto, quando se faz a comparação entre fases, para as médias das fêmeas F1 crescidas em cada temperatura, o resultado é até certo ponto surpreendente, já que na fase 2 as médias de SI são menores que as da fase 1. Isto pode ser atribuído a uma diferenciação genética ocorrida no laboratório, talvez em função da temperatura mais baixa (cerca de 18°C) em que os estoques foram mantidos até a coleta das moscas para o início da fase 2, ou devido ao endocruzamento dentro das linhagens isofêmeas, cujo efeito pode não ter sido totalmente eliminado com a série de cruzamentos que precedeu o início da fase 2.

Mudanças deste tipo foram observadas por Pegueroles *et al.* (1999) com amostras de duas populações de *D. subobscura*, mantidas a 18°C durante 4 gerações e a 13°C durante 2 gerações, as quais mostraram aumento significativo do comprimento da asa e da tíbia, sendo os resultados semelhantes para ambos os sexos e temperatura. Powell (1974) observou que duas populações de *D. willistoni* mantidas nas temperaturas de 19°C (25-30 gerações) e 25°C (35-40 gerações) divergiram com relação ao comprimento da asa, verificando-se que as moscas mantidas na temperatura mais baixa tornaram-se geneticamente maiores do que aquelas mantidas na temperatura mais elevada.

Dentro da fase 2, as médias de SH também são diferentes, embora fosse esperado não haver diferença entre a geração parental que foi criada a 24°C e sua F1 na mesma temperatura. Esta diferença é visível quando se observa a figura 12 que representa as elipses médias na fase 2, onde a elipse das filhas a 24°C é mais alongada em seu eixo maior (**a**) em relação a das mães na mesma temperatura, enquanto o seu eixo menor (**b**) é igual para mães e filhas. Provavelmente, esta diferença é devido ao efeito de densidade ou melhor suprimento de recursos alimentares para as larvas da geração F1, uma vez que as mães foram criadas em condições diferentes (garrafas de 250 ml). Estes efeitos foram observados no experimento de Bitner-Mathé & Klaczko (1999b), em que temperatura e densidade menores resultaram em SI maiores, com estes fatores interagindo de modo aditivo.

Do mesmo modo que se verificou para SI, nota-se que as médias de SH das fêmeas F1 em cada temperatura desta fase é menor que as médias observadas na fase 1, para as moscas F1 nas temperaturas correspondentes, sendo estas médias menores que aquelas obtidas por Bitner-Mathé & Klaczko (1999b), em densidade controlada e temperatura de 16,5°C e 25°C. Este resultado para SH também pode explicado pelo efeito da diferenciação genética ou endocruzamento que pode ter ocorrido no laboratório, conforme discutido acima para SI.

Para as médias dos ângulos θ , verifica-se novamente grande variação entre as condições experimentais, exceto para $\theta_{j,}$. O conjunto de resultados para cada ângulo também difere daquele observado na fase 1, embora os valores médios desta fase, para a temperatura de 16,5°C sejam muito próximas das médias exibidas na tabela 3 do trabalho de Bitner-Mathé & Klaczko (1999b) para moscas fêmeas criadas na temperatura de 16,5°C e densidade de 10 larvas, exceto para média do ângulo θ_E .

4.2.3. Herdabilidade e interação genótipo-ambiente

As estimativas de herdabilidade mostradas na **tabelas 6** dos resultados indicam que h^2 no ambiente urbano, correspondente à fase 1, foram significativas apenas para o ângulo θ_D ,

em cada temperatura e para os ângulos θ_C , θ_E e θ_J , quando os dados das duas temperaturas foram agrupados. A herdabilidade estimada no laboratório, mostrada na **tabela 07**, indica valores muito significativos para SI, SH e ângulos θ_B , θ_D e θ_E , ressaltando-se que SH mostra h^2 significativamente muito elevada somente para a temperatura de 24°C, sinalizando a existência de interação genótipo-ambiente para este traço. O conjunto destes resultados indica a existência de variabilidade genética para os traços da asa, exceto θ_A que não exibiu herdabilidade em nenhuma das estimativas, embora seja elevado o componente ambiental da variância fenotípica, visto que somente nas condições controladas do laboratório estes traços exibem valores de h^2 mais elevados, especialmente SI e SH.

Embora a herdabilidade estimada no laboratório possa ser usada como indicador de h^2 na natureza, discrepâncias de estimativas entre campo e laboratório são muito freqüentes devido, principalmente, ao componente ambiental da variância fenotípica (Weingensberg & Roff, 1996). Por exemplo, Coyne & Beecham (1987) estimaram h^2 do comprimento da asa no campo e no laboratório para *D. melanogaster*. Para a regressão das filhas do laboratório sobre mães do campo obtiveram $b = 0,09 \pm 0,07$, enquanto para a regressão de filhas sobre mães do laboratório o valor de $b = 0,32 \pm 0,08$. Usando a mesma metodologia, Gibert *et al.* (1998) analisaram o comprimento da asa em fêmeas de *D. melanogaster* no campo e em sucessivas gerações do laboratório, e encontraram que o coeficiente da regressão das filhas (F1) do laboratório sobre mães campo era muito baixo, não significativamente diferente de zero, enquanto a média deste coeficientes entre as gerações do laboratório foi de $0,07 \pm 0,01$, refletindo o fato de que, na natureza, a maior parte da variabilidade fenotípica pode ser atribuída ao componente ambiental, não herdável.

Os resultados das análise de covariância aplicada aos dados de cada fase mostrados nas **tabelas 08 e 09**, e para os dados agrupados das duas fase na **tabela 10** indicam que somente a forma da asa (SH) apresenta interação genótipo-ambiente, enquanto que SI e θ_B

exibem interação entre fases e entre fêmeas parentais (mães). A norma de reação de cada traço em cada fase experimental representada graficamente pelas **figuras 03 a 10**, também mostra interação genótipo-ambiente somente para SH na fase 2 (fig. 4.a), com as retas de regressão claramente concorrentes. Provavelmente, a redução da variância ambiental na fase 2 possibilitou que se detectasse interação para a forma da asa naquela fase e não na fase 1, do mesmo modo como ocorreu com as estimativas de h^2 para este traço

Estes resultados contrastam com a detecção de interação genótipo-ambiente para o comprimento da asa verificada nos trabalhos de Coyne & Beecham (1987) e de Karan *et al.* (1998), cujo significado adaptativo foi interpretado como uma estrutura tem potencial de apresentar diferentes respostas aos diferentes fatores ambientais, podendo estar relacionado ao "wing-loading" das moscas e seu sucesso reprodutivo ou mecanismos dispersão em diferentes condições ecológicas (Starmer & Wolf, 1989).

4.2.4. Correlações fenotípicas

Do conjunto de correlações fenotípicas exibido na **tabela 11**, várias inferências podem ser feitas quanto ao seu significado biológico. Os valores médios das correlações mostram elevada correlação de SH com os ângulos θ_D e θ_E (positiva) e θ_B (negativa), indicando que mudanças na disposição das veias e na forma da asa estão relacionados de modo causal, quer seja pela mudança de um traço acarretando mudança no outro ou ambos sendo influenciados pelas mesmas causas. Bitner-Mathé *et al.* (1995) encontraram que a forma da asa em *D. mediopunctata* é influenciada primariamente por variações na posição da segunda veia longitudinal, o que corresponde ao ângulo θ_B .

O tamanho da asa (SI) exibe correlação significativa e positiva somente com os ângulos θ_A e θ_B , o que sugere um padrão de correlações distinto e independente daquele observado para SH. Estes resultados para SI e SH mostram concordância com trabalho Gilchrist & Partridge (2001) que analisaram a arquitetura genética do tamanho e forma da asa em *D. melanogaster*, e

obtiveram resultados que sugerem diferentes respostas à seleção direcional para estes traços. Neste mesmo sentido, o conjunto das correlações significativas da tabela 11, também concorda com o trabalho de Zimmerman *et al.* (2000), no qual se usou a técnica de QTL, que indica um conjunto comum de genes responsável pela variação na forma da asa, independentemente das variáveis que afetam seu tamanho, tais como sexo e temperatura de crescimento, sinalizando que forma da asa é determinada, em parte, através da regulação do comprimento e posição de suas veias.

Na **tabela 11** também notam-se médias de correlações altamente significativas, sendo positivas entre os ângulos: $\theta_A \times \theta_B$, $\theta_A \times \theta_J$, $\theta_C \times \theta_D$, $\theta_D \times \theta_E$, e negativas entre: $\theta_A \times \theta_E$, e $\theta_B \times \theta_E$, sugerindo que a disposição das veias no plano da asa é muito integrada, de modo que havendo variação em um ângulo os demais também irão sofrer mudanças, o que concorda com os resultados do trabalho de Klingenberg & Zaklan (2000), no qual se aplicou a morfometria geométrica, que revelou uma grande covariância no movimento de diferentes "landmarks" no plano da asa. Estes resultados também estão de acordo com modelo de compensação no desenvolvimento de veias em asas de *Drosophila* discutido por Thompson *et al.* (1980).

4.3. Experimento com *Drosophila mediopunctata*

4.3.1. Dados morfométricos

Os dados estatísticos apresentados na **tabela 12** revelam efeito ambiental significativo, quando se comparam as médias entre moscas da mata e suas F1 do laboratório. Testes de Tukey indicam que as médias exibidas pelas fêmeas F1 do laboratório são maiores do que as fêmeas parentais da mata, com exceção de **SH** que não exibiu variação entre os ambientes. Também, nota-se uma diferença nos valores de SI das fêmeas da mata, entre coletas, refletindo a influência do fator ambiental temperatura cuja média aumentou significativamente da coleta de agosto para a de setembro, resultando em moscas com asas menores.

Os dados obtidos nesta espécie por Bitner-Mathé & Klaczko (1999a), usando a mesma metodologia de análise e igual temperatura experimental, mostram que SI e os ângulos: θ_B , θ_C , θ_D , θ_E apresentam médias maiores no laboratório, enquanto SH e θ_J não apresentaram diferenças significativas entre os dois ambientes. Em outro trabalho com *D. mediopunctata* feito por Bitner-Mathé & Klaczko (1999c) que estudaram a forma da asa a partir de uma treliça de 11 distâncias lineares, a análise dos componentes principais mostrou pequena variação para o PC2 (8%) e o PC3(6%), relacionados a forma da asa.

Portanto, do conjunto de dados obtidos nestes trabalhos pode-se inferir um padrão geral de variação da asa para *D. mediopunctata* em que o tamanho e os ângulos θ mostram uma grande plasticidade, mostrando uma tendência de aumento em suas médias em resposta a temperatura mais baixas, enquanto que SH mostra-se bastante canalizada. .

4.3.2. Herdabilidade e interação com coleta

A **tabela 13** mostra que somente SI não apresentou herdabilidade significativa neste trabalho e também indica o efeito do tamanho da amostra sobre esta estimativa, visto que na coleta de agosto/2000, com $N = 32$, não foi detectada h^2 para nenhum dos traços. Estas estimativas de h^2 mostram grande concordância, em termos de significância, com aquelas apresentadas no trabalho de Bitner-Mathé & Klaczko (1999a), tabela 2, que exibe estimativas de h^2 significativas para estes SH e os ângulos: θ_C , θ_D e θ_E e não significativa para SI, o que pode ser um indicador consistente da variabilidade genética destes traços, em razão da repetibilidade dos resultados.

Bitner-Mathé & Klaczko (1999c) também analisaram o tamanho e forma da asa de moscas fêmeas de *D. mediopunctata* coletadas no Parque Nacional do Itatiaia (22° 25' S; 44° 50' W), estado do Rio de Janeiro, e fêmeas da geração F1 no laboratório, criadas a 16,5°C. Foi usada a morfometria tradicional de distâncias lineares (treliça) e análise dos componentes principais. Os resultados obtidos mostram que das 6 coletas realizadas, somente a coleta de agosto/87 exibiu

h^2 significativamente maior que zero para o tamanho da asa (PC1-tot) e sua forma (PC2-tot e PC3-tot), embora, para dados combinados das 6 coletas, estes dois componentes mostrem h^2 altamente significativos: $50 \pm 7\%$ para PC2-TOT e $47 \pm 8\%$ para PC3-tot.

Do conjunto de resultados obtidos para *D. mediopunctata*, mostrado neste e nos trabalhos de Bitner-Mathé & Klaczko (1999a,c), pode-se inferir que as discrepâncias entre as estimativas de herdabilidade para um mesmo traço indicam que além da possibilidade de haver diferenças reais nos valores de h^2 devido a diferenças genéticas ou ambientais, duas principais fontes de desvios podem estar atuando, quando se usa o método da regressão para estimar h^2 (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999c): i) a existência de interação genótipo-ambiente que conduz a uma subestimativa de h^2 ; ii) efeito materno, que conduz a uma superestimativa de h^2 .

Os resultados da análise de covariância mostrados na **tabela 14** indicam que somente os ângulos θ_B e θ_C apresentam interação com a coleta e entre fêmeas parentais e coleta. Todavia, deve-se salientar que as temperaturas médias registradas na região da Mata de Sta. Genebra nos trinta dias anteriores à realização de cada coleta exibiram diferenças significativas, sendo: $15,6^\circ\text{C} \pm 2,88$ para coleta de agosto/2000 e de $21,9^\circ\text{C} \pm 2,43$ para a coleta de setembro/2000, conforme dados obtidos junto ao Centro de Ensino e Pesquisas em Agricultura (CEPAGRI) da UNICAMP. Esta variação de temperatura refletiu-se no padrão de coloração de pintas das moscas coletadas na Mata e em sua descendência do laboratório, cujas amostras foram utilizadas neste trabalho (Hatadani & Klaczko, comunicação pessoal).

4.3.3. Correlações fenotípicas

Os dados das correlações fenotípicas exibidos na **tabela 15** mostram valores elevados entre SI e os ângulos θ_A e θ_B , SH e os ângulos θ_B , θ_D e θ_E e entre os ângulos: $\theta_A \times \theta_J$, $\theta_B \times \theta_C$, $\theta_B \times \theta_E$, $\theta_C \times \theta_D$ e $\theta_D \times \theta_E$, verificando-se grande semelhança no que se refere ao sinal e nível de significância, com os valores destas correlações obtidos por de Bitner-Mathé & Klaczko (1999a), com esta mesma espécie e usando a mesma metodologia.

Esta mesma semelhança de valores e sinais também é verificada para os dados obtidos no experimento com *D. melanogaster* deste trabalho, o que mostra a repetibilidade e consistência destes dados, de modo que as considerações feitas sobre significado biológico das correlações observadas em *D. melanogaster* podem ser estendidas estes resultados com *D. mediopunctata*.

4.4. Comparação entre os resultados das duas espécies

A consistência dos resultados obtidos para as duas espécies estudadas neste trabalho pode ser inferida e avaliada quando se faz a comparação direta dos dados, usando-se o método da elipse a os valores das correlações fenotípicas.

4.4.1. Método da Elipse

O método da elipse mostrou-se muito eficiente e prático, pois além de fornecer os parâmetros da asa de modo direto, permite construir figuras que retratam de modo preciso e sucinto os dados relativos a estatística descritiva dos traços analisados, sua variabilidade fenotípica e plasticidade nas diferentes condições experimentais, bem como diferenças inerentes a cada espécie estudada. Isto pode ser notado nos conjuntos de elipses mostrados nas **figuras 11, 12 e 13**, que estão desenhados na mesma escala, o que permite inferências intra e interespecíficas.

Estas figuras mostram a grande plasticidade do tamanho da asa (SI) em relação à temperatura e que *D. mediopunctata* apresenta tamanho de asa (SI) bem maior que *D. melanogaster*, quando se comparam as elipses das asas das moscas criadas na mesma temperatura (16,5°C). A com a forma da asa (SH) mostra-se bastante conservada nas duas espécies, enquanto os ângulos θ exibem padrão complexo de variação, embora haja muita sobreposição destes ângulos entre as condições experimentais, nas duas espécies, exceto para θ_B . O conjunto de elipses de *D. mediopunctata* também mostra a diferença do tamanho da asa entre fêmeas parentais e fêmeas F1 nas duas coletas.

Outro fato a ser notado é que o método da elipse detectou, de modo preciso, a alteração ocorrida na forma da asa ocorrida na fase 2 do experimento de *D. melanogaster*, visto que as elipses de mães e filhas na temperatura de 24°C deveriam se sobrepor, entretanto, a elipse das filhas é mais alongada em seu eixo maior (**a**). Isto confirma a precisão do método para sintetizar os achados experimentais e mostra seu potencial heurístico.

4.4.2. Correlações fenotípicas

A consistência e repetibilidade das correlações fenotípicas obtidas neste trabalho podem ser avaliadas pelas comparações exibidas na **tabela 16** e regressão das médias mostrada na **figura 14**, o que sugere que estas podem ser um indicador de suas correlações genéticas (Roff, 1997, Linch & Walsh, 1998). Esta hipótese também é fundamentada no fato que todos os traços da asa analisados fazem parte do mesmo disco imaginal, e isto remete ao trabalho de Cowley & Atchley (1990), com *D. melanogaster*, no qual se mostrou que as correlações genéticas são maiores, em média, entre traços morfológicos desenvolvidos do mesmo disco imaginal do que traços desenvolvidos de diferentes discos.

5. Conclusão geral

O conjunto de dados obtido neste trabalho possibilita as seguintes conclusões sobre as propriedades fenotípicas e genéticas dos traços da asa nas espécies estudadas:

a) Tamanho da asa (SI):

- grande variação fenotípica,
- grande plasticidade em relação à temperatura ambiental,
- alta herdabilidade em condições controladas, como obtido no experimento com *D. melanogaster* fase 2,
- baixa correlação com os ângulos θ ;

b) Forma da asa (SH):

- elevada herdabilidade no campo, como mostrada nos experimentos com *D. mediopunctata*,
- interação genótipo-ambiente em condições controladas de laboratório, como observada no experimento com *D. melanogaster* fase 2,
- correlações fenotípicas elevadas com a disposição das veias, como observada pelas correlações de SH e ângulos θ , nas duas espécies;

c) Disposição das veias: ângulos θ :

- padrão muito complexo de variação,
- herdabilidade elevada observada para *D. mediopunctata* em condições de campo, e para *D. melanogaster*, em condições controladas do laboratório,
- correlações fenotípicas elevadas entre os diversos ângulos, indicando a integração desenvolvimental das veias no plano da asa;

d) Correlações fenotípicas:

- Boa repetibilidade e semelhança dos valores estimados das correlações entre os diversos traços, nas duas espécies;

e) Interação genótipo-ambiente:

- os resultados obtidos com *D. melanogaster* sugerem que a interação genótipo-ambiente tem importância limitada na determinação da morfologia da asa, visto que dos oito traços analisados em dois experimentos, somente o traço forma da asa (SH) apresentou interação no experimento da fase 2.

Finalizando, os resultados obtidos para as duas espécies mostraram boa concordância com trabalhos nos quais outros métodos da morfometria tradicional e geométrica foram aplicados, demonstrando que o **método da elipse** é muito eficiente para análise morfométrica da asa em *Drosophila*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atkinson, D. and Sibly, R. M. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.*, 12, 235-239.
- Barton, N. H. and Turelli, M. 1989. Evolutionary Quantitative Genetics: how little do we know? *Annu. Rev. Genet.*, 23, 337-370.
- Bitner-Mathé, B. C., Peixoto, A.A. and Klaczko, L. B. 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*; altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity*, 75, 54-61.
- Bitner-Mathé, B. C. and Klaczko, L. B. 1999a. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity*, 83, 688-696.
- Bitner-Mathé, B. C. and Klaczko, L. B. 1999b. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica*, 105, 203-210.
- Bitner-Mathé, B. C. and Klaczko, L. B. 1999c. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. *Genetica*, 105(1), 35-42.
- Booy, G., Hendriks, R. J. J. , Smulders, M. J. M., Van Groenendael, J. M. and Vosman, B. 2000. Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology*, 2 (4), 379-395.
- Bosenko, D.V. and Imasheva, A.G. 1998. Effect of larval density on the phenotypic and genetic variation of morphological traits in *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics*, 34(6), 620-623.
- Bubliy, O.A., Imasheva, A.G. and Loeschcke, V. 2000. Half-sib analysis of three morphological traits in *Drosophila melanogaster* under poor nutrition. *Hereditas*, 133, 59-63.
- Bubliy, O. A. & Loeschcke, V. 2001. High stressful temperature and genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 110, 79-85.
- Bulmer, M. G. 1989. Maintenance of genetic variability by mutation-selection balance: a child's guide through the jungle. *Genome*, 31, 761-767.
- Campbell, D. R. & Waser, N.M. 2001. Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. *Evolution*, 55(4), 669-676.
- Carvalho, B. C., Peixoto, A. A. and Klaczko, L. B. 1989. Sex-ratio in *Drosophila mediopuncta*. *Heredity*, 62, 425-428.
- Cavicchi, S., Giorgi, G. and Mochi, M. 1978. Investigation on early divergence between populations of *Drosophila melanogaster* kept at different temperatures. *Genetica*, 48(2), 81-87.
- Cavicchi, S., Guerra, D., Giorgi, G. and Pezzoli, C. 1985. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. *Genetics*, 109, 665-689.
- Cheverud, J. M. 1988. A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution*, 42(5), 958-968.

- Cowley, D. E. and Atchley, W. R. 1990. Development and quantitative genetics of correlation structure among body parts of *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist*, 135, 242-268.
- Coyne, J. A. and Beecham, E. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 117, 727-737.
- David, J. R., Allemand, R., Van Herrewege, J. and Cohet, Y. 1983. Ecophysiology: abiotic factors. In: Ashburner, M., Carson, H. L. and Thompson, Jr., J. N. (Eds.) *The Genetics and biology of DROSOPHILA*. Volume 3d. Academic Press, New York, pp. 106-170.
- David, J. R., Gibert, P., Gravot, E., Petavy, G., Morin, J. P., Karan, D. and Moreteau, B. 1997. Phenotypic plasticity and developmental temperature in *Drosophila*: analysis and significance of reaction norms of morphometrical traits. *J. therm. Biol.*, 22(6), 441-451.
- Debat, V. and David, P. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(10), 555-561
- Duarte, J. B. and Vencovsky, R. 1999. Interação Genótipos x Ambientes: uma introdução à análise "AMMI". Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto (SP). 60 pp.
- Falconer, D. S. and Mackay, T. F. C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th. Ed. Longman Group Ltd. London, UK.
- Freire-Maia, N. e Pavan, C. 1949. Introdução ao estudo da Drosófila. *Cultus*, 1(5), 1-71.
- French, V., Feast, M. and Partridge, L. 1998. Body size and cell size in *Drosophila*: the developmental response to temperature. *Journal of Insect Physiology*, 44, 1081-1089.
- Fry, J. D., Heinsohn, S. L., Mackay, T. F. C. 1996. The contribution of new mutations to genotype-environment interaction for fitness in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 50(6), 2316-2327.
- Gibert, P., Moreteau, B., Moreteau, J. C. and David, J. R. 1998. Genetic variability of quantitative traits in *Drosophila melanogaster* (fruit fly) natural populations: analysis of wild-living flies and of several laboratory generations. *Heredity*, 80, 326-335.
- Gilchrist, A.S. and Partridge, L. 2001. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 86, 144-152.
- Gillespie, J. H. and Turelli, M. 1989. Genotype-Environment Interaction and the maintenance of polygenic variation. *Genetics*, 121, 129-138.
- Gupta, A. P. and Lewontin, R. C. 1982. A study of reaction norms in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, 36(5), 934-948.
- Gurganus, M. C., Fry, J. D., Nuzhdin, S. V., Pasyukova, E. G., Lyman, R. F. and Mackay, T. F. C. 1998. Genotype-Environment Interaction at Quantitative Trati Loci Affecting Sensory Bristle Number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 149, 1883-1898.
- Haas, H. L. and Tolley, K. A. 1998. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the frui fly *Drosophila lummei*. *J. Zool.*, 245, 197-203.
- Hartl, D. L. 2000. *A primer of population genetics*. 3rd. Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 221 pp.
- Hoffmann, A. A. and Merilä, J. 1999. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends Ecol. Evol.*, 14(3), 96-101.

- Hoffmann, A. A. and Schiffer, M. 1998. Changes in the heritability of five morphological traits under combined environmental stresses in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 52(4), 1207-1212.
- Huey, R.B., Gilchrist, G.W., Carlson, M.L., Berrigan, D. and Serra, L. 2000. Rapid Evolution of a Geographic Cline in Size in an Introduced Fly. *Science*, 287, 308-309.
- Imasheva, A. G., Loeschcke, V., Zhivotovsky, L. A. and Lazebny, O. E. 1998. Stress temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 81, 246-253.
- Imasheva, A.G., Bosenko, D.V. and Bubli, O. 1999. Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity*, 82, 187-192.
- James, C. A., Azevedo, R. B. R and Partridge, L. 1997. Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from a latitudinal cline. *Genetics*, 146, 881-890.
- Jia, F., Greenfield, M. D. and Collins, R. D. 2000. Genetic variance of sexually selected traits in waxmoths: maintenance by genotype x environment interaction. *Evolution*, 54(3), 953-967.
- Karan, D., Morin, J. P., Moreteau, B. and David, J. R. 1998. Body size and developmental temperature in *Drosophila melanogaster*: analysis of body weight reaction norm. *J. therm. Biol.*, 23(5), 301-309.
- Klaczko, L. B. 1995. Population Genetics of *Drosophila mediopunctata*. In: Levine, L. I. (Ed.) *Genetics of Natural Populations: the Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 140-153.
- Klaczko, L. B. and Bitner-Mathé, B. C. 1990. On the edge of a wing. *Nature*, 346, 321.
- Klingenberg, C.P. and Zaklan, S.D. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*, 54(4), 1273-1285.
- Lande, R. 1980. Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *American Naturalist*, 116(4), 463-479.
- Lewontin, R. 2000. *The Triple Helix*. Harvard University Press. Cambridge, MA. 136 pp.
- Lynch, M. and Walsh, B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, MA, 980 pp.
- Loeschcke, V., Bundgaard, J. and Barker, J.S.F. 2000. Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia. *Heredity*, 85, 423-433.
- Medeiros, H. F. 2000. *Assembléias de espécies de Drosophila (Diptera; Drosophilidae) e efeitos de cursos d'água sobre suas distribuições em duas matas de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. UNICAMP. Campinas (SP). 156 pp.
- Medeiros, H. F. and Klaczko, L. B. 2000. A weakly biased *Drosophila* trap. *Drosophila Information Service*, 82, 100-102.
- Merilä, J. and Fry, J. D. 1998. Genetic variation and causes of genotype-environment interaction in the body size of blue tit (*Parus caeruleus*). *Genetics*, 148, 1233-1244.
- Monteiro, L. R. and Reis, S. F. 1999. *Princípios de Morfometria Geométrica*. Ed. Holos. Ribeirão Preto (SP).

- Morellato, L. P.C. 1991. Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no Sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP. Campinas SP. 203 pp.
- Moreteau, B., Capy, P., Alonso-Moraga, A., Munoz-Serrano, A., Stockel, J. and David, J. R. 1995. Genetic characterization of geographic populations using morphometrical traits in *Drosophila melanogaster*: isogroups versus isofemale lines. *Genetica*, 96,, 207-215.
- Mousseau, T. A. and Roff, D. A. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59, 181-197.
- Nunney, L. and Cheung, W. 1997. The effect of temperature on body size and fecundity in female *Drosophila melanogaster*: evidence for adaptive plasticity. *Evolution*, 51(5), 1529-1535.
- Orengo, D. J. and Prevosti, A. 1999. Wing-size heritability in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, 82, 100-106.
- Partridge, L. and Coyne, J. A. 1997. Bergmann's Rule in ectotherms: is it adaptive? *Evolution*, 51(2), 632-635.
- Partridge, L., Barrie, B., Fowler, K. and French, V. 1994. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution*, 48(4), 1269-1276.
- Pegueroles, G., Mestres, F., Argemí, M. and Serra, L. 1999. Phenotypic plasticity in colonizing populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics Mol. Biology*, 22(4), 511-516.
- Pezzoli, M. C., Guerra, D., Giorgi, G., Garoia, F. and Cavicchi, S. 1997. Developmental constraints and wing shape variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 79, 572-577.
- Powell, J. R. 1974. Temperature related genetic divergence in *Drosophila* body size. *The Journal of Heredity*, 65, 257-258.
- Powell, J. R. 1997. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: the *Drosophila* model. Oxford University Press. New York, NY. 562 pp.
- Prout, T. 1995. Four Decades of Inversion Polymorphisms and Dobzhansky's Balancing Selection. In: Levine, L. I. (ed), *Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia Univ. Press. New York. pp. 49-55.
- Prout, T. and Barker, J. S. F. 1989. Ecological aspects of the heritability of body size in *Drosophila buzzatii*. *Genetics*, 123, 803-813.
- Qvarnstrom, A. 1999. Genotype-by-environment interactions in the determination of the size of a secondary sexual character in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*). *Evolution*, 53(5), 1564-1572.
- Reusch, T. and Blanckenhorn, W. U. 1998. Quantitative genetics of the dung fly *Sepsis cynipsea*: Cheverud's conjecture revisited. *Heredity*, 81, 111-119.
- Riska, B., Prout, T. and Turelli, M. 1989. Laboratory estimates of heritabilities and genetic correlations in nature. *Genetics*, 123, 865-871.
- Roff, D. A. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman & Hall. New York. NY. 493 pp.
- Roff, D. A. and Mousseau, T. A. 1987. Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. *Heredity*, 58, 103-118.

- Rohlf, F.J. 1998. TpsDig. Versão 1.22. Morphometrics at SUNY Stony Brooks. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Roth, V.L. and Mercer, J.M. 2000. Morphometrics in Development and Evolution. *Amer. Zool.*, 40, 801-810.
- Scheiner, S. M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 24, 35-68.
- Shook, D. R. and Johnson, T. E. 1999. Quantitative trait loci affecting survival and fertility-related traits in *Caenorhabditis elegans* show genotype-environment interactions, pleiotropy and epistasis. *Genetics*, 153, 1233-1243.
- Starmer, W. T. and Wolf, L. L. 1989. Causes of variation in wing loading among *Drosophila* species. *Biol. J. Linnean Society*, 37, 247-261.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1995. Biometry. 3rd Ed. W. H. Freeman and Co., New York, 886 pp.
- Thomas, R. H. 1993. Ecology of body size in *Drosophila buzzatii*: untangling the effects of temperature and nutrition. *Ecological Entomology*, 18, 84-90.
- Thomas, R. H. and Barker, J. S. F. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 598-608.
- Thompson, Jr., J. N., Toney, J. V. and Schaefer, G. B. 1980. Pattern compensation in *Drosophila* wing vein development. *Heredity*, 44(1), 93-102.
- Val, F.C., Vilela, C.R., and Marques, M. D. 1981. Drosophilidae of neotropical region. In: Ashburner, M., Carson, H. C. and Thompson, Jr, J.N. (eds.) *The genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3a, London, Academic Press.
- Van 't Land, J., van Putten, P., Zwaan, B., Kamping, A. and Van Delden, W. 1999. Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritability and reactions norms. *J. Evol. Biol.*, 12, 222-232.
- Via, S. 1994. The evolution of phenotypic plasticity: what do we really know? In: Real, L. A. (Ed.) *Ecological Genetics*. Princeton University Press. New Jersey, pp. 34-55.
- Via, S. and Lande, R. 1987. Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype-environment interaction. *Genet. Res., Camb.*, 49, 147-156.
- Vieira, C., Pasyukova, E. G., Zeng, Z., Hackett, J. B., Lyman, R. F. and Mackay, T. F. C. 2000. Genotype-Environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 154, 213-227.
- Voss, R. S., Marcus, L. F. and Escalante, P. P. 1990. Morphological evolution in muroid rodents I. Conservative patterns of craniometric covariance and their ontogenetic basis in the neotropical genus ZYGODONTOMYS. *Evolution*, 44(6), 1568-1587.
- Waite, D. E. and Levin, D. A. 1998. Genetic and phenotypic correlations in plants: a botanical test of Cheverud's conjecture. *Heredity*, 80, 310-319.
- Wayne, M.L. & Mackay, T.F.C. 1998. Quantitative genetics of ovariole number in *Drosophila melanogaster*. II. Mutational variation and genotype-environment interaction. *Genetics*, 148, 201-210.
- Weigensberg, I. and Roff, D. A. 1996. Natural Heritabilities: can they be reliably estimated in the laboratory? *Evolution*, 50(6), 2149-2157.

- West-Eberhard, M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 20, 249-278.
- Zar, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd Ed. Prentice-Hall., Inc., New Jersey, 662 pp.
- Wilkinson, L. 1997. *Systat for Windows*, version 7. SPSS Inc., Chicago.
- Zhivotovsky, L. A. and Gavrilets, S. 1992. Quantitative variability and multilocus polymorphism under epistatic selection. *Theor. Popul. Biol.*, 42, 254-283.
- Zhivotovsky, L. A., Feldman, M. W. and Bergman, A. 1996. On the evolution of phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Evolution*, 50(2), 547-558.
- Zimmerman, E., Palsson, A. and Gibson, G. 2000. Quantitative trait loci affecting components of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 155, 671-683.
- Zwaan, B.J., Azevedo, R.B.R., James, A.C., van t Land, J. and Partridge, L. 2000. Cellular basis of wing size variation in *Drosophila melanogaster*: a comparison of latitudinal clines on two continents. *Heredity*, 84, 338-347.

7. ANEXO 01.

Meios de cultura utilizados nos experimentos

7.1. Meio de cultura para *D. melanogaster*

Composição:

- 50 g ágar.
- 200 ml de mel.
- 1750 ml água destilada.
- 200 g fubá pré-cozido.
- 33.3 g fermento biológico seco.
- 50 ml solução de Nipagin a 10% em álcool anidro.

Modo de preparo:

- i. Misturar o ágar e mel em 1250ml de água destilada. Cozinhar esta mistura em banho-maria durante 10 minutos, mexendo-a sempre, até dissolver o ágar;
- ii. Acrescentar à mistura em fervura, o fermento seco, o fubá já dissolvido separadamente nos restantes 500 ml de água e a solução de Nipagin;
- iii. Manter a mistura sob fervura durante mais 10 minutos, mexendo-a sempre para formar um meio homogêneo, e então distribuí-lo em recipientes autoclavados;
- iv. Manter o meio em banho-maria durante sua distribuição, podendo acrescentar-lhe pequenas quantidades de água destilada, para evitar que se solidifique;
- v. Deixar os recipientes esfriando durante 24 horas, em temperatura ambiente, antes de usá-los.

7.2. Meio de cultura para *D. mediopunctata*

Composição:

- 1000 ml de água destilada
- 13.3 g de ágar.
- 100 g de farinha de trigo integral.
- 33.3 g de fermento biológico seco.
- 33.3 g de açúcar cristal.
- 33.3 g de leite em pó integral instantâneo.
- 03 g de Nipagin.

Modo de preparo:

- i. Misturar os componentes, menos o ágar, colocando-os cozinhar em banho-maria. Durante o cozimento, o ágar deve ser acrescentado aos poucos para que o meio fique homogêneo;
- ii. Depois de misturar todos os componentes, o meio deve ser mantido sob fervura durante 5 minutos, mexendo-o sempre para mantê-lo homogêneo;
- iii. Segue-se sua distribuição em recipientes autoclavados;
- iv. Durante a distribuição, o meio deve ser mantido em banho-maria para não se solidificar;
- v. Os recipientes com meio devem ser novamente autoclavados durante 20 minutos a 120°C. Após este procedimento, deixá-los esfriar em temperatura ambiente, antes de seu uso.